



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ ORTAK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

RENAL HÜCRELİ KARSİNOMDA MikroRNA-124 EKSPRESYONU

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Burcu ÇAYKARA

Ağustos-2017



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ ORTAK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

RENAL HÜCRELİ KARSİNOMDA MikroRNA-124 EKSPRESYONU

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Burcu ÇAYKARA

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK

Ağustos-2017

ONAY

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü'nde tezli yüksek lisans öğrencisi olan Burcu ÇAYKARA'nın hazırladığı ve jüri önünde savunduğu "RENAL HÜCRELİ KARSİNOMDA MikroRNA-124 EKSPRESYONU" başlıklı tez başarılı kabul edilmiştir.

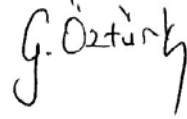
JÜRI ÜYELERİ

Proje Danışmanı:

[Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK]

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

İMZA



Üyeler:

[Prof. Dr. Seyit ANKARALI]

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi



[Yrd. Doç. Dr. Emel BALOĞLU]

Kurumu: Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi



Tez Savunma Tarihi: 06.09.2017

ETİK İLKELERE UYGUNLUK BEYANI

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde hazırladığım bu Yüksek Lisans Tezinin bizzat tarafımdan ve kendi sözcüklerimle yazılmış orijinal bir çalışma olduğunu ve bu projede;

- 1- Çeşitli yazarların çalışmalarından faydalandığımda bu çalışmaların ilgili bölümlerini doğru ve net biçimde göstererek yazarlara açık biçimde atıfta bulunduğumu;
- 2- Yazdığım metinlerin tamamı ya da sadece bir kısmı, daha önce herhangi bir yerde yayımlanmışsa bunu da açıkça ifade ederek gösterdiğimi;
- 3- Alıntılanan başkalarına ait tüm verileri (tablo, grafik, şekil vb. de dahil olmak üzere) atıflarla belirttiğimi;
- 4- Başka yazarların kendi kelimeleriyle alıntıladığım metinlerini kaynak göstererek atıfta bulunduğum gibi, yine başka yazarlara ait olup fakat kendi sözcüklerimle ifade ettiğim hususları da istisnasız olarak kaynak göstererek belirttiğimi,

beyan ve bu etik ilkeleri ihlal etmiş olmam halinde bütün sonuçlarına katlanacağımı kabul ederim.

Burcu CAYKARA



TEŞEKKÜR

Tezimi oluştururken sadece tezime değil şahsıma da yapmış olduğu tım katkılarını ve ynlendirmeleri iin Değerli Danışmanım Prof. Dr. Gler ztrk'e,

Tezim iin gereken destekleri ve laboratuvar olanaklarını sağladığı iin Değerli Hocam Prof. Dr. Sadrettin Pençe'ye,

Tez aşamalarında materyaller ve hastaların toplanmasına katkıda bulunan Doç. Dr. Alper tntemur'a,

Tezimin laboratuvar aşamalarındaki yardımları iin Msc. Hani Alsaadoni'ye,

Fizyoloji Anabilim Dalı'nda ki Saygıdeğer Hocalarıma ve Araştırma Görevlisi Arkadaşlarıma,

İM, Sağlık Bilimleri Enstitü Yönetimine,

Tez sürecinde desteklerini benden esirgemeyen Sevgili Aileme ve Arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY	i
ETİK İLKELERE UYGUNLUK BEYANI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vi
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİ	3
1.1. Türkiye Kanser Verileri	4
1.2. Böbrek Kanseri	6
1.3. Renal Hücreli Karsinom	8
1.4. Renal Hücreli Karsinomda Etkili Moleküler Yolaklar	10
1.5. Wnt Sinyal Yolağı	12
1.6. Frizled (Fzd) Reseptör Ailesi	14
1.7. mikroRNA Nedir?	16
1.8. miRNA-124	17
2. GEREÇ ve YÖNTEM	21
2.1. Renal Hücreli Karsinom Dokularının Toplanması	21
2.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	21
2.3. Total RNA İzolasyonu	23
2.4. mikroRNA Analizi	24
2.4.1. miR-124 ekspresyon analizinin hesaplanması	28
2.5. İstatistiksel Hesaplamalar	30
3. BULGULAR	31
3.1. Çalışma Gruplarının Demografik ve Klinik Özellikleri	31
3.2. miR-124 Ekspresyon Analizi	35
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	40
KAYNAKÇA	45
EKLER	57
ÖZGEÇMİŞ	60

KISALTMALAR

7TM: 7 Transmembran

APC: Adenamatöz polipozis koli

BHD: BirtHoggDube sendromu

CDK4: Siklin bağımlı kinaz 4

CDK6: Siklin bağımlı kinaz 6

CIN: Kromozomal Dengesizlik

CK1: Kazein kinaz

Dsh/Dvl: Disheveled

EMT: Epitelyal-mezenşimal transizyon

EX: Ekzozom

EZH2: Zeste homolog arttırıcı 2

FH: Fumarat hidrataz

FLCN: Folikülin

Fzd: Frizzled

GSK3: Glikojen sentaz kinaz 3

HGF/Met: Hepatosit büyüme faktörü/MET

HLRCC: Kalıtsal leiomyomatosis ve renal hücreli karsinom

HPRC: Kalıtsal papiller renal kanser

JNK: c-Jun N-terminal kinaz

LRP5: Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptör ilişkili protein 5

LRP6: Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptör ilişkili protein 6

miR-124: mikroRNA-124

miRNA: mikroRNA

MMP2: Matriks metalloproteinaz 2

NR3C2:Mineralokortikoid reseptör geni, Nükleer reseptör alt ailesi 3, grup C, üye 2

PI3K/Akt/mTOR: Fosfotidilinositol 3 kinaz (PI3K), Protein kinaz B (Akt), Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR)

PIK3CA: Fosfoinositid 3 kinaz katalitik altünit alfa

Pri-miRNA: Primer mikroRNA

RHK: Renal hücreli karsinom

RISC: RNA kaynaklı sessizleştirme kompleksi

ROCK1: Rho-iliskili protein kinaz

ROR2: Reseptör tirozin kinaz benzeri orfan reseptör 2

RYK: Reseptör tirozin kinaz

STAT3: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3

TCF/LEF: T-hücre faktörü/Lenfoit aktarıcı faktör

TNM: (T)Tümör odağı, (N) Lenf düğümü, (M) Metastaz sınıflandırma sistemi

TSC1: Tübero skleroz 1

TSC2: Tübero skleroz 2

VHL/HIF: Von Hippel–Lindau/Hipoksi-indüklenebilir faktör

VHL: Von Hippel Lindau sendromu

Wnt: Wingless int-1

β -TrCp: β -transdusin tekrarları içeren protein

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Genel kanser teorileri.....	4
Tablo 2. Reverse Transkriptaz reaksiyon bileşenleri.....	26
Tablo 3. Reverse Transkriptaz reaksiyon protokolü.....	26
Tablo 4. Gerçek zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri.....	27
Tablo 5. Gerçek zamanlı PZR protokolü.....	27
Tablo 6. Hastaların karakteristik özellikleri.....	32
Tablo 7. Hastaların tümör patolojilerine ait genel bilgiler.....	34
Tablo 8. miR-124 için elde edilen Δ CT ve $2^{-\Delta$ CT değerleri.....	35
Tablo 9. miR-124 için elde edilen değerler.....	36
Tablo 10. $2^{-\Delta$ CT Tümör ve kontrol gruplarında miR-124 ekspresyonunun hasta parametreleriyle karşılaştırılması.....	37
Tablo 11. Tümör evresine göre miR-124 ekspresyonunun hasta parametreleri ile korelasyonu.....	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil:1 Erkeklerde En Sık Görülen İlk 10 Kanseri Tipi	5
Şekil 2. 1987 ve 2010 yılları arasındaki TNM değerlendirilmesi.....	7
Şekil 3. Wnt Sinyal Yolları.....	14
Şekil 4. Frizled reseptör yapısı.....	15
Şekil 5. Wnt/Fzd etkileşimi	15
Şekil 6. miRNA oluşum aşamaları.....	17
Şekil 7. Kromozom 8.....	18
Şekil 8. İnsan normal dokularında miR-124-1 geni mRNA ekspresyonu.....	18
Şekil 9. mikroRNA analizi prensibinin şematik gösterimi.....	25
Şekil 10. miR-124 erime ve amplifikasyon eğrisi grafiği.....	28
Şekil 11. Ct örneği.....	29
Şekil 12. Furhman derecesine göre örneklerin dağılımı.....	33
Şekil 13. Tümör ve Kontrol dokularında $\Delta\Delta CT$ değerleri.....	36

ÖZET

GİRİŞ-AMAC: Renal hücreli karsinom, %40'ın üzerinde ölüm oranlarıyla en yüksek mortaliteye sahip ürolojik kanser türüdür. Renal hücreli karsinomda etkili olan yolaklardan biri olan Wingless/INT (Wnt) yolağının inhibisyonuyla renal kanser hücre ölümü ya da hücre büyümesinin durdurulabileceği gösterilmiştir. Wnt yolağı ile ilişkilendirilmiş tümör süpresör etkili miR-124, gen ifadesinin düzenlenmesinde görev almaktadır. Çalışmamızda miR-124'ün renal hücreli karsinomda ekspresyon analizi yapılarak kanser ile olan ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER: 30 kişiden alınan aynı böbreğe ait tümörlü ve sağlıklı doku örnekleri çalışmaya dahil edildi. RNA, "QIAGEN lysis agent" ile dokulardan izole edildi. Reverse transkriptaz (RT) enzimi ile cDNA elde edildi ve cDNA ürünü gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile ölçüldü. miR-124 ekspresyonu $\Delta\Delta CT$ (Delta Delta Eşik Döngüsü) metodu ile belirlendi ve istatistiksel analizler için SPSS 22 (Spearman's rho ve Wilcoxon rank sum test) programı kullanıldı.

BULGULAR: miR-124'ün renal hücreli karsinomda kat değişimi 0.356 bulundu ($Z=-4,453$, $p<0.001$). miR-124'ün 28 tümör dokusunda kontrol dokusuna oranla daha az eksprese edildiği görüldü. Azalmış ekspresyon seviyeleri ile vücut kitle indeksi ($p=0.023$, $r=-0.413$), tümör evresi ($p=0.022$, $r=-0.417$), tümör çapı ($p=0.009$, $r=-0.468$) ve nötrofil değerleri ($p=0.023$, $r=-0.415$) arasında negatif korelasyon bulundu.

SONUÇLAR: Çalışmamızda renal hücreli karsinomda miR-124 ekspersyonunun tümör büyüklüğü ve evresine bağlı olarak azaldığı gösterildi. İleriki çalışmalarla desteklenmesi durumunda tümör süpresör miR-124'ün renal hücreli karsinomda biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: mikroRNA, renal hücreli karsinom, miR-124, Wnt, Fzd

ABSTRACT

AIM: Renal cell carcinoma is the urological cancer type with the highest mortality rates over 40%. It has been shown that the inhibition of the Wnt pathway, one of the pathways that are effective in renal cell carcinoma, may kill or prevent the growth of renal cancer cells. The tumor-suppressor mir-124 associated with the Wnt pathway is involved in the regulation of gene expression. We aimed to reveal the relation between miR-124 expression and renal cell carcinoma.

MATERIAL-METHODS: 30 tumor and 30 surrounding healthy kidney tissues from the same subjects were included in the study. RNA was isolated from the tissues by “QIAGEN lysis agent”. cDNA was generated by reverse transcriptase (RT) enzyme and the PCR product was measured by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of mir-124 was determined by the $\Delta\Delta CT$ (Delta Delta Threshold Cycle) method. SPSS 22 (Spearman's rho and Wilcoxon rank sum test) program was used for statistical analysis.

RESULTS: The fold change of miR-124 was found 0.356 ($Z=-4,453$, $p<0.001$). miR-124 was found lower expression levels in 28 tumor tissues than controls and decreased expression levels correlated with body mass index ($p=0.023$, $r=-0.413$), tumor stage ($p=0.022$, $r=-0.417$), tumor diameter ($p=0.009$, $r=-0.468$) and neutrophil values ($p=0.023$, $r=-0.415$).

CONCLUSIONS: In our study, we found that miR-124 expression in renal cell carcinoma decreased with tumor size and stage. We consider the tumor suppressor miR-124 may be used as a biomarker in renal cell carcinoma if supported by further studies.

Keywords: mikroRNA, renal cell carcinoma, miR-124, Wnt, Fzd

GİRİŞ

Ürolojik kanserler arasında üçüncü sıklıkta görülen renal hücreli kanserler tüm parankimal böbrek tümörlerinin yaklaşık %85'ini oluşturur ve %40'ın üzerinde ölüm oranları sebebiyle mortalitesi en yüksek ürolojik kanser türüdür (1). Renal hücreli karsinomlar için erken belirteçler bulunmamakta ve kanser olguları genellikle radyoterapi ve kemoterapiye dirençli seyretmektedir (2). Berrak hücreli, papiller tip, kromofob tümörler gibi alt türleri bulunan renal hücreli karsinomlar oldukça heterojendir. Renal hücreli karsinomların alt türünün ve rol alan yolların bilinmesi, tedavi ve erken teşhis olanağı sağlaması açısından oldukça önemlidir (3, 4). Gen ifadesinin kontrolünde önemli role sahip mikroRNA'lar, DNA'dan kodlanan ancak proteine çevrilmeyen kısa dizili RNA molekülleridir. Hedef gene ait mesajcı RNA'ya (mRNA) bağlanarak, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona sebep olabilmektedirler (5, 6). MikroRNA'lar hakkında yapılan çalışmalar, kanser oluşumunda rol oynayabileceklerini ortaya çıkarmıştır (7, 8). Renal hücreli karsinomlarda da etkili olacak potansiyel mikroRNA'lar ve hedef genleriyle ilişkinin açığa çıkarılması; alt tiplendirmelerin sınıflandırılması, tanımlanması ve gelecekteki tedavi olanaklarının seçimine olanak sağlaması açısından önemlidir. 2015 yılında yayınlanmış bir çalışmada mikroRNA-124 (miR-124)'ün Frizzled (FZD) reseptör protein-5'i hedeflediği ve ayrıca Caki-2/DOX hücrelerinde P-glikoprotein (P-gp) ekspresyonunda FZD-5 siRNA'sı gibi davranarak inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur. P-glikoproteine olan etkileri yüzünden çoklu ilaç direnci için umut verici bir strateji olabileceği düşünülmektedir (9). Osteosarkoma hücre hattında yapılan bir çalışmada ise miR-124'ün ROR2'yi hedefleyerek kanonik olmayan Wnt sinyalizasyonu aktivitesini baskıladığı bulunmuş ve miR-124'ün osteosarkomada metastazı inhibe edebileceği ifade edilmiştir (10). Wnt ailesi direkt olarak hücre proliferasyonu ve polaritesini etkileyen glikoproteinlerdir (11). Embriyonik gelişim ve renal kanser gelişiminde rollere sahip olan Wnt sinyalizasyonunun hedef alınması ile kanser hücrelerinin öldürülebileceği ya da büyümesinin inhibe edilebileceği gösterilmiştir (12). Bu sebeple çalışmamızda tümör-supresör olarak görev yapan miR-124'ün (13, 14) renal hücreli karsinom dokularında ekspresyon analizinin yapılarak;

prognastik bir belirteç ya da hedeflenebilecek potansiyel bir tedavi stratejisi olup olmayacağının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



1. GENEL BİLGİ

1858 tarihinde Rudolf Virchow tarafından vücudun kendi hücreleri olarak ifade edilen kanser hücrelerinin (15) orjini, artmış proliferasyonu, metastastik kapasitesi, invazyon ve heterogenetik morfolojilerinin nasıl meydana geldiğini açıklamak için çok sayıda hipotez kurulmuştur. Kanser için ortaya atılmış modeller arasında en geçerli ve kabul edilmiş model olan mutasyon modeli bile kanseri tam olarak açıklayamamaktadır (16).

Theodore Boveri (17), denizkestanesi yumurtalarında yaptığı deneylerde mitoz sonrası oluşan yavru hücrelerde kromozomal dengesizlik sonucu anöploidi olması durumunda kanser gelişeceğini öne sürmüştür. Günümüzde de birçok bilim adamı anöploidi olan hücrelerde kromozomal dengesizlik meydana geldiği ve bununla kanserin temelini oluşturan evrimsel süreç olduğuna inanmaktadırlar (16). Anöploidinin solid tümörlerin ortak genetik özelliği olduğu açıklanmıştır (18). Ancak bazı kanıtlar anöploidininde karsinogenez için tek bir neden olmadığına işaret etmektedir. Örneğin Weaver ve Cleveland anöploidinin tümörögenezi bazı durumlarda promote etmek yerine baskıladığını bulmuşlardır (19). Dahası, Down sendromuna sahip bireyler fazladan bir tane kromozom 21 kopyasına sahip oldukları için solid tümörler açısından %50'den düşük riske sahipken lösemi için belirgin bir yüksek risk taşımaktadırlar (20). Martincorena ve arkadaşları kanser ilişkili genlerde binlerce mutasyon bulmuşlardır (21). Kanser ile ilişkili kuram ve hipotezler Tablo 1'de verilmiştir (16).

Tablo 1. Genel kanser teorileri

Teori, hipotez	Avantajları	Dezavantajları
Mutasyon teorisi	Mutasyonlar, çoğu kanserde saptanabilir (18).	Normal doku kanser taşıyıcı genler bile yüksek mutasyon sıklığı gösterebilir. (21). Kansere bağlı mutasyonlar olmaksızın kanserin gelişmesi (26, 27). Bu teori mitokondriyal ve çekirdek aktarım deneylerini açıklayamamaktadır (23).
Kromozomal dengesizlik, Türleşme teorisi, Anöploidi ve kromozomal dengesizlik (CIN)	Anöploidi çoğu tümörde saptanabilir (22).	Bir tümör içindeki her hücre kromozomal sapma göstermez (28). Mitokondriyal ve çekirdek aktarım deneylerini açıklayamamaktadır (23).
Mitokondriyal disfonksiyon	Tüm tümörlerde saptanabilir. Disfonksiyonel mitokondrinin transferi ile kanserin indüksiyonu (23).	Hipotez, bozulmuş mitotik iğ açıklığını, anöploidi ve CIN'yi indükleyen birçok madde ile kanser gelişimini açıklayamamaktadır (22, 29).
Çevre ve madde	Küçük çevresel değişiklikler kansere neden olabilir (24, 25).	Mikro çevre değişiklikleri, kalıtsal kanserlerin gelişmesindeki ilk adım değildir, miras kalan mutasyonlar bu sürecin başlatıcısıdır (18, 30).

