



T.C.  
BURSA ULUDAĞ  
ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ  
TIP-TIBBİ BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**BERRAK HÜCRELİ TIP RENAL HÜCRELİ  
KARSİNOM'DA RNA TEMELLİ BİYOBELİRTEÇLERİN  
BİYOİNFORMATİK VE MOLEKÜLER ANALİZ  
YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**UFUK ÜNAL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BURSA-2020**

UFUK ÜNAL

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020



T.C.  
BURSA ULUDAĞ  
ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ  
TIP-TIBBİ BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**BERRAK HÜCRELİ TIP RENAL HÜCRELİ KARSİNOM'DA  
RNA TEMELLİ BİYOBELİRTEÇLERİN BİYOİNFORMATİK  
VE MOLEKÜLER ANALİZ YÖNTEMLERİ İLE  
ARAŞTIRILMASI**

**Ufuk ÜNAL**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**DANIŞMAN:**

**Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER**

**BURSA-2020**

T.C.  
**BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK BEYANI**

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum  
"Berrak Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinom'da RNA Temelli Biyobelirteçlerin  
Biyoinformatik ve Moleküler Analiz Yöntemleri ile Araştırılması" adlı çalışmanın,  
proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik  
kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar  
bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Adı Soyadı**  
**Tarih ve İmza**

**Ufuk ÜNAL**

10.09.2020

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

10/08/2020

Adı Soyadı: Ufuk ÜNAL

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Konusu: Berrak Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinom'da RNA Temelli  
Biyobelirteçlerin Biyoinformatik Ve Moleküler Analiz Yöntemleri İle Araştırılması

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER

İmza:



## İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET.....	VIII
İNGİLİZCE ÖZET.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Kanserın Görülme Sıklığı.....	5
2.1.2. Kanserın Hücresel Kökeni ve Gelişimi.....	6
2.2. Renal hücreli karsinom .....	7
2.2.1. İnsidans ve Epidemiyoloji .....	10
2.2.2. Etiyoloji Ve Risk Faktörleri.....	11
2.3. Renal Hücreli Karsinom Sınıflandırması.....	11
2.3.1. Renal Hücreli Karsinomun Moleküler Sınıflandırması.....	12
2.3.2. Renal Hücreli Karsinomun Histolojik Sınıflandırılması.....	15
2.3.2.1. Berrak Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinoma.....	15
2.3.2.2. Papiller Renal Hücre Karsinomu.....	16
2.3.2.3. Kromofob Renal Hücreli Karsinom.....	16
2.3.2.4. Beeline Toplayıcı Duktus Karsinom.....	16
2.3.3. Renal Hücreli Karsinomun Histopatolojik Sınıflandırma.....	16
2.3.4. Renal Hücreli Karsinom'da TNM Sınıflandırması.....	18
2.3.5. Rnk'da tümör derecelendirme sistemleri (Fuhrmann) .....	19
2.4. Berrak hücreli tip renal hücreli karsinom.....	20
2.4.1 Hastalığın Evreleri.....	21
2.4.2 Klinik Prognoz ve Moleküler Belirteçler.....	21
2.4.3 Tedavi Hedefleri.....	22
2.4.4 Kromozomal Aberasyon.....	23
2.4.5 Transkriptomiks.....	23
2.4.6. Berrak Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinom'da Genlerin Rolü .....	24
2.4.6.1 <i>HIF1A</i> .....	24
2.4.6.2 <i>VHL</i> .....	27
2.4.6.3 <i>KAT5</i> .....	31
2.4.7. Berrak Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinom'da Heterojenite.....	34
2.5 miRNA'ların Yapı ve Biyogenezi.....	35
2.5.1. miRNA'ların biyogenezi.....	35
2.5.2 miRNA'ların Kanser İle İlişkisi.....	37
2.5.3 Berrak Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinom'da miRNA'lar.....	39
2.5.3.1 miR-22.....	40
2.5.3.2 miR-138.....	40
2.5.3.3 miR-223 .....	41

2.6. Biyoinformatik.....	42
2.6.1. Global Veri Bankaları.....	45
2.6.1.1. GEO Data.....	45
2.6.1.2. TCGA Data.....	49
2.6.1.3. cBioportal.....	50
2.6.1.4. KEGG.....	52
2.6.2. Analiz Programları.....	53
2.6.2.1 Ağ Varyantları.....	53
2.6.2.2. Gene Ontology.....	53
2.6.2.3. String.....	54
2.6.2.4. Reactome.....	55
2.6.2.5. miRTargetLink Human.....	56
2.6.2.6. TargetScan Human Predicts Biological Targets.....	57
2.6.2.7. Gene Set Enrichment Analyze (GSEA).....	58
2.7. Biyoistatistik.....	58
2.7.1. T testi .....	59
2.7.1. Ki-Kare ( $X^2$ ) Testi.....	60
2.7.3. Korelasyon Testi.....	61
2.7.4. Sağ kalım Modellemesi.....	61
2.7.5. Delta CT Analizi .....	63
2.7.6. R Analizi.....	64
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	66
3.1. Global Veri Bankalarının Taranması.....	66
3.1.1. Aday Genlerin Tespiti.....	66
3.1.2. Aday Genleri Hedefleyen miRNA'ların Tespiti.....	66
3.2. Aday Gen ve miRNA'ların Yolak Analizleri.....	67
3.3. Hasta Grubu.....	67
3.4. Gereçler.....	68
3.4.1. Kullanılan Aletler.....	68
3.4.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	68
3.5. Yöntemler.....	69
3.5.1. Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi.....	69
3.5.2. Elde Edilen RNA ve DNA'nın Miktar ve Kalite Tayini.....	69
3.5.3. RNA ve miRNA'lardan cDNA Sentezi.....	74
3.5.4. RT-qPCR ile <i>VHL</i> , <i>HIF1A</i> ve <i>KAT5</i> Genlerinin ve Bu Genleri Hedef Alan mir22, mir138 ve mir223 'ün Ekspresyon Analizleri.....	76
3.5.5. RT-qPCR Analizi Sonucu Hedef Genlerin ve İlgili miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi.....	78
3.5.6. Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden DNA Elde Edilmesi.....	79
3.5.7. Total DNA'dan PCR ile <i>VHL</i> Geninin Eldesi.....	79
3.5.8. Hetero Dublex Analizi (HDA).....	79
3.5.9. Sekans Reaksiyonu.....	80
3.5.10. Western Blot Analizi.....	80
3.5.11. İstatistiksel Analizler.....	81
3.5.12. Elde Edilen Bulguların Klinik İle İlişkisinin Belirlenmesi.....	81
4. BULGULAR.....	83
4.1. İn Silico Biyoinformatiksel Hesaplamalar.....	83
4.2. <i>VHL</i> , <i>HIF1A</i> ve <i>KAT5</i> genlerini hedef alan miRNA'ların tespit edilmesi... 120	

<b>4.3. Klinik Validasyon Çalışması Sonuçları .....</b>	<b>122</b>
<b>4.4. HDA ve Sekans Analiz Sonuçları.....</b>	<b>177</b>
<b>4.5. Western Blot Analizi Sonuçları.....</b>	<b>189</b>
<b>5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>193</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>203</b>
<b>7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>212</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>215</b>
<b>8.1 Etik Kurul Kararı.....</b>	<b>215</b>
<b>9. TEŞEKKÜR .....</b>	<b>218</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>219</b>

## ÖZET

Berrak hücreli tip renal hücreli karsinom (BHTRHK) Dünya çapında yılda 75.000 kişiden fazla ölüme neden olmaktadır. Son yıllarda BHTRHK oluşumunda rol oynayan genlerin ve mikroRNA (miRNA)'ların işlevlerinin anlaşılmaya başlanması, moleküler patolojisinin aydınlatılmasını hem de yeni moleküler hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Tez çalışmasında global veri bankalarından elde edilen 6.056 BHTRHK hasta verisinin in silico analizleri yapılarak; BHTRHK gelişiminde rolü potansiyel olan aday genler ve bu genleri hedef alan miRNA'lar arasından belirlenen; *VHL*, *KAT5* ve *HIF1A*'nın ve miR-22, miR-138 ve miR-223'ün ekspresyon analizleri 100 BHTRHK hastasının parafinize edilmiş tümör ve normal dokularında gerçekleştirildi. Elde edilen in silico analizlere ait nicel veriler; normalite testi, t-testi,  $X^2$ , korelasyon testi ve ROC analizi ile değerlendirildi. Hastaların tümör ve normal dokularına ait gen ve miRNA ifade farklılıkları karşılaştırıldığında ise; *VHL*'de -0,39 kat azalma ( $p=0,4419$ ), *HIF1A*'da 1,23 kat artma ( $p=0,0402$ ), *KAT5*'de 1,88 kat artma ( $p=0,001$ ), miR-223'de 0,97 kat artma ( $p=0,0458$ ), miR-138'de -3,84 kat azalma ( $p<0,0001$ ) ve miR-22'de -1,17 kat azalma ( $p=0,0309$ ) belirlendi. Ayrıca, *VHL* geninde yapılan DNA dizi analizi sonucunda hastaların %26'sında değişim saptanmıştır. Western blot analiz sonucunda ise, *VHL*'de değişim görülmez iken *KAT5* protein miktarında artma belirlenmiştir ( $p=0,048$ ). Elde edilen bulgular hastaların klinikopatolojik verileri ile karşılaştırıldığında; *VHL* gen ifadesi ile tanısal değeri olan CD10 ( $p=0,047$ ), LMWCK ( $p=0,004$ ), CK19 ( $p=0,025$ ) ve PAS ( $p=0,034$ ) değerleri ile istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir. *HIF1A* ve *KAT5* ifadeleri ise LMWCK ile ilişki ilişkilidir ( $p=0,018$ ,  $p=0,018$ ). İlgili genleri hedef alan miRNA'lar arasında yer alan miR-22'nin ifade farklılığı perirenal yağ doku invazyonu ( $p=0,003$ ), fuhramn derecesi ( $p=0,037$ ) ve patoloji tümör evresi ( $p=0,038$ ) ile, miR-138 ifadesi farklılığı ise perirenal yağ doku invazyonu ( $p=0,05$ ) ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki göstermiştir.