Birbiri ile çelişkili bir çok bilimsel veri göstermektedir ki kanser tek bir modele dayandırılmayacak kadar kompleks bir hastalıktır ve her bir kanser alt türünün kendisine özel bir tümörögenез süreci mevcuttur. Bu sebeple kanserin genomik, epigenetik, proteomik gibi birçok yönden incelemesiyle hastalığın moleküler temeli açığa çıkarılabilir ve yeni tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlanabilir.

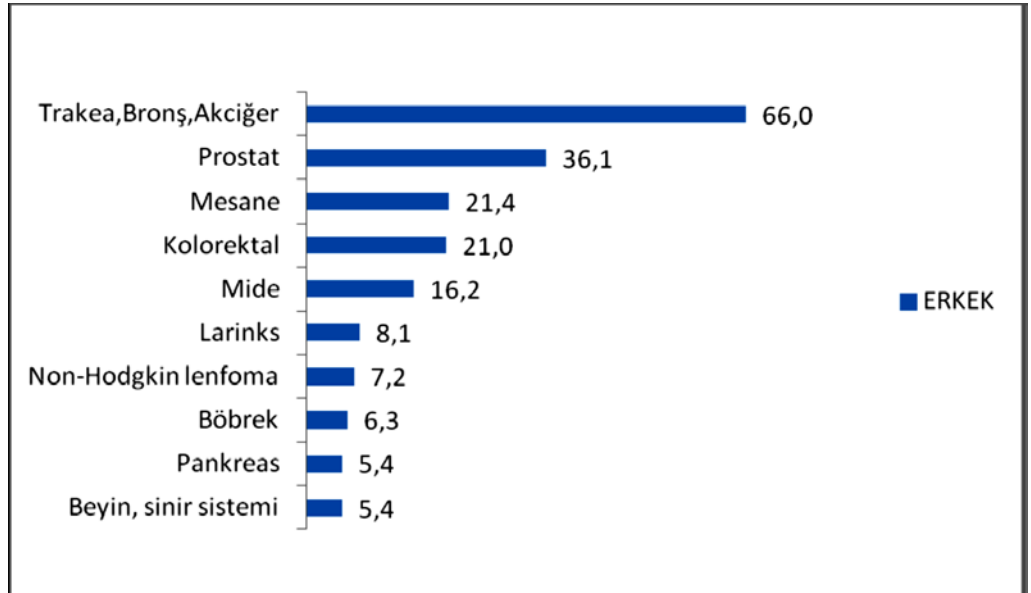
1.1. Türkiye Kanser Verileri

1947 yılında Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu'nun kurulmasıyla başlayan kanser alanındaki düzenlemeler, 1970 yılında Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü bünyesinde kurulan Kanser Savaş Müdürlüğü ile kanserden koruyucu ve tedavi edici hizmetleri düzenleyen, hastanelerde ilgili birimlerin kurulması, yürütülmesi ve denetlenmesini sağlayan birim halini almıştır (31). Kanserle mücadele

konusunda 2005 yılından bu yana toplumsal anlamda daha ileri hedefler alınarak; toplumun kanser hakkında bilgilendirilmesi, erken teşhis ve taramanın yaygınlaştırılması amacıyla Erken Teşhis ve Tarama Merkezleri kurulmaya başlamıştır (32).

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2014 yılında hazırladıkları Türkiye Kanser İstatistikleri verilerine göre; 'Türkiye'de 2009 yılında yaşa standardize edilmiş kanser hızı erkeklerde %269,7, kadınlarda ise %173,3 olarak bulundu. 2004-2009 yılları arasındaki kanser insidansı incelendiğinde;

- Türkiye'de kanser sıklığı gelişmekte olan diğer ülkelerle benzerlikler göstermektedir.
- 2009 yılı için ülkemizde her yıl yaklaşık 98.000 erkek ve 63.000 kadın kansere yakalanmaktadır.
- Erkeklerde en çok rastlanılan kanser türü trakea, bronş ve akciğer iken, böbrek kanseri 8. sırada yer almaktadır (Şekil 1) (33).
- Üriner organlardan ölüm sayısı 2004'te 1.575, 2005'te 1.767, 2006'da 1.827, 2007'de 2.115, 2008'de 2.853 ve 2009 yılında 3.032'ye yükselmiştir (33).



Şekil 1. Erkeklerde En Sık Görülen İlk 10 Kanser Tipi

1.2. Böbrek Kanseri

Böbrek kanseri bir çok tipi bulunan kompleks bir hastalıktır ve Ailesel Kromofob Böbrek Kanseri, Ailesel Tip I ve Tip II Papiller Böbrek Kanseri, Ailesel Renal Hücre Karsinomu ve Ailesel Non-Sendromik Böbrek Kanseri bu kanser türünün tiplerindendir. Folikulin (FLCN), tübero sklerozis 1 (TSC1), tübero sklerozis 2 (TSC2), fumarat hidrataz (FH) gibi genlerin aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin kanser gelişiminde önemli olduğu ifade edilmiştir (34). Ürolojik kanserler arasında üçüncü sıklıkta görülen renal hücreli kanserler tüm parankimal böbrek tümörlerinin yaklaşık %85'ini oluşturur ve %40'ın üzerinde ölüm oranları sebebiyle mortalitesi en yüksek ürolojik kanser türüdür (1).

Böbrek kanserlerinin sınıflandırılması ve derecelendirilmesinde çeşitli tanımlamalar önemlidir. Malign tümörlerin sınıflandırılması için ilk defa 1942-1952 yılları arasında Pierre Denoix tarafından geliştirilen Tümör-Lenf Nodu-Metastaz (TNM) sistemi, aynı doku ya da organ kaynaklı patolojik olarak benzer kanserleri büyüme ve yayılma şekillerine göre sınıflanmaktadır (35). 'Primer kanser odağı (T) tedavi edilmezse büyür ve bir noktada bölgesel lenf düğümü (N) tutulumu ile uzak metastaz (M) yapar. T, N ve M sınıflandırmaları kanserin bu süreçlerini ifade etmek için basit bir şema oluşumunu sağlar ve prognozun öngörülmesine yardımcı olarak vaka gruplarının ve operasyonların karşılaştırılmasına yardımcı olur (36). TNM sistemlerinde yapılan güncellemelerin Türkiye geçerliliğinin değerlendirildiği bir çalışmada; böbrek hücreli kanser sağ-kalım öngörülerini için TNM sisteminin yeterli olmadığı, hastanın klinik durumu, tümör derecesi ve diğer bazı faktörlerinde dâhil edileceği dinamik prognostik modellerin iyileştirilmesinin gerekliliği belirtilmiştir. 1987 yılından 2010 yılına kadar gerçekleşmiş 4 TNM sınıflandırması da araştırmacılar tarafından özetlenmiştir (Şekil 2) (35).

		1987 TNM	1997 TNM	2002 TNM	2010 TNM
		Böbreğe sınırlı, ≤ 2.5 cm	Böbreğe sınırlı, ≤ 7 cm	—	—
Tümör yaygınlığı	T1	Böbreğe sınırlı, ≤ 2.5 cm	Böbreğe sınırlı, ≤ 7 cm	—	—
	T1a	—	—	Böbreğe sınırlı, ≤ 4 cm	Böbreğe sınırlı, ≤ 4 cm
	T1b	—	—	Böbreğe sınırlı, 4-7 cm	Böbreğe sınırlı, 4-7 cm
	T2	Böbreğe sınırlı, > 2.5 cm	Böbreğe sınırlı, > 7 cm	Böbreğe sınırlı, > 7 cm	—
	T2a	—	—	—	Böbreğe sınırlı, 7-10 cm
	T2b	—	—	—	Böbreğe sınırlı, >10 cm
	T3a	Gerato fasyasına sınırlı, Adrenal invazyonu ya da perinefrik yağlı doku invazyonu	Gerato fasyasına sınırlı, Adrenal invazyonu ya da perinefrik yağlı doku invazyonu	Gerato fasyasına sınırlı, Adrenal invazyonu ya da perinefrik yağlı doku invazyonu	Gerato fasyasına sınırlı, Renal ven veya dallarında (kas içeren) tümör trombusu veya perinefrik yağlı doku ve/veya renal sinüste yağ invazyonu.
	T3b	Renal vene tümör trombusu uzanımı	Renal vene veya VKI'de diyafram altı tümör trombusu uzanımı	Renal vene veya VKI diyafram altı tümör trombusu uzanımı	VKI'de diyafram altı tümör trombusu uzanımı
	T3c	VKI'de diyafram altı tümör trombusu uzanımı	VKI'de diyafram üstü tümör trombusu uzanımı	VKI'de diyafram üstü tümör trombusu uzanımı veya VKI duvarına invazyon	VKI'de diyafram üstü, tümör trombusu veya VKI duvarına invazyon
	T4	Gerato fasyası dışına uzanım gösteren tümör	Gerato fasyası dışına uzanım gösteren tümör	Gerato fasyası dışına uzanım gösteren tümör	Gerato fasyası dışına veya aynı taraf adrenele uzanım gösteren tümör
Lenf Nodu	T4a	Diyafram üstü tümör trombusu VKI'ye uzanım	—	—	—
	N0	Bölgesel lenf nodu tutulumu yok	Bölgesel lenf nodu tutulumu yok	Bölgesel lenf nodu tutulumu yok	Bölgesel lenf nodu tutulumu yok
	N1	≤2 cm tek bölgesel lenf nodu tutulumu	Tek bölgesel lenf nodu tutulumu	Tek bölgesel lenf nodu tutulumu	Bölgesel lenf nodu/nodları tutulumu
	N2	2-5 cm tek bölgesel lenf nodu tutulumu	Birden fazla lenf nodu tutulumu	Birden fazla Lenf nodu tutulumu	—
Metastaz	N3	>5 cm tek bölgesel lenf nodu tutulumu	—	—	—
	M0	Uzak organ metastazı yok	Uzak organ metastazı yok	Uzak organ metastazı yok	Uzak organ metastazı yok
	M1	Uzak organ metastazı var	Uzak organ metastazı var	Uzak organ metastazı var	Uzak organ metastazı var

T0,N0,M0: Değerlendirme sonucunda, primer tümör, lenf düğümü veya uzak metastazın bulunmaması.
Tx,Nx,Mx: Primer tümör, lenf düğümü veya uzak metastazın değerlendirilmemiş olması.
VKI: Vena kava inferior

Şekil 2. 1987 ve 2010 yılları arasındaki TNM değerlendirilmesi

Prognostik belirleyicilerden bir diğeri olan Fuhrman derecelendirme sistemi; nükleer büyüklüğü, nükleer şekil ve nükleolar prominensin değerlendirilmesine dayanmaktadır. Fuhrman derecelendirme sistemi metastaz ile korelasyon üzerine

kuruludur; derece 1 tümörler istatistiksel olarak derece 2, 3 ve 4'e göre belirgin seviyede düşük metastaz oranına sahiptirler (37).

Fuhrman nükleer derecelendirme sistemi;

- 1- Küçük, yuvarlak, uniform nükleus (10 mikron), şüpheli nükleoli, nadiren lenfosit görünümü,
- 2- Hafif düzensiz nükleus, sadece 40X büyütme de görülen nükleus, nükleer çap 15 mikron, tümörlerin %40'ında açık kromotin,
- 3- Nükleus 10X'de görülüyor, nükleus oldukça düzensiz, çap 20 mikron, tümörlerin %30-40'ında açık kromatin,
- 4- Mitoz garip ve çok bölmeli, derece 3'ün özelliklerinin yanı sıra pleomorfik hücreler, makronükleus (Tümörlerin %15'inde) görülmektedir (38).

1.3. Renal Hücreli Karsinom

Renal hücreli kanser (RHK) kadın ve erkeklerin her ikisinde de benzer şekilde görülmektedir. Birleşik Devletlerde 2016 yılında 62.700 böbrek kanseri ve 14.240 renal pelvis kanseri vakasının ölümüne yol açtığı belirtilmiştir (39). Tüm kanserlerin %4'ünü oluşturan RHK'nın erkek ve kadınlarda görülme oranı ise sırasıyla 1,5:1 oranındadır (40). RHK, renal pelvis ve renal medullayı içermediği için böbrek kanserinden ayrılmaktadır. RHK söz konusu olduğunda renal tübüller gibi böbrek yatağı kısımları akla gelmelidir. RHK'nın kalıtsal aktarımının bazı patojenik genetik varyantlar ile %5 ile %8 arasında olduğu belirtilmiştir (41, 42, 43). Bu sebeple ailesel RHK öykülerinin arkasında henüz keşfedilmemiş genler ya da genetik faktörlerin olduğu düşünülmektedir. RHK sporadik ya da kalıtsal olarak oluşabilir. Major otozomal dominant kalıtsal RHK sendromları: Von Hippel Lindau sendromu (VHL), Kalıtsal leiomyomatosis ve renal hücreli kanser (HLRCC), Kalıtsal papillary renal kanser (HPRC), BirtHoggDubé sendromu (BHD) (41). Her sendrom histolojik ve genetik değişiklikler gibi çeşitli faktörlerle birbirinden ayrılır. Bu yüzden her sendroma sahip bireyin kişisel değişkenleri değerlendirilmeli ve gözlenmelidir. Her bir sendrom için (VHL, HPRC, BHD ve HLRCC) farklılık gösteren prognoz, renal tümörün tespit edildiği ve müdahale edildiği zamana bağlı olarak karakteristik özellik

gösterir. Teşhiste prognostik belirleyiciler ise, RHK'nın evresi, tümörün böbrekle sınırlı kalıp kalmaması, tümör büyüklüğü, Fuhrman nükleer derecesi ve çok odaklı olmasıdır (44, 45, 46).

Epidemiyolojik çalışmalar RHK'da aile öyküsünün hastalık için risk faktörü oluşturduğunu belirtmektedir (43, 47). İsveç Aile Kanseri Veri tabanında 1932 yılından itibaren doğmuş bireylerin ve biyolojik ebeveynlerinin 2000 yılına kadar olan verileri incelendiğinde; RHK teşhisi konmuş kardeşe sahip bireylerin RHK için yüksek düzeyde risk taşıdığı sonucuna varılmıştır. Kardeşlerde gözlenen bu yüksek göreceli riskte sporadik renal karsinom gelişiminde resesif bir genin etkili olabileceği düşüncesini akla getirmiştir (47). İzlanda'da 1955 ile 1999 yılları arasında (1.078 olgu, 660 erkek, 418 kadın) RHK olan tüm hastaların dâhil edilerek yapıldığı araştırmada; 600.000'den fazla İzlandalı birey genealojik açıdan kapsamlı bilgisayarlı veri tabanları kullanılarak analiz edilmiştir. RHK hastalarının %58'inin birinci ya da ikinci dereceden akrabalarında da RHK olduğu gözlemlenmiş ve RHK olan kardeşe sahip bireylerin göreceli riskinin 2,5 kat fazla olduğu bulunmuştur (43). Danimarka, Finlandiya, Norveç ve İsveç'te yürütülen çalışmaya 80.309 monozigotik, aynı cinsiyete sahip 123.382 dizigotik bireyler dahil edilmiştir ve kansere sahip kardeşi olan bireylerde kanser riskinin %38 oranında yüksek olduğu bulunmuştur (48).

Genç yaşta rastlanılan RHK'nın kalıtsal etiyolojiyle muhtemel ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sporadik RHK genellikle 50-70 yaşlarında rastlanılırken, kalıtsal böbrek kanseri çeşitleri genellikle daha genç yaşlarda teşhis edilmektedir (42). RHK epidemiyolojisine odaklanmış çalışmalarda hastalığın gelişiminde çevresel ve yaşam tarzına bağlı faktörlerin etkili olabileceği belirtilmiştir. Sigara, hipertansiyon ve obezite major çevresel ve yaşam tarzı risk faktörleri olarak RHK ile ilişkili bulunmuştur (49).

1.4. Renal Hücreli Karsinomda Etkili Moleküler Yolaklar

Böbrek kanserinin geleneksel kemoterapi ile radyasyon tedavisine dirençli olması ve erken teşhis olanağının zayıf olması nedeniyle, tedaviler genellikle başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Başarılı bir RHK tedavisi için kanserin başlangıç ve gelişim süreçlerinin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine ihtiyaç vardır. RHK oluşumunun altında yatan moleküler mekanizmalarda PI3K/Akt, HGF/Met, VHL/HIF ve Wnt sinyal yolaklarının etkili

olduğu bildirilmiştir (50). Multi-layer bir omiks çalışmasında, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun renal karsiyogeneze oldukça önemli olduğu bulunmuştur (51). Embriyonik gelişim ve karsiyogeneze epitelial-mezenşimal transizyon (EMT)'da Wnt sinyal yolağının metastaz oluşumu ile hücre göçünü kolaylaştırdığı bildirilmiştir (52). Başka bir çalışmada; RHK Wnt/ β -katenin sinyal yolunda ekspresyon değişimleri incelenmiş ve berrak hücreli RHK'da Wnt1 ekspresyonunun artmış tümör çapı, vasküler invazyon ve ilerlemiş evre ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Membranöz β -katenin ilerlemiş evre, vasküler invazyon ve tümör nekrozu ile ilişkili bulunmuştur (53). Bir başka çalışma da ise Wnt10A ekspresyonunun siRNA ile azaltılması sonucu RHK hücrelerinin hücre proliferasyonu ve agregasyonunda azalmaya sebep olduğu görülmüştür (54). Promotor hipermetilasyon ile oluşan Wnt sinyal yolağı aktivasyonunun, karsiyogeneze hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını arttırdığı bildirilmiştir (55). Berrak hücreli RHK'da Wnt7A gen ekspresyonunun azaldığı (%88), tümör evresi ile Wnt7A hipermetilasyonunun arasında pozitif korelasyon olduğu metilasyon analizi ile açığa çıkarılmıştır (56).

Wnt sinyal yolağındaki farklı bileşenleri hedef alan 10'dan fazla madde, çeşitli kanser tiplerinin tedavisi için geliştirilmiştir ve bunlardan bazıları için Faz II çalışmaları yapılmaktadır (57).

Wnt/Fzd yolağı ile ilgili yapılan çalışmalarda, sinir sistemindeki sinyalizasyonun nöral tüp oluşumuna, aksonal remodellenmeye, nörotransmitter salınımına, kansere ve nöroblastoma dejeneratif hastalıklara (Alzheimer hastalığı gibi) aracılık ettiği gösterilmiştir (58, 59, 60). Wnt/Fzd sinyalinin kalp ve damarlanma gelişiminde de etkili olduğu bulunmuştur (61).

Wnt proteinlerinin ekstraselüler veziküller ile ilişkili olabileceği de bulunmuştur (62). Membranla çevrelenmiş veziküllerin, değişik hücre tiplerinden salındığı ve kan, idrar gibi vücut sıvılarında bulunabileceği belirtilmiştir. Veziküllerin bu spesifik alt gruplarına ekzozom (EX) adı verilmekte ve ekzozomlar mRNA, miRNA ve taşımaktadır (63; 64). Bunların sadece hücreden hücreye iletişim için değil aynı zamanda çeşitli fizyolojik ve hastalık süreçlerinde de yer aldıkları belirtilmiştir. Son bulgulara göre renal tümör progresyonunda ve metastazında, EX'ler kanser ilişkili immün supresyon ve immün cevap aktivasyonunda da rol oynayabileceği bildirilmiştir (65). EX'lerin bu özellikleri dikkate alındığında kan ve idrardan kolayca izole edilerek

yeni invazif olmayan bir belirteç ve ayrıca aşı olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir (12).

Wnt reseptörlerinden Fzd5 ve Fzd8'in mRNA seviyelerinin RHK dokusunda normale kıyasla artmış olduğu bulunmuştur. Fzd5 ve Fzd8'in sinyal yolağındaki hedefleri olan Siklin D1' in de artmış olması, bu moleküllerin RHK için biyobelirteç olabileceğini düşündürmüştür (66). Ayrıca, RHK'da Fzd5'in miR-124 ile baskılanmasıyla P-glikoprotein aracılı kemorezistansın aşılabilmesi için umut verici bir strateji olduğu belirtilmiştir (9).

miRNA'ların RHK patofizyolojisi üzerindeki temel rolü, 3'-UTR'yi tanımlayarak hedef genlerinin downregülasyonunu içermektedir. Onkogen veya tümör baskılayıcı olarak hareket ederek proliferasyon, göç ve invazyon gibi hücre süreçlerinin biyolojisini etkilemektedirler (67). Sirküle olan ve üriner miRNA'ların RHK'da düzensiz olduğu bulunmuştur. Redova ve arkadaşları, RHK hastaları ve sağlıklı kontrollere ait serumlar arasında 30 mikroRNA'nın farklı şekilde eksprese olduğunu belirlemiştir. RHK hastalarında 19 miRNA'nın artarken, 11 miRNA'nın azaldığını bildirilmiştir. (68). Gottardo ve arkadaşları, miR-28, miR-185, miR-27 ve let 7f-2'nin RHK'da normal böbrek örneklerine göre belirgin şekilde arttığını bulmuşlardır (69). Başka bir çalışmanın sonuçlarında ise bhRHK dokularında miR-34a, miR-224 ve miR-21'in arttığı, buna karşılık miR-141, miR-149 ve miR-429'un, azaldığı gösterilmiştir (70). Silva Santos ve arkadaşları, RHK' nın normal dokulara kıyasla önemli derecede düşük miR-21, miR-141 ve miR-200b ekspresyon seviyeleri sergilediğini ve tüm miRNA'ların (miR-21, miR-141, miR-155, miR-183 ve miR-200b) ekspresyon düzeylerinin kötü huylu ve iyi huylu renal hücre tümörleri arasında önemli ölçüde farklılaştığını bildirmiştir (71). Malign ve malign olmayan dokuların miRNA profillerinin farklılaştığı ve RHK'da miR-141 ile miR-155 kombinasyonunun, RHK örneklerini genel olarak %97 oranında malign ve malign olmayan tümörleri doğru olarak sınıflandırılabilceği gösterilmiştir (72). Youssef ve arkadaşları, farklı RHK alt tiplerini miRNA'lar kullanılarak dört basamakta ayırt edebilen bir sınıflandırma sistemi geliştirmiştir. Sistemin, normal böbrek hücrelerinin RHK'dan ayırt edilmesinde %97, berrak hücreli RHK için %100, papiller RHK için %97 ve kromofobik RHK'dan onkositomu ayırt edilmesinde %100 doğrulukta bir duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir (73).

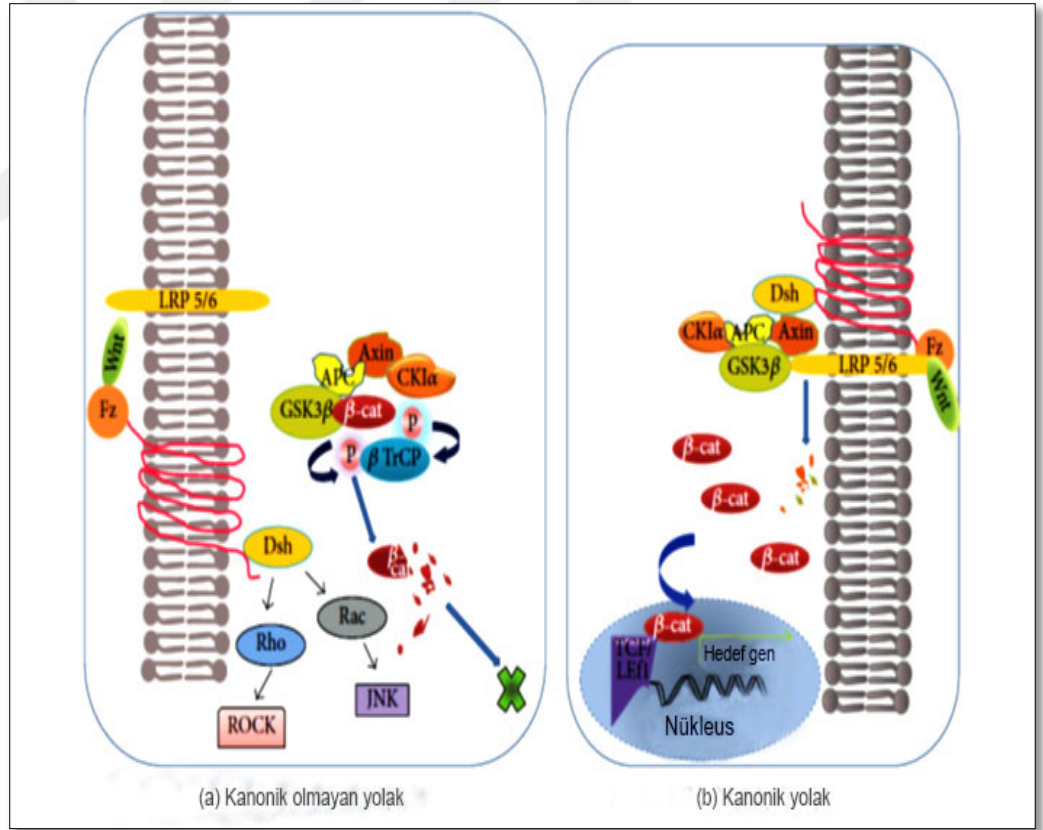
Metastaz, RHK hastalarında son derece yaygındır ve miR-10b, miR-139-5p, miR-130b ve miR-199b-5p, bhRHK metastazı ve prognoz ile ilişkili bulunmuştur (74). miRNA'ların patogeneze oynadığı roller sebebiyle, miRNA'ya dayalı tedavilerin geliştirilmesi önem kazanmıştır (67). Örneğin, miR-199a-3p'nin 769-P ve Caki-1 RCC hücre hattına uygulanmasıyla hücre proliferasyonu inhibe ettiği ve G1fazını bloke ettiği gösterilmiştir (75). Dolaşımdaki miR-1233, RHK hastaları için potansiyel bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (76). RHK'nın tespiti için hastalardaki miRNA'ların yüksek derecede tanısal doğruluğu, yeni nesil biyolojik belirteç görevi görebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, rutin klinik kullanımın geliştirilmesi için daha çok sayıda araştırma yapılması gerekmektedir (77).

miRNA ekspresyonu, miRNA düzenleyici bir mekanizma olan epigenetik gen susturulması ile kontrol edilebileceği ve bu nedenle, gen ifadesinin epigenetik modülasyonu, miRNA ekspresyonunu modüle etmek için önemli olabileceği ileri sürülmektedir. Berrak hücreli RHK hücre hattında DNA metil transferaz inhibitörleri ve histon deasetilaz kullanımı, tümör süpresyon fonksiyonuna sahip sessiz miRNA'ların yeniden ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir (78). Bu gibi bilgiler miRNA'ların RHK patogenezinde, prognozu ve tedavisinde önemli rollere sahip olabileceklerini düşündürmektedir.

1.5. Wnt Sinyal Yolağı

Wnt; hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre göçünü düzenleyen 19 glikoprotein içeren bir ailedir (79, 80, 81). Wnt sinyal yolağı; kanonik Wnt/ β -katenin sinyal yolu, hücre polaritesinin sağlanmasında rol oynayan kanonik olmayan Wnt/PCP sinyal yolu ve kanonik olmayan Wnt/kalsiyum (Ca^{+2}) sinyal yolu olmak üzere üç şekilde tanımlanmıştır (82, 83). Katenin, kadherin protein kompleksinin içinde yer alan bir çekirdek komponent olup hücre içi bir sinyal dönüştürücü olarak görev almakta ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivasyonu için gereklidir (82). Kanonik Wnt sinyal yolağında, sekrete edilen Wnt ligandları Frizzled (Fzd) reseptörlerine bağlandıktan sonra, membran reseptörlerinden Frizzled (Fzd) ailesi ile ko-reseptör olan LDL reseptör ilişkili protein 5 ve 6' ya bağlanır (LRP5/LRP6) ve bu yapıya sitoplazmik fosforile iskele protein Disheveled (Dsh/Dvl) dâhil olur. Fosforile olan LRP6, reseptörlere AXIN kompleksinin bağlanmasına olanak sağlar (84). İskele protein AXIN ve tümör supresör gen ürünü olan adenomatöz polipozis koli (APC),

kazein kinaz 1 (CK1) ve glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) ile beraber AXIN kompleksini oluştururlar. CK1 ve GSK3 ve β -transdusin tekrarları içeren protein (β -TrCp) β -katenin amino terminalinden fosforile eder ve E3 ubiquitin ligaz alt birimi proteazom aracılı degradasyonu yönetir (85). Fosforile edilen β -katenin gen transkripsiyonunu başlatamaz ve sonuç olarak Wnt hedefli genler T-hücre faktörü/lenfoid aktarıcı faktör (TCF/LEF) ailesi proteinleri ile baskılanır. Kanonik olmayan sinyal yolağında ise Wnt ligandı Fzd ailesine ve orfan reseptör 2/reseptör tirozin kinaz (ROR2/RYK) koreseptörlerine bağlanarak kompleks oluşturur. Reseptör sitümlasyonundan sonra Dvl aktive olarak Rho ailesi GTPaz'larının (RhoA, RhoU, RAC, ve CDC42 gibi küçük G proteinleri) ve JNK'nın sekonder aktivasyonuna sebep olur (Şekil 3) (86). Diğer kanonik olmayan Wnt sinyal yolağı ise Wnt/Ca²⁺ ise sinyal kaskadının aktivasyonunu içerir (86).



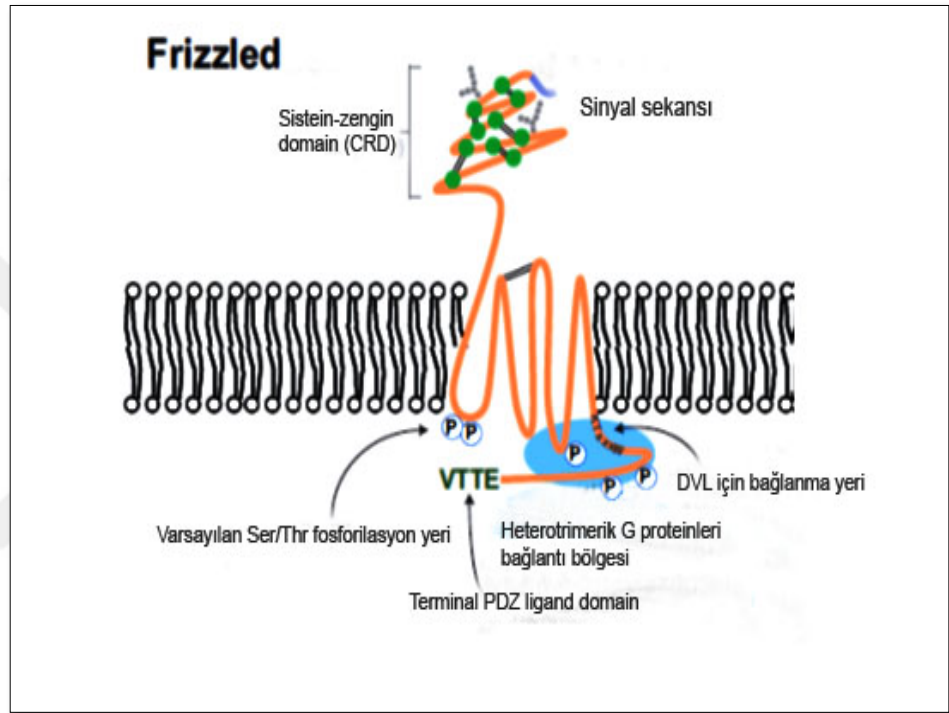
Şekil 3. Wnt Sinyal Yolakları

Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aksine, RHK'da kanonik olmayan Wnt sinyalizasyonu daha az araştırılmıştır. RTK-benzeri orfan reseptör 2 (ROR2), berrak hücreli RHK' da aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (87).

1.6. Frizzled Reseptör Ailesi

Frizzled (Fzd), 7-transmembran (7TM) alanı kapsayan hücre yüzey reseptörleridir ve wingless/int1 (Wnt) aile lipoglikoproteinleri ile aktive olurlar (88, 89). Fzd reseptör yapısı Şekil 4'te verilmiştir (88).

Fzd reseptör sınıflarının hastalıklarla olan yakın ilişkileri sebebiyle gelecekte muhtemel yeni tedavi hedefleri olarak kullanılacakları öngörülmektedir (90, 91, 92).



Şekil 4. Frizzled reseptör yapısı

10 farklı Fzd reseptörü ile 19 Wnt ligandı çok sayıda hücresel süreçlerin düzenlenmesine katılıyor olmalarına rağmen, hücre yüzeyinde sinyal başlangıç seviyeleri hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Wnt/Fzd reseptör etkileşimleri Şekil 5'te verilmiştir (93).

WNT	1	2	2B	3	3A	4	5A	5B	6	7A	7B	8A	8B	9A	9B	10A	10B	11	16
FZD ₁	x	x		o	x		x	o		o	x								
FZD ₂		o		o	o		x		o	o	o		o						
FZD ₃	x				x		x												
FZD ₄	x	x		o			o				x								
FZD ₅	o				x		x			x					o		o		
FZD ₆					x	x	x	o		o									
FZD ₇				x	x		o			o									
FZD ₈					x										o				
FZD ₉	x																		
FZD ₁₀											x								

Şekil 5. WnT/Fzd etkileşimi

X: İmmunopresipitasyona göre direk bağlandığını, O: TCF raportör aktivitesi gibi sinyalizasyona işaret eden kolokalizasyonu, Yeşil x: IUPHAR veri tabanında belirtilen etkileşimleri göstermektedir (93).

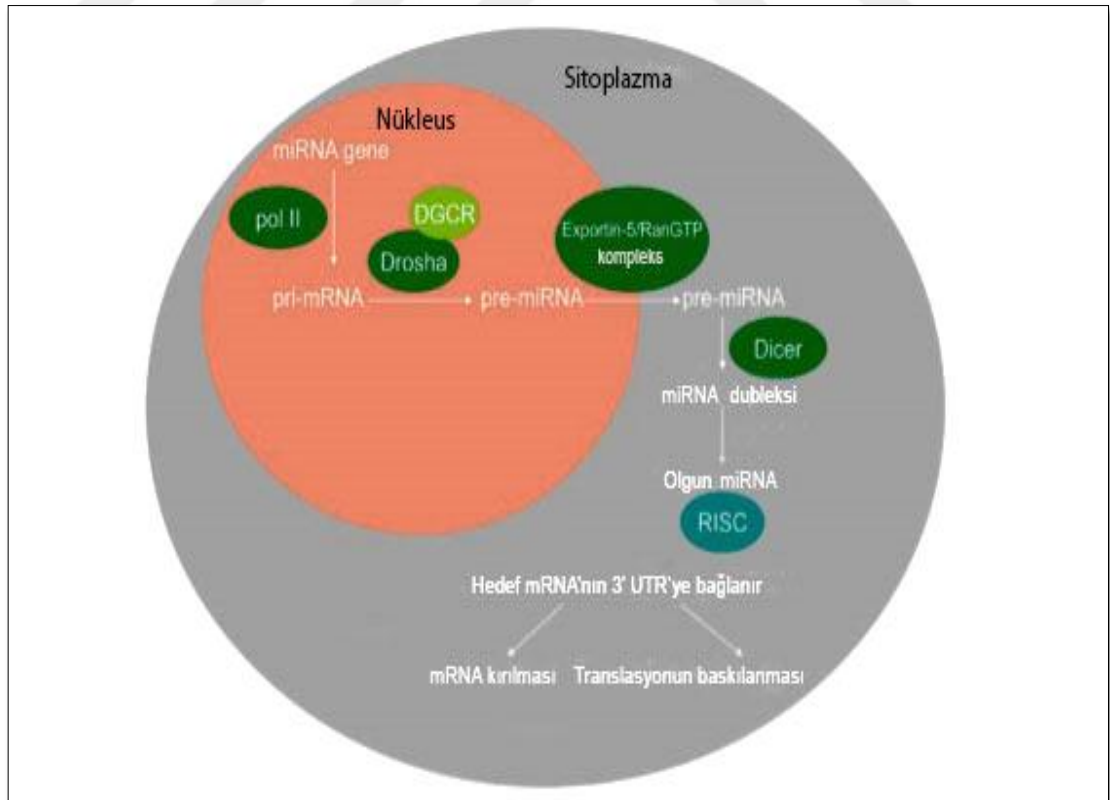
Fzd reseptör sınıfı hücre dışı ilmek 1 ve 2’de korunmuş sistein dizileri içermesi yönünden G protein eşli reseptörlere benzemektedir. Sistein disülfid bağlarının stabilizasyonunda görev almaktadır. Ancak G protein eşli reseptörlerden farklı olarak diğer domainleri bulundurmamaktadır (88).