Tez çalışması kapsamında BHTRHK gelişiminde rolü potansiyel genetik ve epigenetik değişimler araştırılarak elde edilen bulgular ışığında, BHTRHK'da kötü prognozun belirlenebilmesi için mir-22 ve mir-138'ün ifade düzeylerindeki farklılıkların biyobelirteç olma potansiyeli mevcuttur. Ayrıca mir-22 ve mir-138'ün potansiyel terapötik hedef olarak kullanılabilirliğine ait ön verilerin elde edilmesi, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesini içeren ileri çalışmalara temel oluşturmaktadır. Mevcut tez çalışması, kötü prognoza sahip BHTRHK'lu hastaların moleküler biyobelirteçler ile ayırt edilerek bireye özgü etkin tedavi modellerinin geliştirilmesine katkı sağlar niteliktedir.

**Anahtar Kelimler:** Renal hücreli karsinom, Berrak hücreli tip renal hücreli karsinom, *VHL*, *HIF1A*, *KAT5*, miRNA, in-silico

## İNGİLİZCE ÖZET

### **Research with Bioinformatic and Molecular Analysis Methods of RNA Based Biomarkers in Clear Cell Renal Cell Carcinoma**

Clear cell type renal cell carcinoma (CCRCC) causes more than 75,000 deaths per year worldwide. In recent years, understanding the functions of genes and microRNA (miRNA) that play a role in the formation of CCRCC enables the elucidation of its molecular pathology and the development of new molecular targeted therapies.

In the thesis study, in silico analysis of 6.056 CCRCC patient data obtained from global data banks; Determined among candidate genes that have a potential role in CCRCC development and miRNAs targeting these genes; Expression analyzes of *VHL*, *KAT5* and *HIF1A* and miR-22, miR-138 and miR-223 were performed in paraffinised tumor and normal tissues of 100 CCRCC patients. Quantitative data of in silico analysis obtained; Normality test, t-test, X<sup>2</sup>, correlation test and ROC analysis. When the gene and miRNA expression differences of the patients' tumor and normal tissues were compared; -0.39-fold decrease in *VHL* ( $p = 0.4419$ ), 1.23-fold increase in *HIF1A* ( $p = 0.0402$ ), 1.88-fold increase in *KAT5* ( $p = 0.001$ ), miR-223 0.97-fold increase in ( $p = 0.0458$ ), -3.84-fold decrease in miR-138 ( $p < 0.0001$ ) and -1.17-fold decrease in miR-22 ( $p = 0.0309$ ) Determined. In addition, as a result of the DNA sequence analysis performed in the *VHL* gene, 26% of the patients have changed. As a result of the Western blot analysis, while there was no change in *VHL*, an increase in the amount of *KAT5* protein was determined ( $p = 0.048$ ). When the obtained findings are compared with the clinicopathological data of the patients; *VHL* gene expression showed statistical significance with diagnostic value of CD10 ( $p = 0.047$ ), LMWCK ( $p = 0.004$ ), CK19 ( $p = 0.025$ ) and PAS ( $p = 0.034$ ) values. *HIF1A* and *KAT5* expressions are correlated with LMWCK ( $p = 0.018$ ,  $p = 0.018$ ). Differences in expression of miR-22 among miRNAs targeting related genes, differ in expression of miR-138 by perirenal adipose tissue invasion ( $p = 0.003$ ), degree of prostitution ( $p = 0.037$ ), and pathology tumor stage ( $p = 0.038$ ). Showed a statistically significant correlation with perirenal adipose tissue invasion ( $p = 0.05$ ).

Within the scope of the thesis study, in the light of the findings obtained by investigating potential genetic and epigenetic changes in the development of CCRCC, the differences in expression levels of mir-22 and mir-138 have the potential to be biomarkers in order to determine the poor prognosis in CCRCC. In addition, obtaining preliminary data on the usability of mir-22 and mir-138 as potential therapeutic targets forms the basis for further studies involving the development of targeted therapies. The present thesis study contributes to the development of individual-specific effective treatment models by distinguishing patients with CCRCC with poor prognosis by molecular biomarkers.

**Key Words:** Renal Cell Carcinoma, Clear Cell Renal Cell Carcinoma, *VHL*, *HIF1A*, *KAT5*, miRNA, in-silico

## 1. GİRİŞ

Renal hücreli kanserler (RHK), böbrekte en sık görülen tümörlerdir ve yaklaşık olarak tüm kanserlerin %2-3'ünü oluşturur (van den Berg, 2013). Böbreğe sınırlı tümörlerde başlıca tedavi cerrahi eksizyon yöntemidir. Ancak cerrahi operasyondan sonra hastaların %50'inde nüks gerçekleştiği bilinmektedir (van den Berg, 2013). Metastatik durumdaki hastalar için tedavide birkaç seçenek söz konusudur. En sık uygulanan tedavi kemoterapi olmakla birlikte bu yöntemin etkinliği, kullanılan ilaçlara karşı gelişen direnç nedeniyle kısıtlıdır. Benzer şekilde bu tümörlerin radyoterapiye karşı direnci ve interleukin (IL)-12, interferon (INF)- $\alpha$  gibi immünoteropik ajanlara karşı çok zayıf hassasiyeti bulunmaktadır. RHK'lar, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) yapmış olduğu sınıflamaya göre histopatolojik olarak alt tiplere ayrılmaktadır. Bu sınıflamada BHTRHK %80 oranla en sık görülen alt tiptir (Dalglish et al., 2010). Ürolojik kansere bağlı ölümlerde en yüksek orana sahiptir ve metastatik hastalık durumunda 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %40'tır (van den Berg, 2013).

Renal tümörlerinin erken tanısı hastanın sağkalım şansını belirlemek açısından önemlidir. Erken evrede saptanan tümörler tedaviye iyi yanıt verir ve sağkalım oranları yüksektir. İleri evre renal kanserde kan veya lenfatik sistem yoluyla vücudun diğer bölümlerine yayılan tümörlerde tedavi zor ve ölüm oranı yüksektir (Eichelberg et al., 2009).

Bu nedenlerden dolayı hastaların;

1. Hastalığın ilk evrelerinde teşhisi,
2. Hastalığın sonraki yıllarda nüksü ile ilgili olasılığın hesaplanması,
3. Uygun ilaç seçimi ve oluşabilecek olası ilaç direncinin tespiti,

Analizlerinin yapılması adına yeni moleküler biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

BHTRK *VHL* gen mutasyonu ile karakterize edilmiştir (Koudijs et al., 2019). *VHL* genindeki olası mutasyonların gen aktivasyonunu etkisizleştirilmesi, Hipoksi yolağının transkripsiyon düzenlemesi üzerinde ifade arttırıcı bir etki oluşturmaktadır. *HIF1A* gen ifadesinin artışı tümörün normal ortam şartlarında hipoksik ortam gibi

davranmasına sebep olarak anjiyogenezi ve metabolizma hızını arttırmaktadır. Bu durum tümörün çok kısa sürede ilerlemesiyle sonuçlanmaktadır.

Son yıllarda oldukça gelişen bilgisayar teknolojilerinin biyolojik yapılar üzerinde kullanılmaya başlanması moleküler alt yapıdan hastalıkların tedavisine kadar birçok parametreye pozitif yönlü katkı sağlamıştır. Biyoloji ve bilgisayar teknolojisinin birlikte kullanımı terimsel olarak biyoinformatik bilim dalını oluşturmuştur.

Biyoinformatik; canlıların tüm yapı ve fonksiyonlarının araştırılmasında elde edilen karmaşık verilerin derlenmesine, analizlenmesine ve işlevsel olarak kullanımına olanak sağlar. İleri analiz metodları sayesinde biyolojik veriyi analizler ve daha sonrasında olabilecek olası durumları modelleme imkanı sunmaktadır.

Moleküler Biyolojide aktif bir yer alan bu bilim dalı canlı yapı ve fonksiyonlarının moleküler alt yapısının analizlenmesi, genotip - fenotip ilişkisinin kurulması, hastalıkların tanımlanması, uygun tedavi ve ilaç gelişiminde aktif rol oynamaktadır. Bunlara ek olarak yıllardır biriken bilimsel verilerin bir araya getirilerek yapılan meta analizler ile nicel değeri çok daha yüksek verilerin oluşturulmasını sağlamaktadır.

Gen ekspresyon profillerine dayalı biyobelirteç saptama analizinde kullanılacak örneklem sayısı sonucun güvenilirliği ile doğru orantı göstermektedir. Global veri ağlarından elde edilecek çok sayıdaki gen ekspresyon profili hastaların sahip oldukları klinik parametreler ışığında genel perspektifte hastalığın irdelenmesine ve olası çıktılar arasında neden-sonuç ilişkisi kurularak klinik parametreler ile değerlendirilmesine olanak sağlayabilecektir.