1.7. mikroRNA Nedir?

MikroRNA’lar (miRNA’lar) yaklaşık 23 nükleotid içeren kodlanmayan RNA moleküllerinin bir sınıfı olup, hedef mRNA’ların 3’-transle edilmeyen bölgeleriyle (3’-UTR) doğrudan etkileşime girerek gen ekspresyonunu negatif olarak düzenlemektedir (94). Lee ve arkadaşları (95) tarafından 1993 yılında tanımlandıktan sonra miRNA’lar, gen ifadesinin düzenlenmesi için yeni mekanizmaların açığa çıkmasını sağlamıştır. miRNA’lar, hücre büyümesi ve hücre döngüsü kontrolü, apoptozdan kaçış, invazyon ve metastaz, anjiogenez gibi tüm kanser özelliklerinde etkili olan bir kilit düzenleyicidir (96). miRNA oluşum aşamaları:

- Çoğu miRNA, kodlayıcı veya kodlamayan genlerin ya intergenik ya da intronik bölgelerden üretilir (97, 98).

- Başlıca uzun primer miRNA (pri-miRNA) kopyalarının kaplanmış, eklenmiş ve poliadenilasyona uğramış parçası olarak RNA polimeraz II (pol II) tarafından transkribe edilirler (99, 100).
- Nükleusta pri-miRNA olgunlaşmasının ilk adımı RNase III enzimi Drosha ve kofaktörü DGCR8 ile gerçekleştirilir. Bu adımda prekürsör miRNA (pre-miRNA) üretilir (101, 102).
- Pre-miRNA daha sonra Exportin-5/RanGTP kompleksi tarafından sitoplazma gönderilerek çift iplikli miRNA üretmek üzere Dicer tarafından uzaklaştırılır (103, 104).
- Sonra helikaz, miRNA dubleksini çift iplikleri çözerek olgun miRNA oluşturur (105).
- Olgun miRNA'lar, RNA kaynaklı sessizleştirme kompleksine (RISC) dahil edilir ve spesifik hedef mRNA'larının tamamlayıcı 3'-UTR'sine bağlanır.
- Bu işlem, mRNA'nın translasyonunu engeller veya parçalanmayı artırır ve transkripsiyon sonrası gen sessizleşmesine yol açar (106; 107). Bu süreç Şekil 6'da verilmiştir (67).

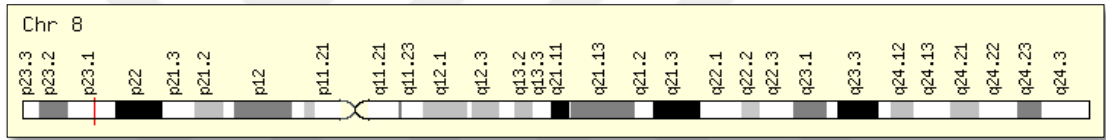


Şekil 6. miRNA oluşum aşamaları

1.8. miRNA-124

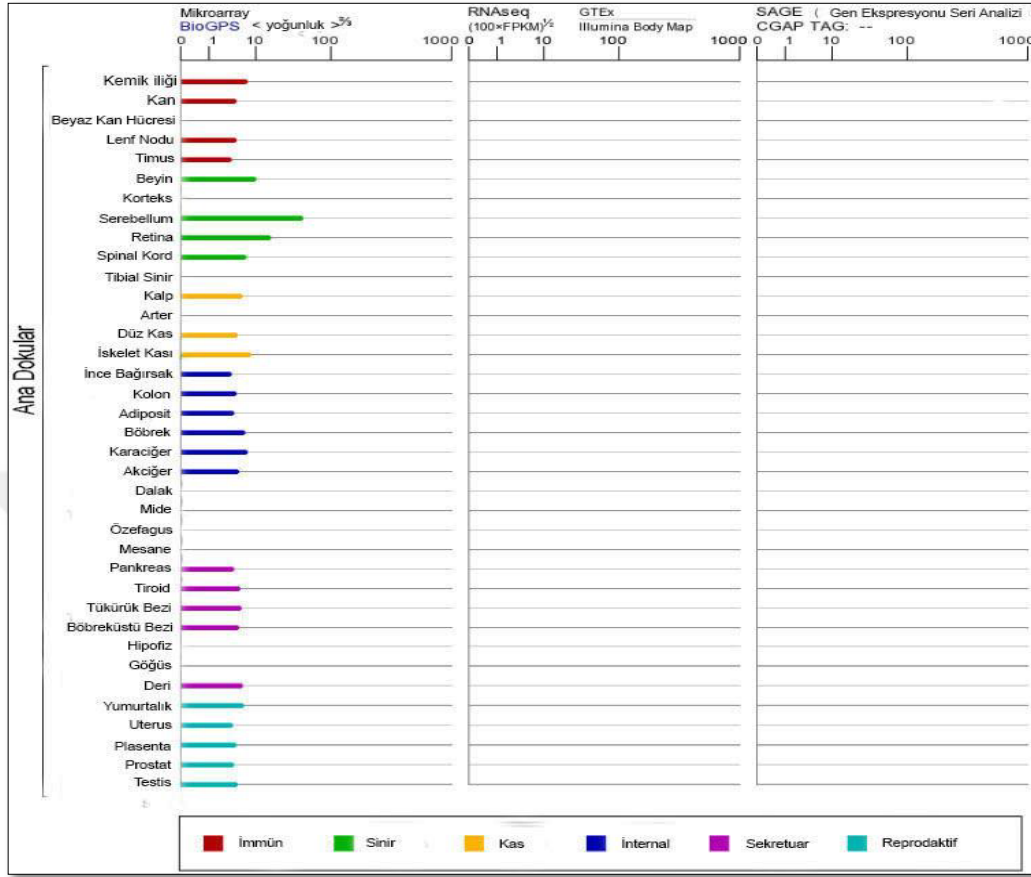
Küçük kodlanmayan RNA'lerden miR-124 nöronal hücrelerde fonksiyonu ilk kez Makeyev ve arkadaşları tarafından 2007 yılında bildirilmiştir (108). Sonraki çalışmalarda ise miR-124'ün çeşitli kanser tiplerinde azaldığı bildirilmiştir (109; 110). Siklin bağımlı kinaz 6 gibi proliferasyon ilişkili genleri düzenlediği için tümör supresör bir gen olarak tanımlanmıştır (111).

Kromozom 8'de yer alan miR-124 geni (Şekil 7) (112), 'AGGCCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAAUGUCCAUA CAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGAAUGGGGCUG' sap ilmik (stem loop) yapıya sahip miR-124-1 kodlamaktadır (113).



Şekil 7. Kromozom 8

İnsan normal dokularında miR-124-1 geninin ekspresyonu Şekil 8’de verilmiştir (112).



Şekil 8. İnsan normal dokularında miR-124-1 geni mRNA ekspresyonu

Siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4)'ü doğrudan hedef alan miR-124'ün ekspresyonu özafagus kanserinde azalmaktadır. Hücre döngüsünde Retinoblastoma proteini (Rb)'ni fosforile ederek inaktive eden CDK4, miR-124 artışında bloke olur ve bu sayede kanser hücresinde apoptoz artışı gözlenebilir (114). Benzer şekilde etkiyle miR-124, meme kanserinde kanser hücrelerinin yaşama, yayılma ve hücre döngülerini kontrol altına almaktadır (115). Hücre büyümesi, yaşamı, apoptozu ve farklılaşması süreçlerinde önemli rolü olan Notch yolağında miR-124 “jagged1” (JAG1) ligantının mRNA'sının 3'UTR bölgesini doğrudan hedef aldığından mide kanseriyle de ilişkilendirilmiştir (116). Hepatoselüler karsinomada da STAT3 (Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3)'ün 3'UTR bölgesine bağlanan miR-124'ün hedef alınmasıyla tümör büyümesinin baskılandığı bulunmuştur (117). miR-124 ve STAT3'ün glioblastoma U87 ve U251 hücre hattında çalışıldığı bir araştırmada; miR-124'ün glioblastoma dokularında ve hücre hatlarında azaldığı ancak STAT3'ün arttığı

bulunmuştur. miR-124'ün U87 ve U251 hücre hattının proliferasyonunda supresör etkili olduğu ve apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (118). Lusiferaz deneyi ile miR-124'ün STAT3 3'UTR bölgesine bağlanarak ekspresyonunu inhibe ettiğini doğrulamışlardır. miR-124 inhibitörünün ise STAT3 ekspresyonunu ve hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilerek, glioblastomada miR-124/STAT3 yolağının terapötik açıdan potansiyel rolüne değinilmiştir (118). miR-124'ün STAT3'ü direkt olarak hedef aldığı başka bir araştırmada da ortaya konmuştur. Ülseratif kolit hastalarında miR-124 seviyeleri düşerken STAT3 fosforilasyon seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Aynı zıt ilişki deneysel kolit olan farelerde de gözlenmiştir (119).

Araştırmacılar, miR-124'ün kanser hücre hiperplazisi, kolorektal kanser metastazı ve progresyonu ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. miR-124'ün ROCK1 protein ekspresyonunu azalttığı ve bu sebeple bunun kolorektal kanser tedavisinde yeni efektif bir terapötik strateji olabileceği fikrini öne sürmüşlerdir (120). Kolorektal kanserde miR-124 seviyelerinin belirgin biçimde düştüğü, PRPS1 ve RPIA seviyelerinin ise arttığı ve bunun sağ-kalım oranını azalttığı belirtilmiştir. miR-124, DNA sentezini ve pentoz fosfat yolu enzimleri seviyelerini düşürerek proliferasyonu inhibe etmektedir. miR-124'ün sağ-kalım süresi ile ilişkili olması prognozda kullanılabileceği fikrini akla getirmektedir (121).

Protein fosfataz 1, düzenleyici alt unit 13 benzeri PPP1R13L, yani iASPP prostat kanseri doku ve hücre hatlarında yüksek seviyede eksprese olduğu bulunmuştur. miR-124 doğal baz çifti olarak iASPP ile eşleşmektedir ve iASPP'ı 3'UTR bölgesinden bağlayarak mRNA ekspresyonunu baskılamaktadır (122).

Long ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada; miR-124'ün RHK hücrelerinde P- glikoproteini indükleyen sinyal yolağındaki rolü gösterilmiştir. Doksorubisin (DOX) ve vinblastin (VBL) dirençli Caki-2 hücrelerinde, azalmış miR-124 ile artmış Fzd5 ve P-glikoprotein seviyelerini bulmuşlardır. miR-124'ün, Fzd5 siRNA'sı taklit ederek Caki-2/DOX hücrelerini apoptoza yönelttiği bulunmuştur. Fzd5 hedefli miR-124 ve Fzd5 siRNA kullanımı Caki-2/DOX hücrelerinde P-glikoprotein seviyelerinde inhibitör etki göstermiştir. Fzd5/protein kinaz C (PKC) sinyalinin P-glikoprotein ve kanser hücre sağ-kalımı yüksekliğinden sorumlu olduğu ve miR-124 fonksiyonu ile bunun önlenebileceği ileri sürülmüştür (9).

Kanser, farklı organ ve dokularda farklı şekillerde oluşabildiği gibi aynı dokuya ait alt tip tümörlerde bile moleküler değişiklikler gözlenebilir. Tek bir teoriyle açıklanamayacak kanserin; metastazı, prognozu ve tedavisi ayrı ayrı ele alınması gereken konulardır. Renal hücreli karsinomun geç farkedilmesi ve ciddi malign özelliğinin yanısıra tedaviye dirençli olması, araştırmacıları erken belirteç yöntemlerinin ve yeni tedavi stratejilerinin araştırmasına teşvik etmiştir. Kanser yolakları ve görevli moleküller bu alanda en sık araştırılan konulardır. Wnt sinyal yolağı da onkogeneizde araştırılmış ve frizzled proteinleri üzerinden potansiyel tedavi olanakları ileri sürülmüştür. Son yıllarda artan mikroRNA çalışmaları da kanser başta olmak üzere birçok hastalıkta araştırılan yeni nesil dizileme yöntemlerinde sıkça rastladığımız güncel konulardan biridir. Çalışmamızda RHK ve RHK olmayan dokulardan miR-124'ün ekspresyon analizinin yapılarak, RHK'da miR-124'ün etkisinin aydınlatılması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Renal Hücreli Karsinom Dokularının Toplanması

‘MTHFR C677T ve A1298C gen varyasyonlarının böbrek kanseri oluşumuna etkilerinin incelenmesi’ başlıklı proje kapsamında elde edilmiş dokuların çalışmaya dâhil edilmesi amacıyla düzenlemiş olduğumuz tez araştırma projesi etik kurul başvurusu için İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’na başvurularak onay alındı. Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesinde böbrek kanseri tanısı konmuş hastalardan tedavi amacıyla yapılmış olan cerrahi girişimlerle elde edilen tümör ve tümör olmayan doku örnekleri -80°C’da saklandı ve bu örneklerden total RNA izolasyonu yapıldı. Çalışmaya renal hücreli karsinom tanısı kesinleşen 30 hasta dâhil edildi. Çalışmada aynı hastalara ait sağlıklı çevre böbrek dokusu ile renal hücreli karsinom dokuları, sırasıyla kontrol ve hasta grubunu oluşturdu.

2.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Kimyasallar

- Etil alkol (Merc)
- Hidroklorik asit (Sigma, H1758)
- Hidrojen peroksit (Sigma, 349887)
- İzopropanol (Sigma, 19516)
- Lysis Reagent (QIAzol)
- Kloroform (Sigma)

Kitler

- hsa-mir-124 RT-PCR Detection Kit (Cohesion Bioscience Limited, London, UK)
- U6 Calibration Kit (Cohesion Bioscience Limited, London, UK)

Cihazlar

- Buzdolabı + 4 °C ve -20 °C (Forma Scientific)
- Derin dondurucu -80°C (Heraeus Sepatech)
- Distile su cihazı (Millipore)
- Etüv (Heraeus) (Nüve)
- Güç kaynağı (Stratagene)
- CFX Connect Real Time System (RT-PCR cihazı) (BioRad)
- Masaüstü mini santrifüj (Eppendorf) (Hettich)
- Otomatik pipetler (Gilson) (Eppendorf)(Thermo)
- T100 Thermal Cycler (PCR cihazı) (BioRad)
- Soğutmalı santrifüj (Heraeus)
- Spektrofotometre (NanoDrop 2000)
- CCD kamera (Bilgisayar donanımı Bio Rad)
- Laminar Flow kabin (Hepa filtreli) (Thermo, Scientific)

2.3. Total RNA İzolasyonu

Renal hücreli karsinom patalojisine sahip örnekler ile sağlıklı çevre dokusu örneklerinden ~30mg'lık kesit kullanılarak “QIAGEN lysis agent” trizol aracılığı ile total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu aşamasının basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

1. Aşama Homojenizasyon:

- Dokular steril ortamda bisturiyle parçalanarak 1ml Trizol içinde vortekslendi.

2. Aşama Faz Ayırması:

- Homojenize olan örnekler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Bekleme süresi dolduktan sonra örneklerin üzerine 200µl kloroform eklendi ve örnekler 15 saniye kadar vortekslenerek oda sıcaklığında 10-15 dakika kadar beklemeye alındı.
- Örnekler +4°C'de 11.000X g 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant (aköz kısım) kısım başka tüpe aktarıldı.

3. Aşama RNA çökmesi:

- Ayrı tüpe aktarılmış olan süpernatantın üstüne 500µl isopropanol eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 10 dakika beklemeye bırakıldı.
- Bekleme süresi dolduktan sonra +4°C, 12.000X g'de 10 dakika santrifüj yapıldı.

4. Aşama RNA yıkaması:

- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 1ml %75'lik etanol (soğutulmuş) eklenip pipetaj yapıldı ve +4°C, 12.000X g'de, 5 dakika santrifüj yapıldı.
- RNA bu aşamada beyaz pellet şeklinde görünür halde elde edildi.