Planlanan projede; biyoinformatiksel yöntemler kullanılarak global veri bankalarındaki ekspresyon profili veri setlerinin analizi ile BHTRHK'da tanı, tedavi ve kötü prognozu öngörmeye yönelik yeni moleküler biyobelirteçlerin belirlenmesi ve elde edilen verilerin Türk BHTRHK hastalarında DNA, RNA ve protein düzeyindeki analizler ile valide edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, canlıya ait hücre bütünlüğü içerisinde bir ya da bir grup hücrenin diğer hücre grubundan farklı olarak kontrolsüzce bölünüp çoğalmasdır (Emilio et al., 2019). Bu süreçte, fiziksel ve kimyasal ajanların, virüslerin ve genetik faktörlerin etkisi görülmektedir. Kanseri temelinde sekiz farklı özellik ile karakterize olan oldukça kompleks ve anlaşılması güç bir hastalık türüdür (Emilio et al., 2019). Bütünlüğünde bulundurduğu bu sekiz özellik sırasıyla;

1. Proliferatif etkiyi sürdürmek,
2. Büyüme baskılayıcı etkenlerden kaçınmak,
3. Apoptaza karşı koymak,
4. Sürekli çoğalmak (Replikatif Ölümsüzlük),
5. Anjiyogenezi artırıcı etki yaratmak,
6. Bulunduğu doku ve organda baskın hücre grubunu oluşturmak ve metastatik etki yaratabilme,
7. Enerji metabolizmasını yeniden yapılandırabilme,
8. İmmün etkinin ortadan kaldırılmasını sağlamaktır.

Kanser yapı olarak monoklonal olsa da, çok sayıda genetik ve epigenetik değişimler bütünlüğünde genomik kararsızlığı meydana getirir (Karner et al., 2009). Kanseri hücreleri yapılarındaki genetik farklılığı hem ailesel hem de gelişimsel dönemde sporadik olarak oluşturabilirler. Bu özellik kanseri hücrelerinin Darwinist evrim modeliyle yakından ilişkili olduğunu da göstermektedir.

Yapılan uzun çalışmalar ışığında kanseri gelişiminde etkili olan mutasyonların merkez oluşturduğu genler “onkogen” (Kanseri Geni) olarak adlandırılmıştır. Kanseri gelişiminde onkogenlerin etkisini bilmemiz kanseri gelişimini tam olarak anlamamız için yeterli değildir (He & Klionsky, 2009). Gelişen teknoloji ile insan genomunun analizlenmesi ve yeni nesil dizileme teknikleri kanseri hastalığı hakkında oldukça büyük ilerlemeler katedilmesine olanak sağlamıştır. Bu yeni teknoloji ve bu teknolojinin çıktısı olan veriler, global veri bankalarında bir araya toplanmaya başlanmıştır. Bu büyük veri havuzunun biyoinformatiksel analizi birçok yeni kanseri



geninin tanımlanmasına ve hastalık hakkında daha çok bilgiye sahip olmamıza olanak sağlamaktadır.

Elde edilen bulgular kanserin genetik alt yapısında oldukça heterojen bir mutasyon örüntüsünü göstermektedir (R. Fisher et al., 2013). Aynı alt tipteki kanser hastaları arasında bile mutasyon örüntüsü farklılık gösterebilmektedir. Hatta aynı mutasyonlara sahip hastalarda hastalık farklı klinik seyir gösterebilmektedir. Heterojen mutasyon örüntüsü tümörün agresiflik ve proliferatif gücü açısından da farklılık gösterir. Tümör içi heterojenite bir tümör dokusu içinde dahi bölgesel farklılıkları olabildiğini göstermektedir (R. Fisher et al., 2013)

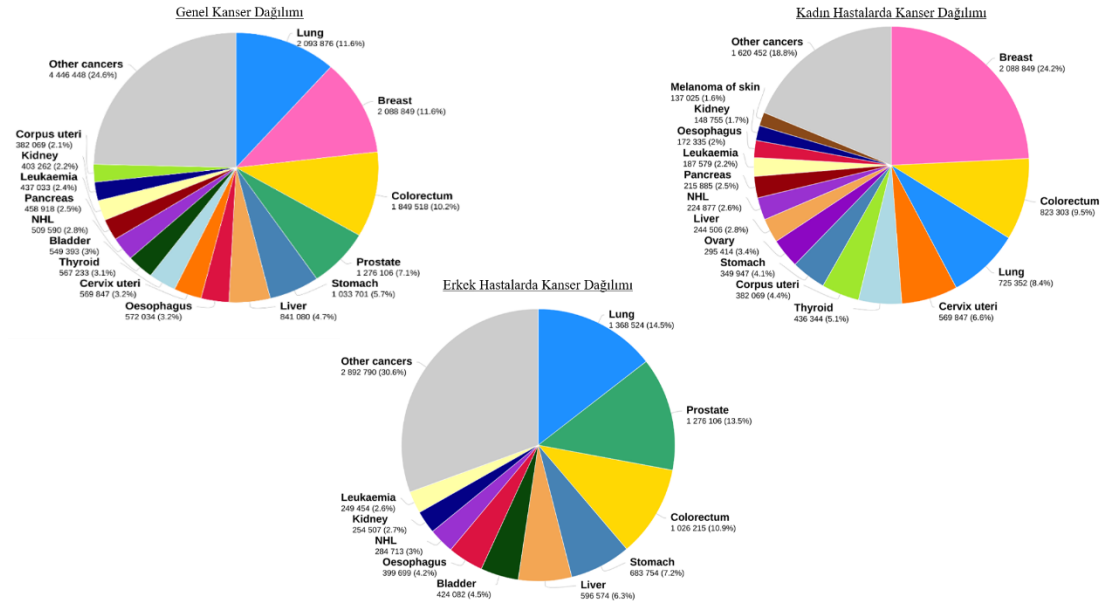
Aynı kanser tipindeki hastalar arasındaki fenotipik ve genotipik çeşitlilik, popülasyondaki intertümör veya hastalar arası heterojenite olarak adlandırılır. Aynı hasta içinde, farklı bölgelerdeki tümörler arasındaki heterojenliği gözlemleyebiliriz; örneğin, intratümör düzeyde hasta içi heterojenite olarak adlandırılan birincil ve metastatik bölgeler ve sonuçta heterojenite görülebilir (R. Fisher et al., 2013). Aynı tümör biyopsisinde yer alan çoklu bölgeler hem genetik hem de epigenetik ifade seviyelerinde farklılıklar gösterebilir. Heterojen mutasyon yapısı tümör hücrelerine spesifik olarak bir takım avantajlar sağlayabilmektedir. Bu avantajlar örnek olarak, çevre koşullarındaki değişimlere uyum gösterebilme ve ilaca karşı direnç gelişimi gösterilebilmektedir (Vasan et al., 2019).

Kanserin yapısındaki bu büyük heterojenite kanserin anlaşılması ve uygun tedavinin seçilmesinde çok daha kapsamlı ve büyük analizlerin yapılması gerekliliğini göstermektedir. Ek olarak hastalığın genel perspektiften çok öznel olarak çok boyutlu analizlenmesini ve kişiye özgü tanı ve tedavinin seçilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bu doğrultuda kanser verilerinin global anlamda bir araya getirilerek, biyoinformatiksel yaklaşım ile genelden özele doğru izlenilecek yöntemlerin araştırılması gerekmektedir.

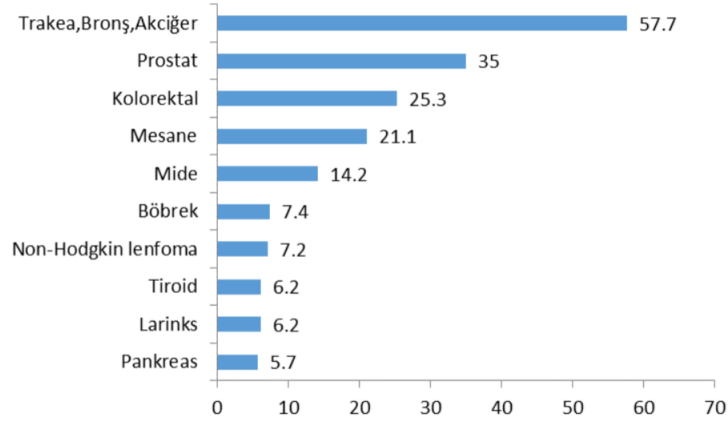
### 2.1.1. Kanser in görölme sıklığı

DSÖ verilerine göre sadece 2018 yılında 18.1 milyon kişi kanser tanısı almıştır. 2040 yılında ise bu sayının 29.5 milyon kişiye ulaşacağı öngörülmektedir (Şekil 1). 2018 yılında kansere dayalı ölüm sayısı dünya genelinde 9.9 milyon kişidir (www.gco.iarc.fr). Kanser dünya genelinde kardiovasküler hastalık grubundan sonra ölüm oranı en yüksek hastalık grubudur (Şekil 1).



Şekil- 1 DSÖ kanser istatistikleri (www.gco.iarc.fr)

Diğer Avrupa ülkelerinde olduğu gibi Türkiye’de de kanser tanısı oranı yıldan yıla katlanarak artış göstermektedir. Kanser çeşitlerine göre ayırılırsa; Türkiye’de erkeklerde en fazla akciğer kanseri görülürken kadınlarda meme kanseri görülmektedir. Böbrek kanserileri erkeklerde 6. sırada yer alırken kadınlarda 12. sırada yer almaktadır (Şekil 2).