5. Aşama RNA çözme:

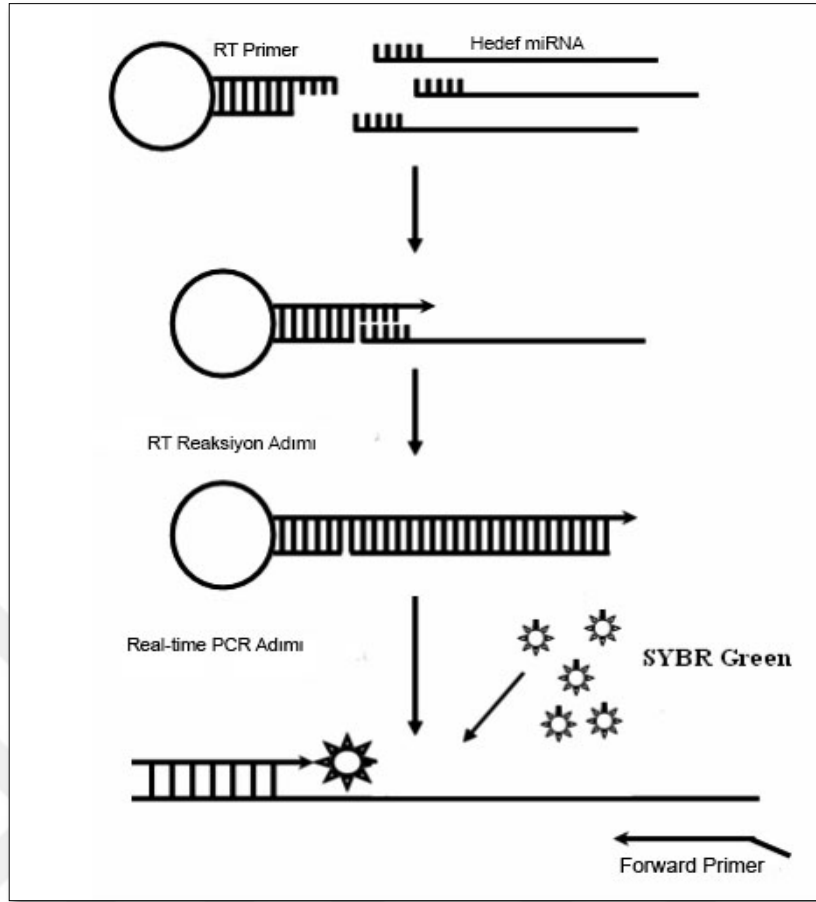
- Süpernatant kısım dikkatli bir şekilde tüpten uzaklaştırıldıktan sonra kalan alkolün uzaklaşması için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

- Bekleme süresi dolduktan sonra pellet 50µl “Rnase free” distile su içinde çözülerek total RNA izolasyon işlemi tamamlandı.

Total RNA izolasyonu takiben, örneklerin RNA kalite ve miktarları nanodrop cihazı ile ölçülerek kaydedildi.

2.4. mikroRNA Analizi

Total RNA’dan miR-124 ve U6 analizi Cohesion Bioscience’a ait ‘hsa-mir-124 Real-time RT-PCR Detection and U6 Calibration Kit’ ile yapıldı. mikroRNA analizi iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci adım stem-loop RT adı verilen primerlerin mikroRNA moleküllerinin 3’ kısımdan bağlanarak reverse transkriptaz (RT) enzimi ile RNA’dan cDNA üretimi aşamasıdır. İkinci adımda ise üretilen reverse transkriptaz ürününün, miRNA spesifik forward ve reverse primerin ve SYBR Green boyasının kullanılarak gerçek zamanlı (real-time, RT) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile ölçüldüğü aşamadır. mikroRNA analiz aşamasının prensipleri şekil 9’da gösterilmiştir (123).



Şekil 9. mikroRNA analizi prensibinin şematik gösterimi

mikroRNA analizi için kit prosedürüne uygun olarak aşağıdaki aşamalar gerçekleştirildi:

1. İlk olarak 1nM miRNA standart solüsyonu ve 0.1 nM çalışma konsantrasyon solüsyonu hazırlanarak -20 °C’da saklandı.
2. miRNA RT primerleri 1 µM çalışma konsantrasyonlarına seyreltildi ve -20 °C’da saklandı.
3. Total RNA kullanımı kit prosedürüne uygun olduğu için mikroRNA izolasyonu yapılmadı ve elde edilen total RNA'lar 100 ng olacak şekilde sulandırılarak standardize edildi.
4. Reverse Transkriptaz reaksiyon karışımı Tablo 2’de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 2: Reverse Transkriptaz reaksiyon bileşenleri

Reverse Transkriptaz malzemeleri	Final Konsantrasyonu	Hacim (µl) /1 reaksiyon
5x RT Master Mix	1X	4
dNTP (1nM)	0,375 mM	0,75
miR-RT Primerler (1 µM)	60nM	1,2
MMLV Reverse Transkriptaz (200 U/ µl)	40U	0,2
Total RNA	1-3 µg	2
RNAaz free distile su		11,85
Toplam		20 (µl)

5. Reverse Transkriptaz reaksiyon karışımı Tablo 3'teki protokole uygun olarak termal döngü PZR cihazında çalışıldı.

Tablo 3: Reverse Transkriptaz reaksiyon protokolü

Reverse Transkriptaz karışımı	Derece	Süre
	25°C	30 dakika
	42°C	30 dakika
	85°C	5 dakika
	4°C	∞

6. Reverse Transkriptaz (RT) ürünleri gerçek zamanlı (real-time) PZR çalışmaları yapılana kadar -20 °C'da saklandı.

7. RT ürünlerini gerçek zamanlı PZR'de çalışmak için hazırlanan karışım kite uygun olarak Tablo 4'te gösterildiği gibi hazırlandı.

Tablo 4: Gerçek zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon malzemeleri	Final Konsantrasyonu	Hacim (µl) /1 reaksiyon
2x RT-PZR Master Mix	1X	10
miR spesifik Primer seti (10 µM)	0,2 µM	0,4
ROX referans boyası	1X veya 5X	0,4
PZR enhancer	0/ % 2,5 / % 5	1,5
Taq DNA Polimeraz (5U/µl)	1 U	0,2
RNAaz free distile su		5,5
miRNA RT ürünü		2
Toplam		20 (µl)

8. Hazırlanan gerçek zamanlı PCR karışımı Tablo 5’te yer alan protokole göre BioRad RT-PZR sistemlerinde çalışıldı. Her örnek için ekspresyon sonuçları dublike edilerek analizde ortalama Ct değerleri kullanıldı.

Tablo 5: Gerçek zamanlı PZR protokolü

	Derece	Süre	Döngü Sayısı
RT-PZR karışımı	95°C	3 dakika	1
	95°C	12 saniye	40
	62°C	40 saniye	

Çalışmanın standardizasyonu ve mikroRNA kontrolü için sentetik miRNA standartları kullanıldı. Bunun için aşağıdaki adımlar izlendi:

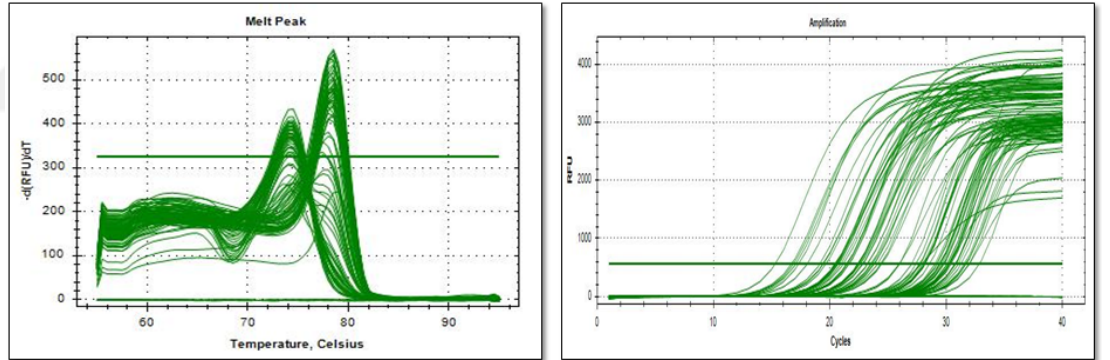
1. 1ml RNA dilüsyon tamponu sentetik miRNA standartlarına eklenerek 1nM stok olacak şekilde seyreltilti. 1,5 ml ependorf tüpünde 1nM miRNA standart solüsyonu 0,1 nM çalışma konsantrasyonuna seyreltilti ve -70 °C’da saklandı.

2. Çalışma zamanında 0,1 nM mikroRNA standart solüsyonu 5-7 arasında tüpe sırayla RNase free su ile dilüsyona uğratıldı.

3. 2 µl RNA örneği 20 µl RT reaksiyon karışımı da her tüpe eklendi.

4. Standart eğri için 2 µl 0,1 nM sentetik miRNA örneği de 20 µl RT reaksiyon örneklerine eklendi ve her reaksiyonda 6×10^7 kopya oluşturuldu.

Gerçek zamanlı PCR sonucunda elde edilen miR-124 erime ve amplifikasyon eğrileri grafiği Şekil 10’da verilmiştir.



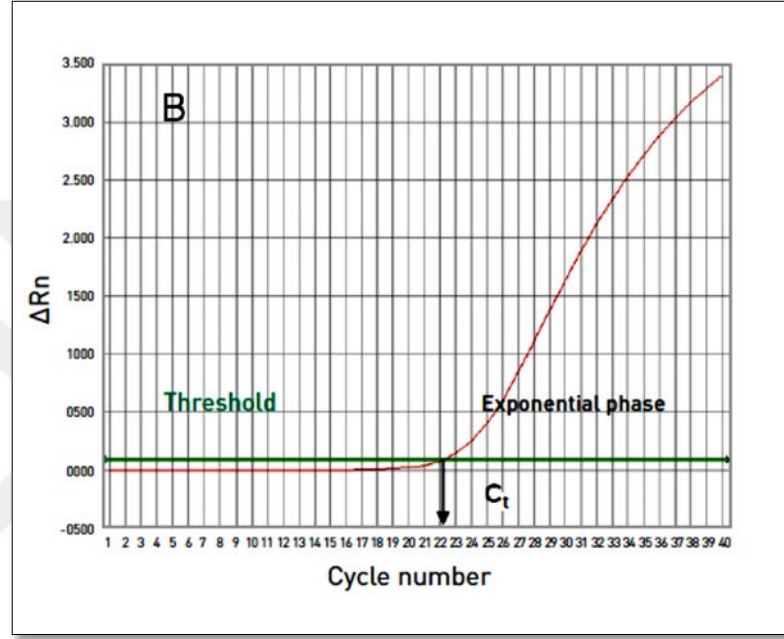
Şekil 10. miR-124 erime ve amplifikasyon eğrisi grafiği

2.4.1. miR-124 ekspresyon analizinin hesaplanması

miR-124 ekspresyon seviyeleri $\Delta\Delta CT$ metoduna göre hesaplanmıştır. Applied Biosystems, Foster City, California 94404, USA’den Livak KJ ve Schmittgen TD’ nin 2001 yılında yayınladıkları çalışmada yer alan yöntemle göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ şeklinde hesaplandı. ‘-’ şeklinde hesaplama yapılmasının sebebi aşağıda yer alan denklemin kurularak hesaplama yapılmış olmasıdır (124).

$$\Delta\Delta CT = (CT(\text{target}, \text{treated}) - CT(\text{ref}, \text{treated})) - (CT(\text{target}, \text{untreated}) - CT(\text{ref}, \text{untreated}))$$

Buna göre çalışmada hedeflenen miR-124 için uygun referans (housekeeping) gen U6 seçildi. Tümör ve normal çevre dokular için hem miR-124 hem U6 ekspresyon analizleri gerçek zamanlı PZR ile ölçüldü. Şekil 11’de verilen görselde R_n ; floresan sinyaline normalize edilen raportör sinyalidir ve C_t (threshold cycle); amplifikasyon eğrisi ile eşik çizgisi arasındaki kesişimi ifade etmektedir (Şekil 11) (125).



Şekil 11. C_t örneği

Her bir örnek için aşağıdaki şekilde hesaplama yapıldı.

- **Hasta C_t miR-124:** Hastaya ait tümörden miR-124 ekspresyonu için elde edilen C_t değerini,
- **Hasta C_t U6:** Hastaya ait tümörden referans gen ekspresyonu için elde edilen C_t değerini,
- **Kontrol C_t miR-124:** Hastaya ait tümör çevresi sağlıklı dokudan miR-124 ekspresyonu için elde edilen C_t değerini,
- **Kontrol C_t U6:** Hastaya ait tümör çevresi sağlıklı dokudan referans gen ekspresyonu için elde edilen C_t değerini ifade etmektedir.

$$\begin{aligned}\Delta\text{CT miR-124 Hasta:}& \text{ Hasta Ct miR-124 - Hasta Ct U6} \\ \Delta\text{CT miR-124 Kontrol:}& \text{ Kontrol Ct miR-124- Kontrol Ct U6} \\ \Delta\Delta\text{CT:}& \Delta\text{CT miR-124 Hasta - } \Delta\text{CT miR-124 Kontrol} \\ & 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}\end{aligned}$$

ΔCT , $\Delta\Delta\text{CT}$, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ değerleri ile deney ve kontrol arasındaki anlatım kat değişimini ve p değerini bulunmaktadır. Kat değişimi $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ve p değeri $2^{-\Delta\text{CT}}$ ile hesaplanmaktadır (126).

2.5. İstatistiksel Hesaplamalar

İstatistiksel analizler için SPSS 22 paket programı kullanıldı. Öncelikle kontrol ve hasta grubunun ekspresyon seviyelerinin normal dağılıp dağılmadığı belirlemek amacıyla Skewness ve Kurtosis ile veri setinin dağılımı tespit edildi. Normal dağılım göstermediği belirlenen verilerin analizi için Spearman's rho ve Wilcoxon rank sum test kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edildi ve $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışmada 30 hastadan alınan toplam 60 örnek tümör ve kontrol olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tümör grubu, tedavi amacıyla yapılan cerrahi operasyon sonucu ‘Renal Hücreli Karsinom’ patolojisi konmuş 30 adet tümör dokusu, kontrol grubu ise aynı hastaların 30 adet sağlıklı böbrek dokusundan oluşturuldu. Hastalardan alınan doku örnekleri sıvı azotla donduruldu ve çalışmanın gerçekleştiği güne kadar -80 °C’da muhafaza edildi. Total RNA izolasyonunu takiben yapılan gerçek zamanlı PZR ile olgun miR-124 anlatım analizleri incelenerek tümör ve kontrol grubunda yer alan örneklerin ekspresyon farkı analiz edildi.

3.1. Çalışma Gruplarının Demografik ve Klinik Özellikleri

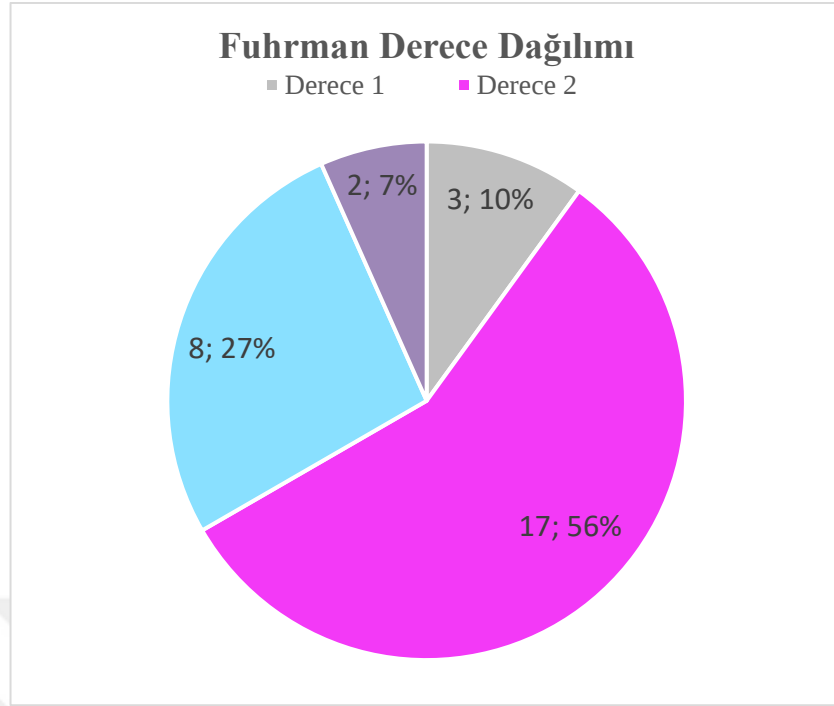
Çalışmaya dahil edilen hastaların yaşı $58,70 \pm 10,26$ iken boy, kilo ve vücut kitle indeksi (VKİ) değerleri sırasıyla; $172,17 \pm 5,62$, $81,03 \pm 7,69$, $27,52 \pm 2,967$ bulundu. Hastalara ait verilerin değerleri Tablo 6’da ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Tablo 6. Hastaların karakteristik özellikleri

Parametre	Ortalama	Minimum	Maksimum
Yaş	58,70±10,26	39	83
Boy	172,17±5,62	163	185
Kilo	81,03±7,69	60	100
VKİ	27,52±2,967	20,80	36,70
Bel çevresi	104,50±6,29	95	117
Total kolesterol	196,10±35,35	139	257
Trigliserid	159,07±36,20	98	225
HDL	43,40±3,14	36	49
LDL	125,10±25,980	68	172
Nötrofil	5,0670±1,0462	3,14	6,82
Lenfosit	1,6427±0,1837	1,32	1,99

VKİ: Vücut kitle indeksi, HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein, LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein.

Renal Hücreli Karsinom patolojisine sahip hastalardan alınan tümörlerin ortalama çapı $6,05 \pm 2,83$ cm olarak bulundu. Hastalara ait minimum tümör çapı 2,5 cm iken maksimum tümör çapı 13 cm idi. Örneklerden 15 tümörün çapı 5 cm'den küçük, 13 tümörün çapı 5 ile 10 cm arasında, 2 tümörün çapı 10 cm'den büyüktü. Tümörlerin Fuhrman derece seviyeleri Şekil 12'de gösterilmektedir. Tablo 7'de hastaların tümör ve patolojilerine dair veriler yer almaktadır.