**Şekil- 2 Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanser (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2016) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide) (www.saglık.gov.tr)**

Kanser ülkemizde ve dünyada ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Küresel olarak yaklaşık her 6 ölümden biri, ülkemizde ise her 5 ölümden biri kanser nedeniyledir (*Türkiye Kanser İstatistikleri 2016, 2019*). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) Mayıs 2017 verilerine göre ise, Türkiye'de her 5 ölümden 1'i kanser sebeplidir (www.saglık.gov.tr). TÜİK'in verilerine göre, ülkelerin 65 yaş altı kanserden ölüm oranları incelendiğinde 2016 yılında bu oran %28 olarak belirlendi. 65 yaş ve üstü için kanserden ölüm oranları ise, Türkiye'de 2014 yılında %17, 2016 yılında %16 olarak gerçekleşti (*Türkiye Kanser İstatistikleri 2016, 2019*). Amerikan Kanser Derneği'nin 2015'te yayınladığı "Kanser Atlası"na göre, Türkiye'de kanser, her yıl ortaya çıkan 148 bin civarındaki yeni vaka ve 91 bin 800 kansere bağlı ölüm ile kayıtlara geçmiştir.

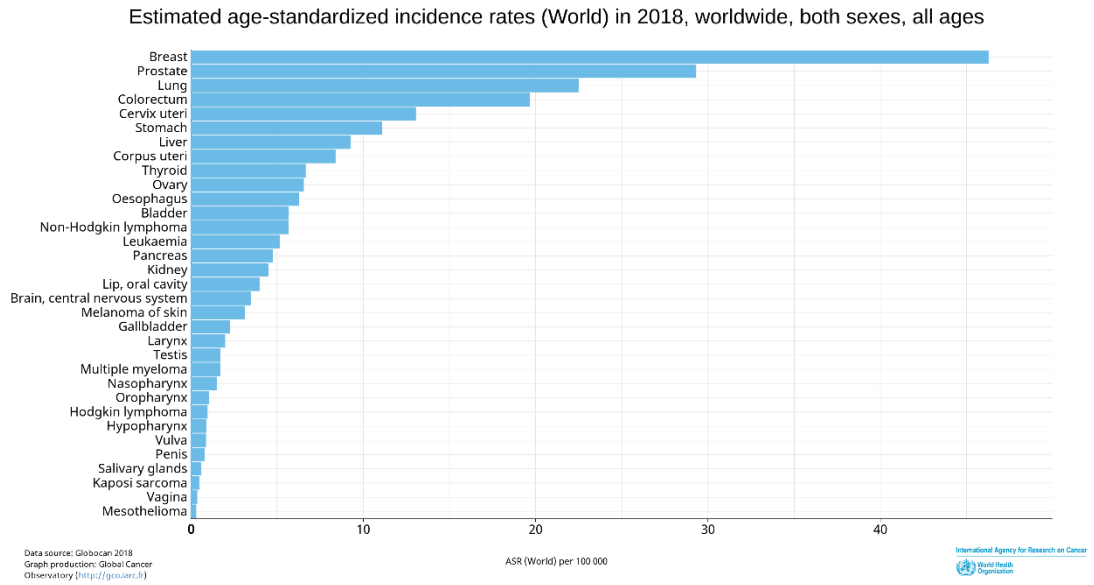
### **2.1.2. Kanserın Hücresel Kökeni ve Gelişimi**

Çoğu kanser türü sadece tek bir hücreden ya da az sayıda hücreden meydana gelmektedir (Cooper, 2018). Bu hücre/hücrelerin yapısal düzenlerinde meydana gelen değişiklikler, hücre bölünmesini, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden genetik süreçlerde meydana gelen modifikasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Kanser gelişim sürecinin ilk basamağı olan tümör oluşumu, tek bir hücrenin anormal şekilde proliferasyonuna neden olan genetik değişimlerin sonucu olarak düşünülmektedir (Graham & Sottoriva, 2017). Hücre

proliferasyonu, klonal olarak çoğalan tümör hücresi populasyonlarının büyümesine neden olmaktadır. Tümör hücre popülasyonlarında genetik değişimler sonucunda oluşan mutasyonların birikmesi ile tümör gelişimi devam eder (Micalizzi et al., 2010). Kanser hücresine seçici bir avantaj sağlayan bu mutasyonlar klonal seleksiyon adı verilen sürecin başlamasına ve çoğalma, hayatta kalma, invazyon ve metastaz kapasitesi artan tümör hücrelerinin seçilmesine olanak tanır (Cooper, 2018). Bu hücreler lokalize oldukları bölgede varlıklarını sürdürdükleri sürece benign tümör olarak adlandırılır. Klonal seleksiyon periyodunun tümör gelişimi boyunca devam ettiği durumda ise, tümör hücresi invaziv nitelik ve daha hızlı büyüme yeteneği kazanmakta ve malign özellik göstermektedir (Cooper, 2018). Malign tümör özelliği gösteren kanser hücresinin köken aldığı dokudan uzaklaşarak lenf ya da kan dolaşımı aracılığı ile uzak organları kolonize ettiği yayılım süreci metastaz oluşumunu ifade etmektedir. Metastatik kanser hücreleri yeni koşullara uyum sağlamakta yetenekli olup, sitotoksik ilaçlar ya da radyasyon tedavileri gibi öldürme çabalarına karşı koymaktadır (Yokota, 2000)

## **2.2. Renal hücreli karsinom**

Böbrek kanseri insidans oranları dünya genelinde oldukça değişkenlik göstermektedir. Amerika birleşik devletlerinde en sık görülen kanser listesinde erkeklerde 6. sırada, kadınlarda ise 8. sırada yer almaktadır. Son üç yılda böbrek kanseri insidansı yılda %2 den fazla artış göstermiştir (van den Berg, 2013). DSÖ verilerine göre dünya genelinde 16. sırada yer almaktadır (Şekil 3). Etiyolojik kökenlerde böbrek kanserlerinin oldukça farklı seviyelerde olması çevresel koşulların, obezitenin, sigara tüketiminin ve hipertansiyonun hastalığın gelişiminde rol aldığını göstermektedir. Renal kanserlerin; ailesinde renal kanser hikayesi olan bireylerde görülme riski normal bir kişiye göre 3 kat daha fazladır (Karner et al., 2009).



**Şekil-3 DSÖ 2018 kanser verileri (www.gco.iarc.fr)**

RHK morfolojik yapısından, tedaviye oluşturduğu yanıtta, moleküler alt yapısına kadar çok değişkenlik gösteren bir hastalıktır.

RHK hastalarının 60%'ı kitle hissi, hematüri ve lokal ağrılar ile sağlık kuruluşlarına gelmektedir. 40%'lık hasta grubunda ise, kısa sürede aşırı kilo kaybı, karında uzun süreli ağrı, ateş ve anoreksia semptomları görülmektedir. Hastaların 33% 'ünde anemi görülmektedir ve yaklaşık yarısında eritrosit sedimentasyon hız artışı mevcuttur (Rathmell & Godley, 2010).

RHK ile birlikte görülen hastalıklar;

1. Von Hippel-Lindau Hastalığı: Serebellum, retina, pankreas, karaciğer ve böbrek yapılarında berrak hücreli kist gelişimi görülür. Hastalık otozomal dominant kalıtım göstermektedir. Kist yapıları genel olarak atipiktir. *VHL* geni aktif görev almaktadır. Hastalıkla karakterize edilen *VHL* geni kromozomal lokasyonu 3p25.5 olarak tanımlanmıştır. Bu gende oluşan germline mutasyonlar hastalığın gelişiminde anahtar model olarak işlev görürler. *VHL* mutasyonları hipoksi indükleyen faktör (HIF), vasküler endotel büyüme faktörü (*VEGF*), platelet sağlayıcı büyüme faktörü (*PDGF*), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- $\alpha$ ) ve eritropoitein (EPO) yapılarının aşırı gen ifadesinden sorumludur (Eichelberg et al., 2009).

2. Edinsel Kistik Hastalık: Polikistik böbrek hastalığına sahip kişiler uzun süreli gördükleri diyaliz tedavisi süresince adenom ya da karsinom geliştirebilirler. Hastalarda bu oran yaklaşık %50'dir. Oluşan tümörlerin genel olarak prolatif özelliği düşüktür.
3. Tuberoskleroz: Karakteristik olarak anjiomyolipom ilişkisi bilinse de RHK'da risk artışı sağlamaktadır.
4. Birt-Hogg- Dube Sendromu: Bu sendroma sahip hastalarda benign deri tümörleri görülür. Hastalığın ilerleyen aşamalarında hastalarda multipl renal tümör gelişimi görülebilmektedir.
5. Kromozom 3 Translokasyonu: Bu translokasyona sahip kişilerde BHTRK görülme riski yüksektir (van den Berg, 2013).
6. Nöroblastom: Nöroblastom tedavisi almış genç hastalarda RHK gelişimi nadir olsa da görülebilmektedir. Gelişen RHK papiller tiptedir.

Prognostik Faktörler;

RHK'da prognoza etki eden klinopatolojik parametreler;

1. Cinsiyet ve Etnik Köken: Erkek hastalarda hastalığın daha kötü prognoz gösterdiği birkaç çalışmada gösterilmiş olsa da, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Hastalığın yapısındaki somatik mutasyon çeşitliliği etnik kökene göre farklılık gösterebilmektedir.
2. Yaş: Hastalık görülme yaşı 50-60 yaş arası olarak görülse de, nadiren genç hastalar mevcuttur. Ancak, ileri yaş ve genç yaş hastalar arasında hastalık seyri, tedavi ve prognozda bir farklılık bulunmamaktadır.
3. Evre: Hastalar tanı aldıkları anda cerrahi bulgular ışığında hastanın uzak metastazı yoksa evreleme yapılmaktadır. Toplam dört evreden oluşmaktadır. Sağ kalım ile evreler arasında kuvvetli korelasyon bulunmuştur (Brooks et al., 2014)
4. Uzak Metastaz: Hasta opere edilirken uzak metastazı olup olmaması en önemli prognostik parametre olarak görülmektedir (Swami et al., 2019) (Tablo 1).
5. Tümör Çapı: Yapılan çok sayıda çalışma göstermiştir ki, tümör çapı 3 cm altında ya da 12 cm üstündeyken sadece prognozla net ilişkisi saptanmıştır. Ara boyutlardaki tümör çapları şu anki çalışmalar ışığında prognozla net bir ilişki göstermemektedir.
6. Renal Ven İnvazyonu: Kötü prognozla doğrudan ilişkisi kanıtlanmıştır. Ayrıca hastalarda nüks görülmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Swami et al., 2019).

7. Renal Pelvis İnvazyonu: Yapılan çalışmalar prognostik bir önem taşımadığını göstermektedir.
8. Mikroskopik Grad: Kesitlerin incelenmesi ile saptanan nükleer grad sağ kalım hakkında bilgi sağlayan önemli bir belirteçtir.
9. Berrak Granüler Sitoplazma Varlığı: Berrak tipteki tümör hücreleri klinik olarak granüler tipe göre daha hafif seyirli olarak kabul edilmektedirler.
10. Mikroskopik Varyantlar: Kötü prognoz ile ilişkilendirilmiş papiller ve içsi hücre yapısı önemli bir parametredir.
11. P53 Aşırı İfadesi: Özellikle erken evre RHK'da p53 pozitifliği metastaz ve kötü sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (Manuscript, 2013).

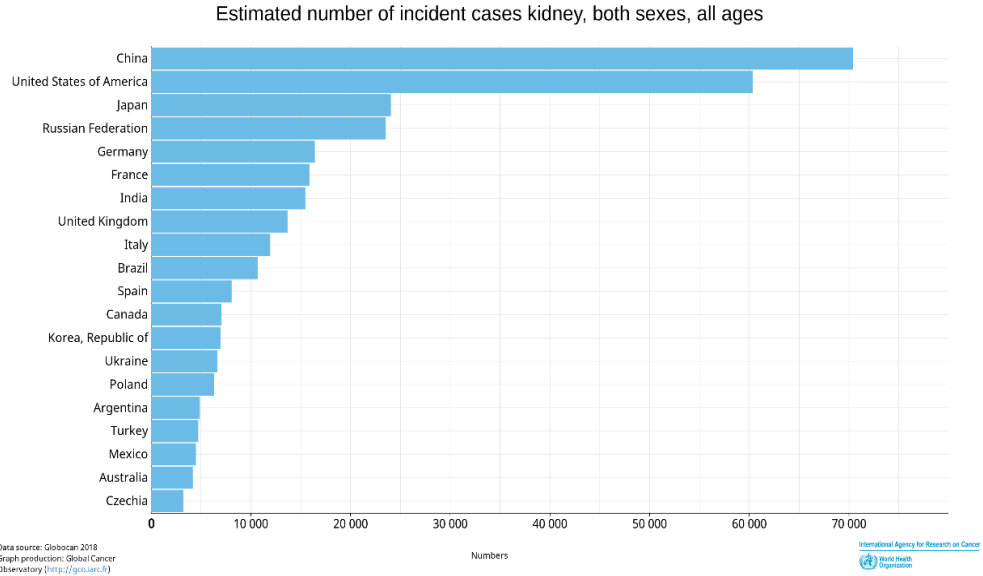
**Tablo-1 RHK'da metastaz bölgeleri**

Renal Hücreli Karsinomda Metastaz	
Akciğer	50-60%
Karaciğer	33%
Kemik	30-40%
Bölgesel Lenf Nodları	15-30%
V.renalis	15-20%
Perirenal Yağ Dokusu	10-20%
Sürrenal Bez	10-15%
V.cava Inferior	8-15%
Kraniyal	10-13%
Böbrek Komşu Organlar	10%
Diğer Böbrek	2%

### 2.2.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Hastalığın görülme yaş aralığı 50 ile 60 yaşlar arasındadır genel olarak orta yaş üstü hastalarda görülmektedir, ancak nadir de olsa erken yaşlarda görülebilmektedir (Feng et al., 2019). Böbreğin tübül epitel yapısından gelişen bir kanser grubudur (Emilio et al., 2019). Yetişkinler arası kanser görülme oranlarında %2-3'lük dilimdedir. Bu orana göre yaklaşık her 100.000 insanda sadece 6'sı bu hastalığa sahiptir (Siegel et al., 2019). Erkeklerde görülme oranı daha sıktır ve insidansı son 3 yılda katlanarak artmaktadır.

Dünya üzerindeki her biocoğrafyada bu hastalığı görmek mümkündür (Sekil 4).



Şekil- 4 RHK'nın ülkelere göre dağılımı ([www.gco.iarc.fr](http://www.gco.iarc.fr))

### 2.2.2. Etiyoloji Ve Risk Faktörleri

Uzun süreli çalışmalar devam etmekte olmasına rağmen hastalığın etiyojisi tam aydınlatılabilmiş değildir (Selli et al., 1983). Ancak şu anki elde edilmiş veriler ışığında en büyük etiyojik etmenin sigara olduğu gösterilmektedir (Selli et al., 1983) Sigara dışında RHK aile hikayesine sahip olma, obezite, hipertansiyon, diabet, böbrek taşları, böbrek infeksiyonları ve travmaları da RHK'da etkili etiyojik nedenlerdendir (Selli et al., 1983).

### 2.3. Renal Hücreli Karsinom Sınıflandırması

Geçtiğimiz yıllarda sınıflandırma sistemlerinde çok fazla yenilenme olmuştur. Ancak, ulusal anlamda en kapsamlı sınıflandırma DSÖ oluşturduğu sınıflandırmadır. İlk sınıflandırma 1997 yılında yayınlanan iki çalışma ile yapılmıştır (Heidelber sınıflandırması ve Amerikan Kanser Ortak Komitesi sınıflandırması) (Prando, 2002). Bu iki sınıflandırma günümüz sistemlerinin de temelini oluşturmaktadır.

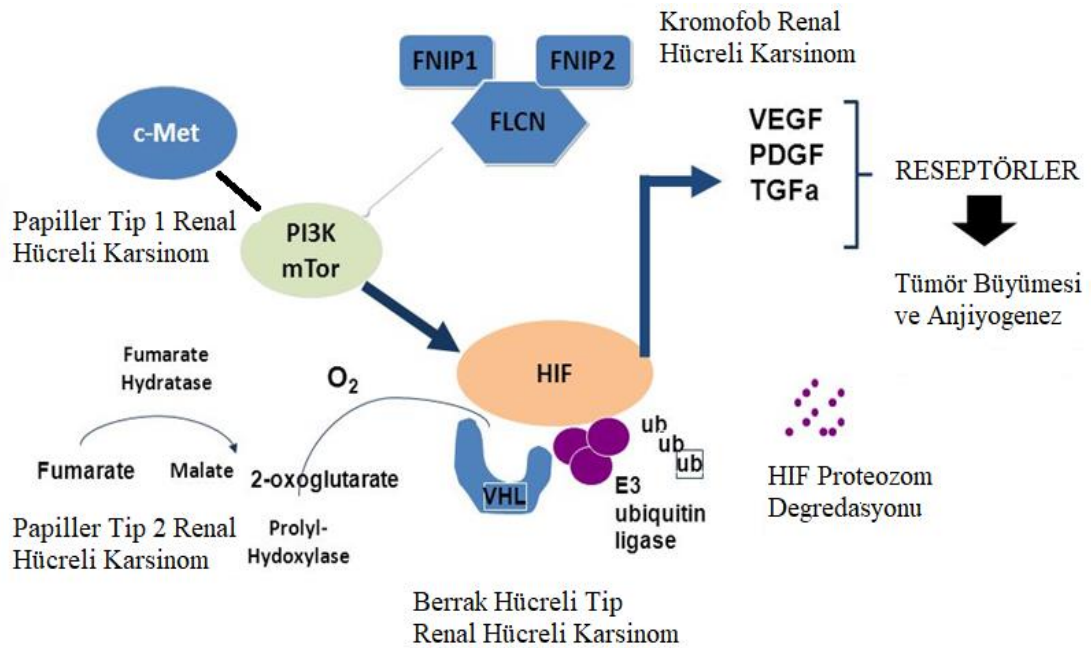
Sınıflandırma çalışmaları ilk olarak 1981 yılında DSÖ böbrek hücre tiplerinin yapısal, fonksiyonel gruplamasıyla başlamıştır (Prando, 2002).



Mainz sınıflaması ise kromofob alt tipinin literatüre katılmasından sonra araştırmacı grubun tümör hücre sitoplazmasını morfolojik ve histokimyasal açıdan incelemesi ile gelişmiştir. Akabinde diğer bir araştırmacı grup 4 yıl ara ile sitogenetik ve moleküler genetik temelli sınıflandırmayı dünya literatürüne sunmuştur (Heidelberg - Roshester Sınıflandırması). DSÖ farklı perspektifteki bu sınıflandırma gruplarını temel alarak 2004 yılında yeni bir sınıflandırma sistemi yayınlamıştır (Rathmell & Godley, 2010).

### 2.3.1. Renal Hücreli Karsinomun Moleküler Sınıflandırması

Böbrek tümörlerinin ışık mikroskopisi ile sınıflandırma DSÖ sistemi ile yapılmaktadır. Son zamanlarda, DSÖ sisteminde tümörün histopatolojik alt tiplerinin tanımı farklı klinik davranış ve altta yatan genetik değişimlere göre yapılmaktadır (Şekil 5). Erişkinlerde böbrek kanserlerinin çoğunluğu, RHK çeşitleridir. RHK'nin prognozunu belirlemek ve tedavi planını yapmak için histopatolojik sınıflandırma çok önemlidir (Padala & Kallam, 2020).