Şekil 12. Fuhrman derecesine göre örneklerin dağılımı

Tablo 7. Hastaların tümör patolojilerine ait genel bilgiler

Örnek	Yaş	Patoloji	Fuhrman	Evre	Tümör Çapı
					(cm)
1	64	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	4
2	60	Renal Hücreli Karsinom	2	T3	10
3	61	Renal Hücreli Karsinom	4	T3	9
4	59	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	4,2
5	58	Renal Hücreli Karsinom	3	T1	4
6	48	Renal Hücreli Karsinom	1	T1	4,5
7	61	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	3
8	73	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	6,8
9	55	Renal Hücreli Karsinom	1	T1	4,7
10	67	Renal Hücreli Karsinom	3	T1	4,5
11	83	Renal Hücreli Karsinom	3	T2	10
12	45	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	3,5
13	65	Renal Hücreli Karsinom	4	T2	8
14	44	Renal Hücreli Karsinom	3	T1	5
15	39	Renal Hücreli Karsinom	3	T2	8,5
16	51	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	2,5
17	58	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	3,5
18	71	Renal Hücreli Karsinom	3	T3	4,5
19	58	Renal Hücreli Karsinom	2	T3	13
20	62	Renal Hücreli Karsinom	3	T1	5,5
21	64	Renal Hücreli Karsinom	3	T2	8
22	55	Renal Hücreli Karsinom	2	T3	8
23	64	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	4
24	56	Renal Hücreli Karsinom	1	T1	6
25	74	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	6
26	59	Renal Hücreli Karsinom	2	T2	11,8
27	49	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	2,5
28	45	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	3
29	70	Renal Hücreli Karsinom	2	T2	9
30	43	Renal Hücreli Karsinom	2	T1	4,5

3.2. miR-124 Ekspresyon Analizi

Tümör ve normal çevre dokular için hem miR-124 hem U6 ekspresyon analizleri gerçek zamanlı PZR ile ölçüldü ve ekspresyon seviyeleri $\Delta\Delta CT$ metoduna göre hesaplandı. 30 tümör ve 30 çevre dokusu karşılaştırıldığında miR-124'ün 28 tümör dokusunda azalmış ekspresyona, 2 tümör dokusunda ise kısmen artmış ekspresyona sahip olduğu görüldü. P değerlerini belirlemek amacıyla kullanılan ΔCT ve $2^{-\Delta CT}$ kontrol ve tümör grubuna ait değerler tablo 8'de yer almaktadır. Tümör ve kontrol grubunun ortalama ΔCT değerleri sırasıyla $9,30 \pm 2,24$ ve $6,73 \pm 1,95$ idi.

Tablo 8. miR-124 için elde edilen ΔCT ve $2^{-\Delta CT}$ değerleri

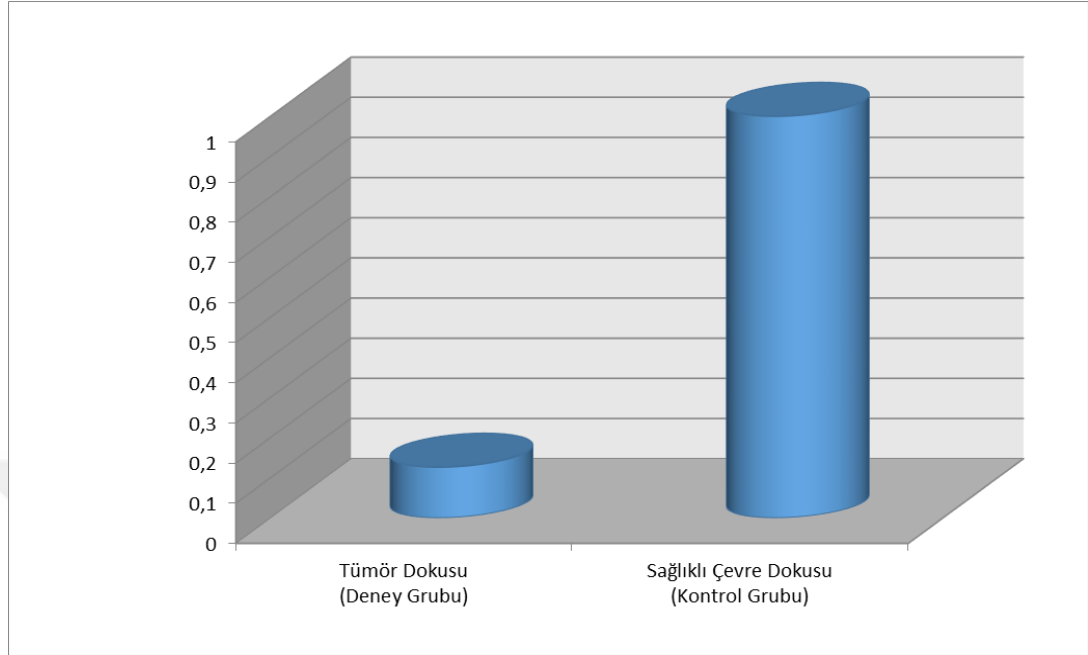
Grup	Sayı	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Maksimum	Minimum
ΔCT Tümör	30	$9,30 \pm 2,24$	14,46	5,67
ΔCT Kontrol	30	$6,73 \pm 1,95$	11,1	1,57
$2^{-\Delta CT}$ Tümör	30	$0,0036 \pm 0,005$	0,0196	0,000044
$2^{-\Delta CT}$ Kontrol	30	$0,0285 \pm 0,068$	0,3368	0,00045

Analizler için ekspresyon seviyelerinin dağılımları incelendiğinde homojen olmadığı görüldü. Bu sebeple non-parametrik bir test olan 'Wilcoxon rank sum test' ile tümör ve kontrol dokuları arasındaki ekspresyon analizi farkı ' ΔCT ' değerleri üzerinden yapıldı ve $Z = -4,453$, $p < 0,001$ olarak bulundu. Kat değişimi olarak bilinen 'fold change' değerleri ise $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplandı ve 0.356 bulundu (Tablo 9).

Tablo 9. miR-124 için elde edilen değerler

	Tümör Dokusu (Deney Grubu)	Sağlıklı Çevre Dokusu (Kontrol Grubu)
ΔCT	$9.30 \pm 2,24$	$6,73 \pm 1,95$
$\Delta\Delta CT$	2.72	
$2^{-\Delta\Delta CT}$	0.356	
p	< 0, 001	

Şekil 13'te miR-124 için elde edilen real-time PZR sonuçlarının tümör ve kontrol $2^{-\Delta CT}$ değerlerine göre karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 13. Tümör ve Kontrol dokularında miR-124 ekspresyonu

Tümör ve kontrol gruplarının $2^{-\Delta CT}$ miR-124 ekspresyon seviyelerine bakıldığında; tümör grubunun ekspresyon seviyeleri vücut kitle indeksi ($p=0.023$, $r=-0.413$), tümör evresi ($p=0.022$, $r=-0.417$), tümör çapı ($p=0.009$, $r=-0.468$) ve nötrofil değerleri ($p=0.023$, $r=-0.415$) ile anlamlı seviyede ve negatif yönde korelasyon gösteriyordu. Yani tümör evresi ve çapı, VKİ ve nötrofil değerleri arttıkça miR-124'ün daha az seviyede eksprese edildiği gözlemlendi. Yaş, boy, kilo, bel çevresi, total kolesterol, trigliserid, HDL, LDL, Fuhrman, Lenfosit ve Visseral adipozite indeksi (VAİ) parametreleri ile miR-124 ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmadı (Tablo 10).

Tablo 10. 2-^ΔCT Tümör ve kontrol gruplarında miR-124 ekspresyonunun hasta parametreleriyle karşılaştırılması

Grup	Yaş	Boy	Kilo	VKİ	Bel Çevresi	Total Kol.	TG	HDL	LDL	Evre	Fuhrman	Tümör Çapı	Nötrofil	Lenfosit	VAI
2- ^Δ CT Tümör	r = -0,136 p = 0,472	r = 0,890 p = 0,316	r = -0,081 p = 0,670	r = -0,413 p = 0,023	r = -0,088 p = 0,642	r = -0,333 p = 0,072	r = -0,171 p = 0,368	r = -0,050 p = 0,793	r = -0,252 p = 0,180	r = -0,417 p = 0,022	r = -0,208 p = 0,270	r = -0,468 p = 0,009	r = -0,415 p = 0,023	r = 0,236 p = 0,210	r = -0,172 p = 0,365
2- ^Δ CT Kontrol	r = -0,092 p = 0,629	r = 0,002 p = 0,991	r = -0,067 p = 0,724	r = -0,061 p = 0,751	r = -0,227 p = 0,228	r = -0,085 p = 0,655	r = 0,090 p = 0,637	r = -0,214 p = 0,257	r = -0,079 p = 0,680	r = 0,163 p = 0,391	r = 0,100 p = 0,601	r = 0,159 p = 0,402	r = 0,710 p = 0,711	r = 0,231 p = 0,219	r = 0,112 p = 0,557

VKİ: Vücut kitle indeksi, TG: Trigliserid, HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein, LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein, VAI: Visseral adipozite indeksi

Tümör evresine göre 3 farklı gruba ayrılan dokularda miR-124 ekspresyonu ile diğer tüm parametreler Spearman's rho testine göre değerlendirildi. T1 evresindeki tümör dokularında miR-124 ekspresyonu total kolesterol ve nötrofil değerleri açısından negatif korelasyona sahip olduğu bulundu (sırasıyla, $r = -0,563$, $p = 0,012$; $r = -0,476$, $p = 0,04$). T2 evresindeki tümör doku örneklerinde miR-124 ekspresyonu ile Fuhrman ($r = -0,926$, $p = 0,008$) ile negatif yönde ve tümör çapı ($r = 0,812$, $p = 0,05$) ile pozitif yönde korelasyon gözlemlendi. T3 evresindeki tümör dokularında miR-124 ekspresyonu ile boy arasında sınırda anlamlı negatif korelasyon bulundu ($r = -0,872$, $p = 0,054$). T3 evresinde sağlıklı kontrol böbrek dokusundaki miR-124 ekspresyonu ile total kolesterol düzeyleri negatif yönde anlamlı iken ($r = -0,900$, $p = 0,037$), T3 evreli hem tümör hem kontrol dokusunda miR-124 ekspresyonunun vücut kitle indeksi ile negatif yönde korelasyon saptandı ($r = -0,900$, $p = 0,037$). Yaş, kilo, bel çevresi, trigliserid, HDL, LDL, Lenfosit ve Visseral adipozite indeksi (VAİ) parametreleri ile tümör evrelerine göre ayrılmış miR-124 ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmadı (Tablo 11).

Tablo 11. Tümör evresine göre miR-124 ekspresyonunun hasta parametreleri ile korelasyonu

	Grup	Yaş	Boy	Kilo	VKİ	Bel Çevresi	Total Kol.	TG	HDL	LDL	Fuhrman	Tümör Çapı	Nötrofil	Lenfosit	VAİ
T1 Evre	2 ^{-ΔCT} Tümör	r = -0,299 p = 0,212	r = 0,355 p = 0,136	r = 0,175 p = 0,474	r = -0,300 p = 0,212	r = 0,230 p = 0,344	r = -0,563 p = 0,012	r = -0,232 p = 0,339	r = 0,004 p = 0,986	r = -0,392 p = 0,097	r = 0,100 p = 0,683	r = -0,447 p = 0,055	r = -0,476 p = 0,040	r = 0,085 p = 0,730	r = -0,208 p = 0,393
	2 ^{-ΔCT} Kontrol	r = -0,179 p = 0,463	r = -0,116 p = 0,636	r = 0,219 p = 0,368	r = 0,233 p = 0,338	r = -0,138 p = 0,573	r = -0,056 p = 0,819	r = 0,108 p = 0,660	r = -0,201 p = 0,410	r = -0,032 p = 0,895	r = 0,094 p = 0,702	r = 0,069 p = 0,780	r = -0,207 p = 0,396	r = 0,276 p = 0,253	r = -0,029 p = 0,906
T2 Evre	2 ^{-ΔCT} Tümör	r = 0,200 p = 0,704	r = 0,771 p = 0,072	r = 0,029 p = 0,957	r = -0,543 p = 0,266	r = -0,029 p = 0,957	r = -0,486 p = 0,329	r = 0,232 p = 0,658	r = -0,741 p = 0,092	r = -0,600 p = 0,208	r = -0,926 p = 0,008	r = 0,812 p = 0,050	r = 0,257 p = 0,623	r = 0,143 p = 0,787	r = 0,257 p = 0,623
	2 ^{-ΔCT} Kontrol	r = 0,086 p = 0,872	r = 0,314 p = 0,544	r = -0,371 p = 0,468	r = -0,429 p = 0,397	r = -0,441 p = 0,381	r = 0,543 p = 0,266	r = 0,116 p = 0,827	r = 0,309 p = 0,552	r = 0,314 p = 0,544	r = 0,123 p = 0,816	r = -0,058 p = 0,913	r = 0,029 p = 0,957	r = -0,086 p = 0,872	r = 0,143 p = 0,787
T3 Evre	2 ^{-ΔCT} Tümör	r = 0,000 p = 1,000	r = -0,872 p = 0,054	r = -0,800 p = 0,104	r = -0,900 p = 0,037	r = 0,667 p = 0,219	r = -0,500 p = 0,391	r = 0,500 p = 0,391	r = -0,300 p = 0,624	r = -0,700 p = 0,188	r = -0,224 p = 0,718	r = -0,600 p = 0,285	r = -0,100 p = 0,873	r = -0,112 p = 0,858	r = 0,500 p = 0,391
	2 ^{-ΔCT} Kontrol	r = -0,200 p = 0,747	r = 0,564 p = 0,322	r = -0,800 p = 0,104	r = -0,900 p = 0,037	r = 0,051 p = 0,935	r = -0,900 p = 0,037	r = -0,200 p = 0,747	r = -0,300 p = 0,624	r = -0,800 p = 0,104	r = -0,447 p = 0,450	r = 0,100 p = 0,873	r = 0,400 p = 0,505	r = 0,224 p = 0,718	r = -0,100 p = 0,873

VKİ: Vücut kitle indeksi, TG: Triglicerid, HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein, LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein, VAİ: Visseral adipozite indeksi

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Renal hücreli karsinom (RHK) biyolojisinin anlaşılmasında kaydedilen son gelişmelere, başarılı cerrahi girişimlere ve yeni hedeflenmiş tedavilerin uygulanmasına rağmen, RHK hastalarının prognozu kötü seyretmeye devam etmektedir. RHK'nın dört ana histolojik alt tipini oluşturan vakaların, %75'i berrak hücre RHK (bhRHK), %12'si papiller RHK (pRHK), %8 oranında rastlanılan kromofobik RHK (kRHK) (%4) ile onkositomları (%4) ve %5'i ise nadir alt türlerden oluşmaktadır (127). RHK için cerrahi rezeksiyon en iyi tedavi yaklaşımı olmasına rağmen, operasyon sonrası hastaların yaklaşık %20-30'unda tümör oluşumu tekrar etmektedir (128). Hastaların % 30'unun ilk teşhisinde metastaz görülmektedir (129). Bununla birlikte RHK, kemoterapi ve radyasyon dahil olmak üzere konvansiyonel terapötik yöntemlere karşı oldukça dirençli bir fenotipe sahiptir (130, 131).

Onkoloji alanında yapılan çalışmalarda hastalığın erken teşhisi ya da tümörün malign olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan moleküler araştırmalardan bazıları mikroRNA'lar üzerine yoğunlaşmaktadır (94). Yaklaşık 22 nükleotid dizisi içeren kodlanmayan RNA sınıfında yer alan mikroRNA'lar hedefleri olan mRNA'lara bağlanmak suretiyle gen ekspresyonunu düzenleme özelliğine sahiptirler (94). Onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak hareket eden mikroRNA'lar; proliferasyon, hücre göçü ya da invazyon gibi süreçleri etkilemeleri sebebiyle renal hücreli karsinom patofizyolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir (67). Redova ve arkadaşları, RHK hasta serumlarında artmış miR-378 ve azalmış miR-451 ekspresyon seviyelerini bildirmişlerdir (68). Silva Santos ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; RHK tümörlü dokularda sağlıklı dokuya kıyasla özellikle miR-21, miR-141 ve miR-200b ekspresyon seviyelerinin azaldığını bulmuşlardır (71). Yeni nesil biyolojik belirteç görevi görebileceği düşünülen miRNA sonuçlarının onaylanması ve rutin klinik kullanım doğrulanması amacıyla daha çok araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (77).

Kemoterapiye direnç ve mikroRNA ilişkisinin değerlendirildiği bir araştırmada; doksorubisin (DOX) ve vinblastin (VBL) dirençli Caki-2 hücrelerinde

artmış Fzd5, P-glikoprotein seviyeleri ile azalmış miR-124 ekspresyon seviyeleri bulunmuştur. miR-124 mimetikleri ile Caki-2/DOX hücreleri muamele edildiğinde hücrelerin apoptoza yöneldiği bulunmuştur (9). Çoklu ilaç direnci ile alakalı P-glikoprotein ekspresyonunun, renal kanserde kritik rollere sahip Fzd5 hedefli miR-124 ve Fzd5 siRNA kullanımıyla inhibe ettiği gösterilmiştir. FZD5/protein kinaz C (PKC) sinyalinin P-glikoprotein ve artmış kanser hücre sağ kalımından sorumlu olduğu ve miR-124 fonksiyonu ile bunun önlenebileceği ileri sürülmüştür (9). Berrak hücreli RHK ve normal böbrek dokularının çalışıldığı bir araştırmada; miR-124-3p'nin hücre döngüsünün S fazında azaldığı bildirilmiş ve bHRHK agresif/metastatik davranışına katkıda bulunduğu vurgulanmıştır (132). Gebauer ve arkadaşları tarafından berrak hücreli RHK'da miR-124-3p'nin tümör spesifik hipermetilasyonu bulunmuş ve bağımsız bir prognostikör olarak önerilmiştir (133).