Şekil- 5 RHK'da moleküler sınıflandırma (Suárez et al., 2010)

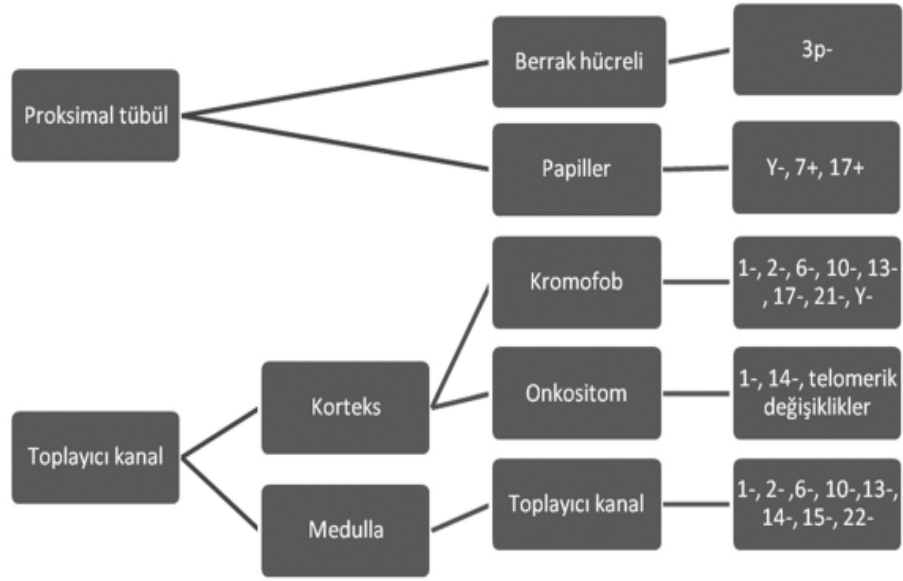
Yeni tümör tiplerinin tanımlanması ve küçük hacimdeki biyopsilerin değerlendirilmesindeki ilerlemeler immünohistokimya yanında gen ekspresyon

çalışmalarının da ortaya çıkmasına neden olmuştur. Gen ekspresyon profili çalışmaları ile bulunan yeni belirteçler, kötü prognozlu hastaların tanımlanmasının yanı sıra hedefe yönelik tedavi temellerinin de geliştirilmesini sağlamıştır. Bundan dolayı, gen ekspresyonuna dayanan sınıflandırmalar RHK'da tanı, prognoz tayini ve tedaviyi planlamada mutlak olarak kullanılmaya başlanmıştır (Casuscelli et al., 2017).

**Tablo-2 Böbrek epitelyal tümörlerinde genetik değişiklikler (Cheng L et al, 2009)**

Tümör tipi	Kromozom	Gen	Mekanizma	Diğer Genetik Değişiklikler
BHTRHK	3p14:2 3p21 3p25	<i>FHIT</i> <i>RASSF1A</i> <i>VHL</i>	Delesyon, mutasyon, metilasyon	+5q22, -6q, -8p12, -9p21, -9q22, -10q, -14q
Papiller böbrek hücreli karsinom	7 17 7q31.1 7q31 Y	<i>FRA7G</i> <i>c-MET</i>	Trizomi Trizomi Kazanç Kazanç Kayıp	+3q, +8, -9p21, +12, - 14q, +16, +17q21 ve +20
Kromofob böbrek hücreli karsinom	1, 2, 6, 10, 13, 17, 21, Y		Multipl kromozom kayıpları	-5q22, -8p, -9p23, -18q22
Onkositom	1, 14 11q13		Kayıp Translokasyon	-1p, -8p, -11q13, 14q, -19q,-21q -X/Y, der(13)t(13:16)(p11; p11), -1q32, -6p, -8p, -9p, -13q, -19q32, -21q
Toplayıcı kanal karsinomu	1, 2, 6, 10, 13q, 13, 14, 15, 22,		Delesyon	-1q32, -6p, -8p, -9p, -13q, -19q32, -21q
Xp11.2 translokasyon karsinomu	1p34 1q21 17q23 17q25 3q23 Xq12	<i>PSF-TFE3</i> <i>PRCC-</i> <i>TFE3</i> <i>CLTC-TFE3</i> <i>ASPL-TFE3</i>	t(X;1)(p11.2;p34) t(X;1)(p11.2;p21) t(X;17)(p11.2;q23) t(X;17)(p11.2;q25) t(X;3)(p11;q23) inv(X)(p11.2;q12)	
Müsinöz tübüler ve iğsi hücreli karsinom	1, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 18, 22		Multipl kromozom kayıpları	-8p, -9p, -11q, +12q, +16q, +17, +20q
Metanefrik adenom	2p13 2p		Delesyon Kısmi monozomi	inv(9)(p12q13), t(1;22)(q22;q13), t(15;16)(q21;p13)

DNA mikro-dizin çalışmaları ile özgün gen ekspresyon profili olan klinik olarak alt tip RHK'ların tanımlanması ile tanıda ve prognozu belirlemede yararlı olacak yeni biyo-belirteçlerin bulunabileceği gösterilmiştir (Tablo 2). Her ne kadar her bir vaka için gen profiline göre özgün bir sınıflama kriteri olmasa da, klinik davranış ve prognoza göre moleküler sınıflama yapılabilecekler içinde, RHK en iyi adaylardan biri olarak görülmektedir (Şekil 6) (Casuscelli et al., 2017). Mikro-dizilim çalışmaları bizim böbrek tümörlerinin patogenezi, prognozu ve tedavisi hakkındaki bilgilerimizi artırmıştır.



**Şekil-6. RHK'da moleküler sınıflandırma**

### 2.3.2. Renal Hücreli Karsinomun Histolojik Sınıflandırılması

RHK'da histolojik parametreler ışığında üç ana sınıflandırma yapılmıştır (Tablo 3).

**Tablo-3 RHK'da histolojik sınıflandırma**

Histolojik Alt Tip	RHK içindeki oranı	Histolojik Özellikleri	Saptanan Moleküler Genetik Değişiklikler
BHTRHK	%80-90	Genellikle berrak, bazıları eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşur. Solid tübüler veya kistik gelişme paterni görülebilir.	Kromozom 3p de <i>VHL</i> gen mutasyonu görülür. Kromozom band 5q22 bandında dublikasyon, kromozom 6q, 8p, 9p ve 14q delesyonu görülmektedir.
Papiller RHK	%10-15	Çoğunlukla dar sitoplazmalı küçük hücrelerden oluşur. Bazofilik, eozinofilik veya soluk boyanma özellikleri gösterebilir. Papiller yapılar genellikle hakimdir. Ancak tübüler papiller veya solid gelişme gösterebilir. Nekroz odakları sık görülür. Küçük ve soluk sitoplazmalı (Tip 1) ve büyük ve eozinofilik sitoplazmalı (Tip 2) olarak iki alt tipe ayrılır. Tip 2 daha kötü klinik seyir göstermektedir.	En sık gölülen genetik değişiklikler; kromozom 7, 8, 12, 16, 17 trizomisi, kromozom 3q, ve Y kromozom kaybıdır.
Kromofob RHK	%4-5	Soluk ve eozinofilik granüler sitoplazmalı hücrelerden oluşur. Genellikle solid tabakalar oluşturur.	1, 2, 6, 10, 13 ve 17. kromozomlarda kayıp kombinasyonları görülebilir.

#### 2.3.2.1. Berrak Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinoma

BHTRHK, RHK'ların %80'lik kısmını oluşturmaktadır. Genel olarak tek bir tümör yapısında gelişmekle birlikte nadir de olsa birden fazla tümör yapısı görülen hastalar da mevcuttur (Rathmell & Godley, 2010). Tümör yapısına bağlı olarak böbrek yapısında nekroz ve kanama görülebilir. Hastaların çoğunda böbrek ile sınırlıdır. Renal sinüs adipoz doku tümörün böbrek dışına yayılmasında kullanılan en etkin yoldur. Sinüzoidal tip ince damarlanma bu tip tümör grubunda karakteristiktir (Tablo 3). Tümör genelinde sitoplazma şeffaf yapıda olduğundan berrak tip olarak

adlandırılırlar. Bazı tümör hücrelerinde eozinofilik sitoplazma olabilir. Tümör gelişimi *VHL* geni 3p kromozom kaybıyla karakteristiktir.

### **2.3.2.2. Papiller Renal Hücre Karsinomu**

En sık görülen ikinci tip RHK'dır. Tüm RHK'lar arasında %1-5'lik kısmı oluşturmaktadır (Rathmell & Godley, 2010). Bölgesel lenf bezlerine metastaz yapabilme özelliğine sahiptir. Nadiren de olsa böbrekte gelişen tümörden daha ileri evre tümör grubu bu hastalarda lenf düğümlerinde görülebilmektedir (Tablo 3). Hastalarda bol miktarda kanama ve nekroz oluşumu gözlenmektedir. Tümör kitleleri dışı doğru katı yapıdayken tümör merkezi sıvıda asılı tümör hücrelerinden oluşmaktadır. Papilla oluşumu en karakteristik özellikleridir. Ayrıca tubulopapiller formlar ve tübül oluşumu gösterebilirler. Morfolojik olarak Tip 1 ve Tip 2 olarak ikiye ayrılmaktadır (van den Berg, 2013).

### **2.3.2.3. Kromofob Renal Hücreli Karsinom**

Kromofob üçüncü sırada gelen RHK tipidir. Tüm RHK arasında %1-5'lik kısmı oluşturmaktadır. Kromofob RHK morfolojik olarak ten rengine yakındır. Bu RHK grubu yumuşak katı tümörlerden meydana gelmektedir. Kalın kan damarları tümör hücreleri arasında bulunmaktadır. Organeller hücre zarına doğru çekilmiştir, çekirdek bu yüzden belirgindir (Tablo 3). Tümör çekirdekleri hiperkromatik olma eğilimindedir, sıklıkla çift çekirdeklidir ve genellikle buruşuk bir nüklear zara sahiptir (Savage, 1994).

### **2.3.2.4. Beeline Toplayıcı Duktus Karsinom**

RHK içerisinde ki %1'lik kısmı oluşturmaktadır. Nadir görülen agresif bir RHK'dır. Tümör böbrek medullarından kaynak alır ve genel olarak lokalizasyonu böbreğin orta kısmıdır. Nekroz, lenf yayılımı, kötü prognoz tümörün genel özellikleridir (Karner et al., 2009). Hastaların genel sağ kalımı oldukça azdır.

### **2.3.3. Renal Hücreli Karsinomun Histopatolojik Sınıflandırma**

Böbrek tümörlerinin histopatolojik çeşitliliği son yirmi beş yılda giderek daha fazla farkedilmektedir. 1986 Mainz, 1997 Heidelberg ve 1998 DSÖ sınıflandırmalarının ardından 2004 DSÖ sınıflandırmasıyla farklı alt tipler belirlenmiştir (Padala & Kallam, 2020) (Tablo 4). Gerek lokalize gerekse ileri evre tümörlerde farklı histopatolojik türlerin klinik yaklaşımı ve uygulanacak tedavi seçeneğini değiştirebileceği gerçeği sınıflandırma çabalarını etkilemektedir. Benign ve

malign tümörlerin ayırt edilmesi, farklı prognozlara sahip alt tiplerin belirlenmesi bakımından böbrek tümör dokusunun histopatolojik incelemesi önemlidir. Tümörün yeterince ve farklı makroskopik görünümdeki alanlardan örnekler alınarak incelenmesi tip tayininde gereklidir. Tümörün yerleşim yeri, kapsül varlığı, çevre böbrek dokusu ile ilişkisi, bazı durumlarda tipinin belirlenmesinde önemli ipuçları verebilir. Kistik böbrek kitleleri veya son dönem böbrek nedeniyle uygulanan nefrektomi materyallerinin incelenmesinde de tümör olasılığı akılda tutulmalıdır (Brooks et al., 2014). Metastatik böbrek tümörleri veya küçük böbrek kitleleriyle karşımıza çıkan hastalarda uygulanan iğne biyopsileri değerlendirilirken böbrek tümörlerindeki çeşitlilik göz önüne alınmalıdır. Alışılmamış morfolojideki tümörlerde immünohistokimyasal inceleme histopatolojik sınıflandırmaya yardımcı olmaktadır. Genetik ve moleküler çalışmalar ise patogenezin anlaşılmasına katkıda bulunurken tümör tipinin belirlenmesinde de kullanılabilir. Bu çalışmalar aynı zamanda bireye özgü ve hedefe yönelik tedaviye ışık tutacaktır.

**Tablo-4 Renal tümörlerinin histopatolojik sınıflandırması (Padala & Kallam, 2020)**

<b>Renal Tümörlerin Histopatolojik Sınıflandırması</b>	
<b>Malign</b>	Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom, Multiloküler berrak hücreli böbrek hücreli karsinom, Papiller böbrek hücreli karsinom (Tip 1 ve Tip 2), Kromofob böbrek hücreli karsinom, Bellini'nin toplayıcı kanal karsinomu, Renal meduller karsinom, Xp11 translokasyon karsinomları, Nöroblastom sonrası gelişen karsinom, Müsinöz tübüler ve içsi hücreli karsinom, Sınıflandırılmayan böbrek hücreli karsinom
<b>Benign</b>	Papiller adenom Onkositom
<b>Metanefrik tümörler</b>	Metanefrik adenom Metanefrik adenofibrom Metanefrik stromal tümörler
<b>Mikst mezenkimal ve epitelyal tümörler</b>	Kistik nefroma Mikst epitelyal ve stromal tümör Sinovyal sarkom
<b>Nefroblastik tümörler</b>	Nefrojenik kalıntılar Nefroblastom Parsiyel farklılaşma gösteren kistik nefroblastom
<b>Nöroendokrin tümörler</b>	Karsinoid Nöroendokrin karsinom Pirimitif nöroektodermal tümör
<b>Diğer tümörler</b>	Mezenkimal tümörler Hematopoietik ve lenfoid tümörler Germ hücreli tümörler Metastatik tümörler

#### **2.3.4. Renal Hücreli Karsinom'da TNM Sınıflandırması**

Patologlardan oluşan kalabalık bir araştırma ekibi 1969 yılında sağ kalımı baz alan şematik bir evreleme tablosu yayınladılar. Sonraki yıllarda American Joint on Cancer ve Union Internationale Contre le Cancer birlikte hazırladıkları, Tümör Nod Metastaz (TNM) evreleme şeması literatüre sunuldu (Swami et al., 2019). Bu şemaların ilerleyen zaman ve çalışmalarla modifiye edilerek kullanımlarına devam edilmektedir.

T:Primer tümör:

Tx Primer tümör saptamak için veriler yeterli değildir.

T0 Primer tümöre ait kanıt yok

T1 Tümör en büyük boyutu  $\leq 7$  cm, böbrek içinde sınırlıdır.

T1a Tümör büyük çapı  $\leq 4$  cm'dir.

T1b Tümör büyük çapı  $>4\text{cm}$ ,  $\leq 7\text{cm}$ 'dir.

T2 Tümör en büyük boyutu  $>7\text{ cm}$ , böbrek içinde sınırlıdır.

T2a Tümör büyük çapı  $>7\text{cm}$ ,  $\leq 10\text{cm}$ 'dir.

T2b Tümör büyük çapı  $>10\text{ cm}$ 'dir.

T3 Tümör major venlere yayılmış veya sürrenal bezi veya perinefrik dokuları tutmuş ancak gerotafasyasını aşmamıştır.

T3a Tümör renal ven veya segmental dallarını tutmuş veya perirenal ve/veya renal sinüs yağlı doku invazyonu mevcuttur.

T3b Tümör Vena Kava'yı diafragma altında gros olarak tutmuştur.

T3c Tümör Vena Kava'yı diafragma üstünde gros olarak tutmuş veya Vena kava duvar invazyonu mevcuttur.

T4 Tümör gerota fasyasını aşmıştır (İpsilateral adrenal invazyonu).

N:Bölgesel Lenf Nodları:

Nx Bölgesel lenf nodlarını saptamak için veriler yeterli değildir.

N0 Bölgesel lenf nodlarında metastaz yoktur.

N1 Tek bir lenf nodunda metastaz vardır.

N2 Birden fazla lenf nodunda metastaz vardır.

M:Uzak Metastaz:

Mx Uzak metastazı saptamak için veriler yeterli değildir.

M0 Uzak metastaz yoktur.

M1 Uzak metastaz vardır.

### **2.3.5. RHK'da tümör derecelendirme sistemleri (Fuhramn)**

Tarihte RHK sınıflandırılması için tümör hücrelerinin nükleer, sitoplazmik ve yapısal özelliklerini kullanan birçok sistem ortaya atılmıştır (Qayyum et al., 2013). Ancak ilk kabul görülen sınıflandırma 1932 yılında Hands ve Broders adlı araştırmacıların geliştirdiği sınıflama şeklidir. 1971'de Skinners ve ekibi nükleer yapı ve sağ kalım arasındaki ilişkiyi temel alarak yeni bir sınıflama sistemi oluşturmuşlardır. Fuhramn ve ekibinin nükleer yapı, kontur ve büyüklük parametrelerine göre yapmış olduğu sınıflandırma günümüzde aktif olarak kullanılmaya devam edilmektedir (Qayyum et al., 2013) (Tablo 5).



**Tablo-5 RHK'da Fuhrman derecelendirmesi**

Fuhrman Çekirdek Derecesi	Tanım
Derece 1	Tümör çekirdeği 10 µ çapında, yuvarlak, uniform ve çekirdekçik yok ya da çok küçük yapıda;
Derece 2	Tümör çekirdeği yaklaşık 15 µ çapında, hafif düzensiz sınırlı, ancak 400 büyütme ile görülebilen çekirdekçiğe sahiptir.
Derece 3	Tümör çekirdeği yaklaşık 20 µ çapında, belirgin derecede düzensiz sınırlı, 100 büyütme ile bile görülebilen büyük çekirdekçiklere sahiptir.
Derece 4	Tümör çekirdeği derece 3'e benzer, çok çekirdeklidir ya da garip şekilli olup kromatin kabalaşması olabilir.

#### **2.4. Berrak hücreli tip renal hücreli karsinom**

RHK bugüne kadar en sık görülen böbrek kanseri formudur. On böbrek kanseri vakasının 8-9'u RHK'dır (van den Berg, 2013). BHTRK bu grubun etnik kökenler arası değişimle beraber 60% - 80% 'lık kısmını oluşturmaktadır. Histolojik açıdan BHTRK, şeffaf sitoplazmadan oluşan kanser hücreleri ve etraflarını saran yoğun endotel ağları ile karakterizedir (Karner et al., 2009). BHTRK erkek ve kadınlarda en sık görülen on kanser türü arasında yer almaktadır (Woldrich et al., 2008). BHTRK'nın insidansı geçtiğimiz 30 yılda oldukça büyük bir artış göstermektedir. Bu artışın bir nedeni de gelişen teknolojiye dayalı olarak hastalığın daha iyi ayırt edilebilmesidir. Hastalık insidansının hızla artmasına rağmen, genel sağ kalım oranı konusunda oldukça az gelişme olmuştur (Emilio et al., 2019). Cerrahi eksizyon yöntemleri şu an için etkin tedavide en önemli yoldur. Metastatik grubun tedavisi oldukça güçtür. Metastatik hastalarda 5 yıllık genel sağ kalım oranı %10'dan düşüktür.