Literatürde renal sistem ile miR-124 ilişkisinin kurulduğu çalışmalardan birinde mikroRNA'ların hipertansiyona etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada renal su ve tuz dengesi regülasyonunda rol alan mineralokortikoid reseptör geni, Nükleer reseptör alt ailesi 3, grup C, üye 2 (NR3C2)'yi hedef alan mikroRNA'lar incelenmiştir. miR-124 ve miR-135a'nın NR3C2 3'UTR raportör yapı aktivitesini sırasıyla 1,5 ve 2,2 kat baskıladığı bildirilmiştir (134). miR-124 ve miR-135a'nın renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminde etkili olduğu ve böylece kan basıncının düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (134). Hipoksinin renal epitelyal hücrelerde artmış matriks metalloproteinaz 2 (MMP2) ekspresyonu ile ilişkili olarak mezenkimal ve migratör fenotipe neden olduğu bulunmuştur. Hipoksi-bağımlı artmış MMP2 ekspresyonu azalmış miR-124 transkripsiyonu ile düzenlendiği ve miR-124 aşırı ekspresyonunun hipoksiyle uyarılan hücre göçünü önlediği bildirilmiştir (135).

miR-124'ün sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3)'ün 3'transle edilmeyen bölgesine (3'-UTR) direkt bağlanarak kolorektal kanser hücrelerinde apoptotik süreci aktive ettiği in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir. Çalışmada kolorektal kanser dokularında da miR-124 ekspresyon seviyesi anlamlı derecede düşük bulunmuştur (136). Zhang ve arkadaşları benzer şekilde kolorektal kanser dokuları ve kolorektal kanser hücre hatlarında (SW480, SW620 and LOVO) miR-124 ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde düşük bulmuşlardır. Aynı zamanda

miR-124'ün in vivo ve in vitro insan kolorektal hücrelerinde radyosensitiviteyi arttırdığı ve terapötik bir ajan olabileceği vurgulanmıştır (137).

Zhang ve arkadaşları ovaryum kanserinde ve hücre hatlarında miR-124 ekspresyonunu düşük seviyede bulmuşlardır. miR-124'ün epitalyal ovaryum kanserinde migrasyon ve invazyonun düzenlenmesinde potansiyel yeni bir tedavi uygulaması olabileceğini ileri sürmüşlerdir (138). Başka bir çalışmada miR-124'ün servikal kanser HeLa ve C33A hücrelerinde vaskülojenik taklitin, migrasyon ve invazyonun baskıladığı gösterilmiş ve miR-124'ün servikal kanserde metastazı önlemede önemli olabileceği vurgulanmıştır (139). miR-124 gen ekspresyonunun pankreas (140) ve prostat kanser (141) dokusunda da azaldığı gösterilmiştir.

Mide kanser dokularında miR-124 ekspresyonunu araştıran Hu ve arkadaşları, miR-124'ün mide kanserinde ekspresyon seviyesinin azaldığı göstermişlerdir (142). Mide kanserinde miR-124'ün Zeste homolog 2 arttırıcıyı (EZH₂) hedef alarak hücre büyümesini baskıladığı ve 5-fluorourasil (5-FU) tedavisine duyarlılık sağladığı bildirilmiştir (143).

Hepatoselüler karsinoma HepG2 hücrelerinde miR-124'ün fosfoinositid 3 kinaz katalitik altünit alfa (PIK3CA)' yı hedeflediği rapor edilmiştir. miR-124 aşırı eksprese edildiğinde PIK3CA'nın hem mRNA hem de protein seviyelerinin düştüğü ve hücre çoğalmasını G1 fazında durdurduğunu in vitro olarak gösterilmiştir (144).

Nazofaringiyal karsinomada in vitro ve in vivo olarak miR-124'ün tümöröenez üzerine etkilerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada ise; 7 NFK hücre hattında (5-8 F, 6-10B, CNE1, CNE2, HONE-1, C666-1 ve Sune-1) miR-124 seviyesi düşük bulunmuştur. Bu çalışmada tümör I evresinde miR-124 ekspresyon seviyesi, tümör evresi II-IV'e göre daha yüksek bulunmuştur ve tümör evreleri ile miR-124 ekspresyonunun negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (145). Nazofaringiyal karsinomada uzak doku metastazıyla yakın doku metastazı karşılaştırıldığında; miR-124 ekspresyonu uzak metastaz yapan tümörlerde daha düşük seviyelerde bulunmuştur (145). Meme kanser dokuları lenfatik nod ve metastaz durumuna göre iki gruba ayrıldıklarında metastaz yapan gruba ait miR-124 seviyelerinin çok daha düşük olduğu gözlenmiştir. TNM sınıflandırmasına göre ileri

evre meme kanserli hastalarda miR-124 seviyesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (146).

Medulloblastoma örneklerinde miR-124 ekspresyon seviyesinin 10 kat düşük ifade edildiği rapor edilmiştir (147). miR-124'ün medulloblastoma hücrelerinde düşük seviyede eksprese edildiğini gösteren başka bir çalışmada, lusiferaz assay ile miR-124 ve Siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6) arasında fonksiyonel ilişki olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada miR-124 ekspresyonunun hücre büyümesini belirgin biçimde azalttığı ancak apoptozu etkilemediğini bildirilmiştir (148). Üç farklı glioma örneğinde miR-124'ün ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Yüksek seviyeli (III ve IV) tümörlerde düşük seviyeli olan tümöre oranla (II) miR-124 ekspresyon seviyesi daha düşük bulunmuştur ve glioma malignitesi ile ilişkilendirilmiştir (149). Nöronal miRNA'lerden sayılan miR-124 nöroblastoma ile de ilişkili bulunmuştur. İnsan beyin gliomasında siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4)'ün artmış ekspresyonu, tedaviye karşı direnç ve hastalığın tekrarı ile ilişkilendirilmiştir. Deng ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada CDK4'ün miR-124 için potansiyel bir hedef olduğu ve radyoterapiye duyarlılık sağladığını bildirmişlerdir (150). CDK4 ve miR-124 ilişkisi mesane kanserinde de kurulmuştur. Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kullandıkları mesane kanser dokularında ve hücre hatlarında (HT1197, HT1376, J82, ve 5637) CDK4 için artmış ve miR-124 için azalmış ekspresyon bulgusuna ulaşmışlardır (151).

Yaptığımız literatür araştırmasında miR-124 ve renal hücreli karsinomla ilişkili çok sınırlı sayıda çalışma bulunduğu gözlenmiştir. Bu anlamda çalışma sonuçlarımızın literatürdeki bu eksikliğin giderilmesine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Çalışmamızda tümör ve sağlıklı çevre dokularında miR-124 ekspresyonunu karşılaştırdığımızda; miR-124'ün renal hücreli karsinom dokusunda sağlıklı çevre dokuya göre azalmış ekspresyona sahip olduğunu gözlemledik ($Z=-4,453$, $p<0,001$). miR-124'ün 28 tümör dokusunda azalmış ekspresyona, 2 tümör dokusunda ise kısmen artmış ekspresyona sahip olduğu görüldü. Tümör ve kontrol grubunun ortalama ΔCT değerlerini sırasıyla $9,30\pm2,24$ ve $6,73\pm1,95$ bulundu. miR-124 tümör dokularına kontrol dokularına göre 0.356 kat daha az eksprese edildiği görüldü. Araştırma bulgularımız literatürdeki diğer kanser dokularında yapılan çalışmalarda yer alan azalmış miR-124 ekspresyonu bulgusuyla uyumludur.

Tümör ve kontrol gruplarının $2^{-\Delta CT}$ miR-124 ekspresyon seviyelerine bakıldığında; tümör grubunun ekspresyon seviyeleri vücut kitle indeksi ($p=0.023$, $r=-0.413$), tümör evresi ($p=0.022$, $r=-0.417$), tümör çapı ($p=0.009$, $r=-0.468$) ve nötrofil değerleri ($p=0.023$, $r=-0.415$) ile anlamlı seviyede negatif yönde korelasyon bulundu. Yani tümör evresi ve çapı, VKİ ve nötrofil değerleri arttıkça miR-124'ün daha az seviyede eksprese edildiği görüldü. Tümör evresi ile ilgili benzer bir bulguya Peng ve arkadaşları nazofaringiyal karsinomda gözlemlemiştir. Tümör evresi ilerledikçe miR-124'ün daha az eksprese edildiği ve bu sebeple miR-124'ün NFK progresyonu ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (145). Shi ve arkadaşları glioma örneklerindeki yüksek seviyeli (III ve IV) tümörlerin düşük seviyeli olan tümörlere oranla (II) azalmış miR-124 ekspresyon düzeylerine sahip olduğunu gösterdikleri için miR-124'ü glioma malignitesi ile ilişkilendirmişlerdir (149). Ayrıca miR-124 ve metastazın ilişkilendirildiği literatürlere de rastlanmaktadır. miR-124'ün meme kanserli metastazik dokularda daha düşük seviyede eksprese edildiği bildirilmiştir. TNM sınıflandırmasına göre ileri evre meme kanserli hastalarda miR-124 seviyelerinin çok daaha düşük olduğu gösterilmiştir (146).

Sonuç olarak miR-124 ile renal hücreli karsinom ilişkili literatüre pek rastlanmamaktadır. Araştırmamızda miR-124 ile renal hücreli karsinom ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Deneylerimiz sonucunda renal hücreli karsinomda miR-124 ekspresyon seviyelerinin azaldığının gösterilmesi renal hücreli karsinomda miR-124'ün biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Değişen miR-124 ekspresyon düzeyleri ile tümör evreleri ve metastaz arasındaki ilişki; miR-124'ün hastalığın prognozunda ve tedavisinde etkili olabileceğini akla getirmektedir. Sonuçlarımızın ileri klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- (1) Campbell, S.C ve Lane, B.R. (2011). Malignant renal tumors in Campbell-Walsh urology. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. Philadelphia: Saunders Elsevier, 1413-74.
- (2) Pécuchet, Nicolas ve Fournier Laure S. (2013). New insights into the management of renal cell cancer. *Oncology*. 84.1, 22–31.
- (3) De Luca, A ve Diğerleri. (2008). Molecular biology of renal-cell carcinoma. *E J C* 2008, 30–4 (Suppl 6).
- (4) Singer, EA ve Diğerleri. (2013). Evolving therapeutic targets in renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 25.3, 273–80.
- (5) Ambros, Victor. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*. 431.7006, 350-55.
- (6) Bartel, DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116.2, 281-97.
- (7) Sevignani, C ve Diğerleri. (2006). Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome* 17.3, 189-202.
- (8) Calin, George A. (2009). MicroRNAs and cancer: what we know and what we still have to learn. *Genome Med*. 1.8, 78
- (9) Long, QZ ve Diğerleri. (2015). miR-124 represses FZD5 to attenuate P-glycoprotein-mediated chemo-resistance in renal cell carcinoma. *Tumour Biol*. 36.9, 7017-26.
- (10) Zhang, C ve Diğerleri (2015). MicroRNA-124 suppresses the migration and invasion of osteosarcoma cells via targeting ROR2-mediated non-canonical Wnt signaling. *Oncol Rep*. 34.4, 2195-201.
- (11) Logan, Catriona Y ve Nusse, Roel. (2004) “TheWnt signaling pathway in development and disease, ”Annual Review of Cell and Deve opmental Biology, vol.20, pp.781–810,2004.
- (12) Xu, Q ve Diğerleri. (2016). Wnt Signaling in Renal Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 8.6. pii: E57. doi: 10.3390/cancers8060057.

- (13) Furuta, M ve Diğerleri. (2010). miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 31, 766-776.
- (14) An, L ve Diğerleri. (2013). microRNA-124 inhibits migration and invasion by down-regulating ROCK1 in glioma. *PLoS One* 8, e69478.
- (15) Virchow, Rudolf. (1858). Die Cellular pathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Berlin.von August Hirschwald Verlag.
- (16) Hanselmann, RG ve Welter, C. (2016). Origin of Cancer: An Information, Energy, and Matter Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 4.121.
- (17) Boveri, Theodor. (1914). Zur Frageder Entstehung Maligner Tumoren. Jena: Fischer Verlag.
- (18) Hanahan, Douglas ve Weinberg, Robert. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144.5, 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- (19) Weaver, Beth A.A. ve Cleveland, Don W. (2007). Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer Res*. 67.21, 10103–10105.
- (20) Hasle, Henrik ve Clemmensen, Inge Haunstrup. (2000). Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*. 355.9199, 165–169.
- (21) Martincorena, I ve Diğerleri. (2015). High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science*. 348.6237, 880–886. doi: 10.1126/science.aaa6806
- (22) Duesberg, P ve Diğerleri. (2011). Is carcinogenesis a form of speciation? *Cell Cycle*. 10.13, 2100–2114. doi: 10.4161/cc.10.13.16352
- (23) Seyfried, Thomas N. (2015). Cancer as a mitochondrial metabolic disease. *Front.Cell Dev.Biol*. 3, 1–12. doi: 10.3389/fcell.2015.00043
- (24) Gatenby, Robert A. ve Gillies, Robert J. (2008). Hypoxia and metabolism-Opinion-A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*. 8, 56–61. doi:10.1038/nrc2255.
- (25) Baker, Stuart. (2015). A cancer theory kerfuffle can lead to newlines of research. *J. Natl. Cancer Inst*. 107.2, 1–8. doi: 10.1093/jnci/dju405

- (26) Mack, S.C ve Diğerleri. (2014). Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. *Nature*. 506.7489, 445–450. doi: 10.1038/nature13108.
- (27) Versteeg, Rogier. (2014). Cancer: tumours outside the mutation box. *Nature*. 506.7489, 438–439 doi: 10.1038/nature13061
- (28) Lengauer, Christoph ve Kinzler, Kenneth W. (1998). Genetic instability in human cancer. *Nature*. 396.6712, 643–649. doi: 10.1038/25292
- (29) Duesberg, Peter. (2005). Does aneuploidy or mutation start cancer? *Science*. 307.5706: 41–42.
- (30) Tomasetti, Cristian ve Vogelstein, Bert. (2015). Cancer etiology. Variations in cancer risk among tissue can be explained by number of stem cell divisions. *Science*. 347.6217, 78–81. doi: 10.1126/science.1260825
- (31) Aydın, S. (2007). Türkiye’ de Üriner Sistem Kanserlerin Görülme Sıklığı. *Türk Üroloji Dergisi*. 33.4, 392-397.
- (32) Mollahaliloğlu, S ve Diğerleri. (2007). *Türkiye’de Sağlığa Bakış*. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü. Sayfa. 59-67.
- (33) Gültekin, M. ve Boztaş, G. (Ed.). (2014) T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Türkiye Kanseri İstatistikleri. <http://kanser.gov.tr/Dosya/kayitcilik/2009kanseraporu.pdf> Erişim Tarihi: 15.12.2016
- (34) Özeş, O.N ve Diğerleri (2011). Böbrek Kanserinin Moleküler Temeli Türkiye Klinikleri. *J Urology-Special Topics*. 4.1, 1-9.
- (35) Özkan, Tayyar Alp ve Yıldız, Kürşat. (2012). Böbrek hücreli kanser evrelemesi: 2010 TNM sınıflandırma sistemi ve Türkiye geçerliliği. *Üroonkoloji Bülteni*. 11.3, 206-211.
- (36) Dilioğlugil, Özdal. (2001). Genitoüriner Kanselerde Evrelendirme Prensipleri. 1.Baskı. İstanbul: Deonta yayıncılık, 5-12.
- (37) Fuhrman, Susan A. ve Lasky, Larry C. (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 6.7, 655–663.
- (38) Sean Williamson, M.D. (2012). Kidney tumor Adult malignancies – miscellaneous Nuclear grading (Fuhrman). PathologyOutlines.com, <http://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneytumormalignantnucleargrading.html>, Erişim Tarihi: 15. 12. 2016

- (39) American Cancer Society: Cancer Facts and Figures. (2016). Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2016. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf> Erişim Tarihi: 15.12.2016
- (40) DeVita, Vincent T. Jr. ve Lawrence, Theodore S. (2011). Cancer: Principles and Practice of Oncology. 9th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins.
- (41) PDQ® Cancer Genetics Editorial Board. PDQ Genetics of Kidney Cancer (Renal Cell Cancer). Bethesda, MD: National Cancer Institute. Online Yayınlanma Tarihi:12/02/2016, <https://www.cancer.gov/types/kidney/hp/kidney-genetics-pdq> , Erişim Tarihi:12/15/2016.
- (42) Shuch, B ve Diğerleri. (2014). Defining early onset kidney cancer: implications for germline and somatic mutation testing and clinical management. *J Clin Oncol.* 32.5, 431-437. doi: 10.1200/JCO.2013.50.8192.
- (43) Gudbjartsson, T ve Diğerleri. (2002). A population based familial aggregation analysis indicates genetic contribution in a majority of renal cell carcinomas. *Int J Cancer.* 100.4, 476-479.
- (44) Vira, MA ve Diğerleri. (2007). Genetic basis of kidney cancer: a model for developing molecular targeted therapies. *BJU Int.* 99.5, 1223-1229.
- (45) Choyke, PL ve Diğerleri. (2003). Hereditary renal cancers. *Radiology.* 226.1, 33-46.
- (46) Zbar, B ve Diğerleri. (2007). Familial renal carcinoma: clinical evaluation, clinical subtypes and risk of renal carcinoma development. *J Urol.* 177.2, 461-465.
- (47) Hemminki, Kari ve Li, Xinjun. (2004). Familial risks of cancer as a guide to gene identification and mode of inheritance. *Int J Cancer.* 110.2, 291-294.
- (48) Mucci, L ve Diğerleri. (2016). Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA.* 315.1, 68-76. doi: 10.1001/jama.2015.17703.
- (49) Chow, Wong Ho ve Devesa, Susan S. (2008). Contemporary epidemiology of renal cell cancer. *Cancer J.* 14.5, 288-301. doi: 10.1097/PPO.0b013e3181867628.
- (50) Shenoy, N ve Diğerleri. (2015). Role of DNA methylation in renal cell carcinoma. *J. Hematol Oncol.* 22.8, 88. doi: 10.1186/s13045-015-0180-y.
- (51) Arai, E ve Diğerleri. (2014). Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome. *Int. J. Cancer.* 135, 1330–1342. doi: 10.1002/ijc.28768

- (52) DiMeo, T.A ve Diğerleri. (2009). A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res.* 69, 5364–5373.
- (53) Kruck, S ve Diğerleri. (2013). Impact of an Altered Wnt1/Beta-catenin expression on clinicopathology and prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10944–10957. doi:10.3390/ijms140610944
- (54) Hsu, R.J ve Diğerleri. (2012). WNT10A plays an oncogenic role in renal cell carcinoma by activating WNT/Beta-catenin pathway. *PLoS ONE.* 7, e47649. doi: 10.1371/journal.pone.0047649
- (55) Saini, Sharanjot ve Majid, Shahana. (2011). The complex roles of Wnt antagonists in RCC. *Nat. Rev. Urol.* 8, 690–699.
- (56) Kondratov, A.G ve Diğerleri. (2012). Alterations of the Wnt7a gene in clear cell renal cell carcinomas. *PLoS ONE.* 7, e47012. doi: 10.1371/journal.pone.0047012
- (57) Takebe, N ve Diğerleri. (2015) Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: Clinical update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12.8, 445–464. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.61.
- (58) Salinas, Patricia C. (2005). Signaling at the vertebrate synapse: new roles for embryonic morphogens? *J Neurobiol.* 64.4, 435–445. doi: 10.1002/neu.20159
- (59) Malaterre, Jordane ve Ramsay, Robert G. (2007). Wnt-Frizzled signalling and the many paths to neural development and adult brain homeostasis. *Front Biosci.* 12, 492–506.
- (60) Inestrosa, Nibaldo ve Arenas, Ernest. (2010). Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 11.2, 77–86. doi: 10.1038/nrn2755.
- (61) Masckauchan, T. Nestor ve Kitajewski, Jan. (2006). Wnt/Frizzled signaling in the vasculature: new angiogenic factors in sight. *Physiology (Bethesda).* 21, 181–188. doi: 10.1152/physiol.00058.2005
- (62) Gross, J.C ve Diğerleri. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 1036–1045. doi: 10.1038/ncb2574.
- (63) Raposo, Graça ve Stoorvogel, Willem. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383. doi: 10.1083/jcb.201211138.
- (64) Yanez-Mo, M ve Diğerleri. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell Vesicles.* 4, 27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066.

- (65) Krause, Mirja ve Samoylenko, Anatoly. (2015). Exosomes as renal inductive signals in health and disease, and their application as diagnostic markers and therapeutic agents. *Front. Cell. Dev. Biol.* 3, 65. doi: 10.3389/fcell.2015.00065.
- (66) Janssens, N ve Diğerleri. (2004). Alteration of Frizzled expression in renal cell carcinoma. *Tumour Biol.* 25.4, 161–171. doi:10.1159/000081098.
- (67) Li, M ve Diğerleri. (2015). MicroRNAs in renal cell carcinoma: a systematic review of clinical implications (Review). *Oncol Rep.* 33.4, 1571-8. doi: 10.3892/or.2015.3799.
- (68) Redova, M ve Diğerleri. (2012). Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med.* 10, 55.
- (69) Gottardo, F ve Diğerleri. (2007). Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 25, 387-392.
- (70) Cheng, T ve Diğerleri. (2013). Differential microRNA expression in renal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 6, 769-776.
- (71) Silva-Santos, RM ve Diğerleri. (2013). MicroRNA profile: a promising ancillary tool for accurate renal cell tumour diagnosis. *Br J Cancer.* 109, 2646-2653.
- (72) Jung, M ve Diğerleri. (2009). MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy. *J Cell Mol Med.* 13, 3918-3928.
- (73) Youssef, YM ve Diğerleri. (2011). Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature. *Eur Urol.* 59, 721-730.
- (74) Wu, X ve Diğerleri. (2012). Identification of a 4-microRNA signature for clear cell renal cell carcinoma metastasis and prognosis. *PLoS One.* 7, e35661.
- (75) Huang, J ve Diğerleri. (2014). miR-199a-3p inhibits hepatocyte growth factor/c-Met signaling in renal cancer carcinoma. *Tumour Biol.* 35, 5833-5843.
- (76) Wulfken, LM ve Diğerleri. (2011). MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One.* 6: e25787.
- (77) Gao, Y ve Diğerleri. (2014). MicroRNAs as potential diagnostic biomarkers in renal cell carcinoma. *Tumour Biol.* (Epub ahead of print). doi: 10.1007/s13277-014-2381-3.
- (78) Schiffgen, M ve Diğerleri. (2013). Epigenetic regulation of microRNA expression in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 436, 79-84.
- (79) Anastas, Jamie N. ve Moon, Randall T. (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 13, 11–26. doi: 10.1038/nrc3419.

- (80) Schambony, Alexandra ve Wedlich, Doris. (2007). Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev. Cell.* 12.5, 779–792. doi.org/10.1016/j.devcel.2007.02.016
- (81) Willert, Karl ve Jones, Katherine A. (2006). Wnt signaling: Is the party in the nucleus? *Genes Dev.* 20.11, 1394–1404
- (82) Aberle, H ve Diğerleri. (1997). Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797–3804. doi: 10.1093/emboj/16.13.3797.
- (83) Tanır, Hanife Güler ve Demirezen, Şayeste. (2009). Wnt Sinyal Yolunun Biyolojisi ve Bu Yolda Görev Alan Biyomoleküller. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 29.5, 1292-1297.
- (84) Kikuchi, Akira ve Yamamoto, Hideki. (2009). Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends in Cell Biology.* 19.3, 119–129. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2009.01.003
- (85) He, X ve Diğerleri. (2004). LDL receptor related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way. *Development.* 131.8, 1663–1677.
- (86) Sharma, G ve Diğerleri. (2015). Genetic Polymorphism in Extracellular Regulators of Wnt Signaling Pathway. *BioMed Research International.* doi:10.1155/2015/847529
- (87) Wright, T.M ve Diğerleri. (2009). ROR2, a developmentally regulated kinase, promotes tumor growth potential in renal cell carcinoma. *Oncogene.* 28, 2513–2523. doi: 10.1038/onc.2009.116.
- (88) Schulte, Gunnar. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol* 62.4, 632–667. doi: 10.1124/pr.110.002931.
- (89) Willert, K ve Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4.9, a007864. doi: 10.1101/cshperspect.a007864.
- (90) Katsu, T ve Diğerleri. (2003). The human frizzled-3 (FZD3) gene on chromosome 8p21, a receptor gene for Wnt ligands, is associated with the susceptibility to schizophrenia. *Neurosci Lett.* 353.1, 53–56.
- (91) Yang, J ve Diğerleri. (2003). Association study of the human FZD3 locus with schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 54, 1298–1301.
- (92) Wei, Jun ve Hemmings, Gwynneth P. (2004). Lack of a genetic association between the frizzled-3 gene and schizophrenia in a British population. *Neurosci Lett.* 366, 336–338.

- (93) Dijksterhuis, Jacomijn Petronella ve Petersen, Julian. (2014). WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: *IUPHAR Review 3. Br J Pharmacol.* 171.5, 1195-1209. doi: 10.1111/bph.12364.
- (94) Bartel, David P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 136, 215-233.
- (95) Lee, Rosalind C. ve Feinbaum, Rhonda L. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75, 843-854.
- (96) Croce, Carlo M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* 10, 704-714.
- (97) Rodriguez, A ve Diğerleri. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 14, 1902-1910.
- (98) Saini, HK ve Griffiths-Jones, S. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104, 17719-17724.
- (99) Cai, Xuezhong ve Hagedorn, Curt H. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 10, 1957-1966.
- (100) Lee, Y ve Diğerleri. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051-4060.
- (101) Denli, Ahmet M. ve Diğerleri. (2004). Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature.* 432, 231-235.
- (102) Han, J ve Diğerleri. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016-3027
- (103) Lund, E ve Diğerleri. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 303, 95-98.
- (104) Yi, R ve Diğerleri. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011-3016.
- (105) Zhang, B ve Diğerleri. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 302, 1-12.
- (106) Jackson, Richard J. ve Standart, Nancy. (2007). How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE.* (Epub ahead of print). doi: 10.1126/stke.3672007re1.
- (107) Nilsen, Timothy W. (2007). Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet.* 23, 243-249.

- (108) Makeyev, EV ve Diğerleri. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell*. 27, 435–448.
- (109) Furuta, M ve Diğerleri. (2010). miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 31, 766–776.
- (110) Ando, T ve Diğerleri. (2009). DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer*. 124, 2367–2374.
- (111) Agirre, X ve Diğerleri. (2009). Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 69, 4443–4453.
- (112) <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR124-1>, Erişim Tarihi: 15.05.2017.
- (113) http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000443, Erişim Tarihi: 16.05.2017.
- (114) Zhang, YH ve Diğerleri. (2016). miR-124 radiosensitizes human esophageal cancer cell TE-1 by targeting CDK4. *Genet Mol Res*. 15.2, 1–10.
- (115) Feng, T ve Diğerleri. (2015). miR-124 inhibits cell proliferation in breast cancer through downregulation of CDK4. *Tumor Biol*. 36.8, 5987–97.
- (116) Jiang, L ve Diğerleri. (2016). miR-124 interacts with the Notch1 signalling pathway and has therapeutic potential against gastric cancer. *J Cell Mol Med*. 20.2, 313–22.
- (117) Lu, Y ve Diğerleri. (2013). MicroRNA-124 suppresses growth of human hepatocellular carcinoma by targeting STAT3. *Biochem Biophys Res Commun*. 441.4, 873–9.
- (118) Li, W ve Diğerleri. (2016). miR-124 Acts as a Tumor Suppressor in Glioblastoma via the Inhibition of Signal Transducer and Activator of Transcription 3. *Mol Neurobiol*. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26993295.
- (119) Koukos, G ve Diğerleri. (2013). MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 145.4, 842-52.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2013.07.001.
- (120) Zhou, L ve Diğerleri. (2016). MicroRNA-124 (MiR-124) Inhibits Cell Proliferation, Metastasis and Invasion in Colorectal Cancer by Downregulating Rho-Associated Protein Kinase 1(ROCK1). *Cell Physiol Biochem*. 38.5, 1785-95. doi: 10.1159/000443117.

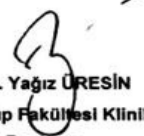
- (121) Qiu, Z ve Diğerleri. (2015). MicroRNA-124 reduces the pentose phosphate pathway and proliferation by targeting PRPS1 and RPIA mRNAs in human colorectal cancer cells. *Gastroenterology*. 149.6, 1587-1598.e11. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.050.
- (122) Chen, J ve Diğerleri. (2014). MicroRNA124 regulate cell growth of prostate cancer cells by targeting iASPP. *Int J Clin Exp Pathol*. 7.5, 2283-90.
- (123) <http://www.cohesionbio.com/download/CPK1010.pdf>.
- (124) Livak, KJ ve Schmittgen, TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25.4, 402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- (125) APPLICATION NOTE- Real-time PCR: Understanding Ct. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/general_documents/cms_053906.pdf Erişim Tarihi: 07.02.2107
- (126) <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna2/templates/miScriptmiRNADat aAnalysisQuickCardv1.1201411.pdf>
- (127) Cohen, Herbert T. ve McGovern, Francis J. (2005). Renal-cell carcinoma. *N Engl JMed*. 353, 2477-2490.
- (128) Rini, Brian I. ve Rathmell, W.Kimryn. (2008). Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 20, 300-306.
- (129) Janzen, NK ve Diğerleri. (2003). Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. *Urol Clin North Am*. 30, 843-852.
- (130) Bullock, Andrea ve McDermott, David F. (2010). Management of metastatic renal cell carcinoma in patients with poor prognosis. *Cancer Manag Res*. 2, 123-132.
- (131) Lilleby, Wolfgang ve Fossa, Sophie D. (2005). Chemotherapy in metastatic renal cell cancer. *World J Urol*. 23, 175-179.
- (132) Butz, H ve Diğerleri. (2015). miRNA-target network reveals miR-124as a key miRNA contributing to clear cell renal cell carcinoma aggressive behaviour by targeting CAV1 and FLOT1. *Oncotarget*. 6.14, 12543-57.
- (133) Gebauer, K ve Diğerleri. (2013). Hsa-mir-124-3 CpG island methylation is associated with advanced tumours and disease recurrence of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 108.1, 131-8. doi: 10.1038/bjc.2012.537.
- (134) Söber, Siim ve Laan, Maris. (2010). MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 391.1, 727-32. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.128.

- (135) Zell, S ve Diğerleri. (2013). Hypoxia Induces Mesenchymal Gene Expression in Renal Tubular Epithelial Cells: An in vitro Model of Kidney Transplant Fibrosis. *Nephron Extra*. 3.1, 50-8. doi:10.1159/000351046.
- (136) Zhang, J ve Diğerleri. (2013). MiR-124 suppresses growth of human colorectal cancer by inhibiting STAT3. *PLoS One*. 8.8, e70300. doi: 10.1371/journal.pone.0070300.
- (137) Zhang, Y ve Diğerleri. (2014). MiR-124 Radiosensitizes human colorectal cancer cells by targeting PRRX1. *PLoS One*. 9.4, e93917. doi: 10.1371/journal.pone.0093917.
- (138) Zhang, H ve Diğerleri. (2013). MiR-124 inhibits the migration and invasion of ovarian cancer cells by targeting SphK1. *J Ovarian Res*. 6.1, 84. doi:10.1186/1757-2215-6-84.
- (139) Wan, HY ve Diğerleri. (2014). MiR-124 represses vasculogenic mimicry and cell motility by targeting amotL1 in cervical cancer cells. *Cancer Lett*. 355.1, 148-58. doi: 10.1016/j.canlet.2014.09.005.
- (140) Zhang, W ve Diğerleri. (2015). MiR-124 suppresses cell motility and adhesion by targeting talin 1 in prostate cancer cells. *Cancer Cell Int*. 15.49. doi: 10.1186/s12935-015-0189-x.
- (141) Shi, XB ve Diğerleri. (2013). Tumor suppressive miR-124 targets androgen receptor and inhibits proliferation of prostate cancer cells. *Oncogene*. 32.35, 4130-8. doi: 10.1038/onc.2012.425.
- (142) Hu, CB ve Diğerleri. (2014). miR-124 inhibits growth and invasion of gastric cancer by targeting ROCK1. *Asian Pac J Cancer Prev*. 15.16, 6543-6.
- (143) Xie, L ve Diğerleri. (2014). MicroRNA-124 inhibits proliferation and induces apoptosis by directly repressing EZH2 in gastric cancer. *Mol Cell Biochem*. 392.1-2, 153-159.
- (144) Lang, Qingbo, Ling, Changquan. (2012) MiR-124 suppresses cell proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting PIK3CA. *Biochem Biophys Res Commun*. 426.2, 247-52. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.075. PubMed PMID: 22940133
- (145) Peng, XH ve Diğerleri. (2014). MiR-124 suppresses tumor growth and metastasis by targeting Foxq1 in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer*. 7.13, 186. doi:10.1186/1476-4598-13-186.

- (146) Li, L ve Diğerleri. (2013). Microrna-124 targets flotillin-1 to regulate proliferation and migration in breast cancer. *Mol Cancer*. 13.12, 163. doi: 10.1186/1476-4598-12-163.
- (147) Li, KK ve Diğerleri. (2009). miR-124 is frequently down-regulated in medulloblastoma and is a negative regulator of SLC16A1. *Hum Pathol*. Sep;40.9, 1234-43. doi: 10.1016/j.humpath.2009.02.003. PubMed PMID: 19427019.
- (148) Pierson, J ve Diğerleri. (2008) Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma. *J Neurooncol*. 2008 Oct;90.1, 1-7. doi: 10.1007/s11060-008-9624-3.
- (149) Shi, Z ve Diğerleri. (2014). MiR-124 governs glioma growth and angiogenesis and enhances chemosensitivity by targeting R-Ras and N-Ras. *Neuro Oncol*. Oct;16.10, 1341-53. doi: 10.1093/neuonc/nou084.
- (150) Deng, X, ve Diğerleri (2013). miR-124 radiosensitizes human glioma cells by targeting CDK4. *J Neurooncol*. Sep;114.3, 263-74. doi: 10.1007/s11060-013-1179-2.
- (151) Zhang, T ve Diğerleri. (2014). MiR-124 retards bladder cancer growth by directly targeting CDK4. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. Dec;46(12):1072-9. doi: 10.1093/abbs/gmu105.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Karar Formu

	T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
Sayı : 1489		Tarih : 15.12.2016
Konu : Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK hk.		
Sayın Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK İstanbul Medeniyet Üniversitesi		
İlgi : İstanbul Medeniyet Üniversitesinin 05/12/2016 tarihli yazısı		
Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Burcu ÇAYKARA' nın yürüteceği 2016/1428 dosya numaralı "Renal Hücreli Karsinomda Mir-124 Ekspresyonu" başlıklı çalışma kurulumuzun 09/12/2016 gün ve 21 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.		
Bilgilerinizi rica ederim.		
 Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı		
Ekl: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu		

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Renal Hücreli Karsinomda Mir-124 Ekspresyonu"		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Fizyoloji		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı		
	DESTEKLEYİCİ	---		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
		FAZ 4	☐	
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐	
		Yüksek Doz Araştırması	☐	
		Diğer ise belirtiniz :		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒
				ULUSLAR ARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI **"Renal Hücreli Karsinomda Mir-124 Ekspresyonu"**

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	05/12/2016	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	☐	Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÖNÜLLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	DİĞER:	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatur Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD	
	Karar No:21	Tarih: 09/12/2016		
İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK'ün sorumluluğunda ve Burcu ÇAYKARA'nın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanmaya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU						
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN				
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile ilişkisi
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

Sayfa 2

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Burcu Çaykara

Uyruğu : T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 1987, İstanbul

Elektronik Posta : burcu.caykara@medeniyet.edu.tr

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Lisans	Balıkesir Üniversitesi	2009

İŞ TECRÜBESİ

Tarih	Kurum	Görev
2013-	İstanbul Medeniyet Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİLLER

İngilizce