BHTRK'ların yaklaşık %85'inde *VHL* genindeki bialellik inaktivasyon tespit edilmiştir ve bu yüzden *VHL* geni hastalıkla karakterize hale gelmiştir (Duns et al., 2012). *VHL*, 3. kromozomun p25 bölgesinde lokalize bir gendir. *VHL* genindeki somatik mutasyonlar ve/veya promotör hipermetilasyonu sonucu gen ifadesini azalmasına yol açmaktadır (Duns et al., 2012). *VHL* gen inaktivasyonu HIF yolağı üzerindeki kontrol mekanizmasının ortadan kalkmasına ve hücrenin hipoksik durumdaki fonksiyonlarının aktivasyonuna sebep olmaktadır. Artan anjiyogenez ve metabolizma faaliyetleri tümör gelişimini log fazında büyümeye sokmaktadır. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar *PBRM1*, *SETD2*, *KDM5c* ve *BAP1* tümör baskılayıcı genlerinin de inaktive edildiğini göstermektedir (Duns et al., 2012). İlgili genlerin aynı zamanda histon modifikasyonu ve kromatin yapılanmasında görev

almaları, BHTRK hastalığının metabolik ve epigenetik etkileşimlerden de etkilendiğini gösteren kompleks yapılu bir hastalık olduğunu göstermektedir. 3p kromozom kaybı dışında BHTRK’da kayda geçmiş başka değişim ve kayıplar da mevcuttur; bunlar 5q (Gunawan et al., 2013), 8q (Klatte et al., 2011), 8p (Elfving et al., 2016) ve 9p (Sanjmyatav et al., 2013) ve 14q (Kroger et al., 2009) kayıplarıdır. Bunlara ek olarak hastalık içi heterojenite kendini tümörün tamamında da göstermektedir. BHTRK tümörünün farklı bölgelerinden alınan hücre örnekleri arasında somatik mutasyon sayısı bakımından farklılıkların tespit edildiği gösterilmiştir (Nickerson et al., 2008). Heterojenitenin çok yüksek olması hastalığın tedavisindeki yavaş ilerlemeyi açıklamaktadır (Marco Gerlinger et al., 2015).

BHTRK’da yapılan birçok kapsamlı çalışmada ortak olarak tespit edilen *VHL* gen inaktivasyonudur. *VHL* gen inaktivasyonu olmayan hasta grubunda hastalığın nasıl geliştiği ve hangi sinyal yollarının indüklendiği bilinmemektedir. Aydınlatılmamış bu süreç uygun tedavi modeli geliştirmenin önünde büyük bir engel olarak bulunmaktadır.

Heterojenitenin yüksekliği bu hastalığın çok daha büyük hasta gruplarıyla yapılması gerektiğini göstermektedir. Bu yüzden bu hastalığın biyoinformatiksel olarak meta verilerinin analizi hastalığın tedavisi için metodların geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

#### **2.4.1 Hastalığın Evreleri**

Tümör evresi, tümör hücrelerinin ilerlemesini tarif eder ve evrensel olarak kabul gören parametreler ile yapılmaktadır. TNM BHTRK’da kullanılan en yaygın evreleme sistemidir (Antonelli et al., 2010). Tümörler üç ana değer ile I-IV arası derecelendirilir. T, primer tümörün boyutunu ve yayılma derecesini verir. N, tümörün bölgesel olarak lenf düğümlerine yayılma yapıp yapmadığını göstermektedir ve M, tümörün uzak metastaz yapıp yapmadığını gösterir. I. Derece hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık 80%-95% ile en iyi prognoza sahiptir. II. Derece hastaların 80% ve III. Derece hastaların 60%’lık bir sağ kalım oranı mevcuttur. Derece arttıkça korele olarak sağ kalım oranı düşmektedir. Tanı anında hastaların 75%’i metastatik olmayan tümörlere sahiptir (Swami et al., 2019). Parsiyel (böbrekten tümörlü bölgenin çıkarılması) veya radikal (böbreğin çıkarılması) nefrektomi lokalize hastalık için altın

standart olarak görülmektedir. Yapılan farklı klinik tedaviler parsiyel nefrektomiye daha öne çıkarmaktadır.

#### **2.4.2 Klinik Prognoz ve Moleküler Belirteçler**

BHTRK yapısı gereği yavaş büyüme gösteren lokal tümörlerden oldukça agresif metastatik tümörlere kadar geniş bir perspektif çizmektedir. BHTRK hastaları hem kemoterapiye hem de radyoterapiye dirençlidirler. Bu yüzden nefrektomi, tedavide altın standartlığını korumaktadır. Rutin klinik kullanımda prognostik biyobelirteçler arasında tümör evresi, histolojik derece, nekroz ve laktat dehidrojenaz, hemoglobin, trombosit ve kalsiyum seviyelerini ölçen testler kullanılır. Diğer belirteçler yapılmışsa daha önceki nefrektomi durumu, hastanın semptomları ve performans durumları ölçülür (Motzer et al., 2013). SSIGN adlı model Mayo kliniği tarafından geliştirilmiş yukarıdaki tüm parametreleri içeren bir testtir. Her hasta için aynı klinik parametreler tanı ve tedavide kullanılamaz. Bu yüzden hastalığı moleküler prognostik belirteçlerle incelemek önemlidir ve bu durum tedavi modelinin şekillenmesinde büyük katkı oluşturmaktadır. Moleküler biyobelirteçlerin tedavideki önemine örnek olarak meme kanserinde kullanılan gen ekspresyonuna dayalı ticari panel hastaları prognostik gruplara ayırmada kullanılmaktadır (Casascelli et al., 2017). Çoklu biyobelirteç çalışmaları BHTRK içinde yapılmaktadır. Aralarında en çok kabul görenler *VHL* genini hedefleyen ve *VHL* geni ile ilişkili diğer genleri kapsayan çalışmalardır.

#### **2.4.3 Tedavi Hedefleri**

BHTRK'nın moleküler alt yapısını anlamaya dayalı yapılan çalışmalar hedef tedavilerin gelişmesine olanak sağlamaktadır. VEGF ve m-TOR yolağını hedef alan tedavi yaklaşımı çoklu antianjiyogenik ilaçların (sunitinib, sorafenib, pazopanib, everolimus ve bevacizumab) uygulanmasına yol açmıştır. Sitokin tedavisine göre VEGF hedefli tedaviler katı tümörlerde daha güçlü yanıtlar alınmasını sağlamıştır (Grimm et al., 2010). VEGF inhibitörlerine dayalı tedavi cevabı alınma oranı %10 - %50 arasındadır. m-TOR hedefli tedaviler BHTRK'da VEGF hedefli tedavilere göre daha az etki göstermektedirler (Bellmunt et al., 2009). Hedefe yönelik tedavilerin cevap oranlarında nicel anlamda artışlar saptanmasına karşın, RCC hücrelerinin spesifik tedavi hedeflemesinde bilinmezlikler hala mevcuttur (Rini & Atkins, 2009). Ayrıca kullanılan bu ilaçlara bağlı toksite belirgin bir endişe olmaya devam

etmektedir (van den Berg, 2013). m-TOR ve VEGF odaklı ilaç tedavilerine direnç gelişimi gözlenmiştir (Rini & Atkins, 2009). Hastaların tedavi, direnç ve toksisiteye karşı göstermiş oldukları cevap farklılıkları hastalığın altındaki genetik heterojenite ile ilişkilendirilmiştir (Dalgliesh et al., 2010). Genetik alt yapının açığa çıkarılması hastaya özgü tedavi modeli gelişiminde büyük öneme sahiptir.

#### **2.4.4 Kromozomal Aberasyon**

Kromozom yapı ve sayısında meydana gelen değişimlerin tümü bu gruba girmektedir. BHTRK'ya karakterize 3p somatik mutasyonları dışında hastalığın gelişiminden ilerlemesine kadar olan süreçle ilişkili birçok başka genetik sapmalar mevcuttur (Burrell et al., 2013). Floresan in-situ hibridizasyon (FISH), karşılaştırmalı genomik Hibridizasyon (CGH) ve tek nükleotit polimorfizmi (SNP) teknikleri BHTRK'da bulunan kromozomal sapmalara ışık tutmuştur (Rydzanicz et al., 2009). Hastalığın prognozunun daha iyi anlaşılabilmesi için, araştırmacılar BHTRK hastalığındaki diğer kromozom anomalilerin etkisini araştırmışlardır. 3p kromozom kaybı ve/veya 14q kromozom kaybı olan hastaların karşılaştırıldığı bir çalışmada, elde edilen sonuçlara göre, sadece 3p kromozom kaybı olan hastaların klinik seyri 14q kromozom kaybı olan hasta grubuna göre daha iyi olarak kaydedilmiştir. Her iki kromozom kaybını barındıran hastaların ise, en kötü sağ kalım ve prognoza sahip oldukları tespit edilmiştir (Chen et al., 2009). Diğer bir çalışmada 5q kromozom insersiyonu olan hastalarda altmışa yakın gende ifade artışı olduğu ve bu hastaların klinik seyrinin daha iyi olduğu gözlenmiştir (Gunawan et al., 2003). 9p kromozom kaybı birçok araştırmacı tarafından kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Sanjmyatav et al., 2001). 4p ve 14q kromozom kayıpları da kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. 8. kromozomun q kolundaki bir insersiyonun birbirinden bağımsız iki farklı çalışmada da hasta sağ kalımını negatif etkilediği gösterilmiştir (Karner et al., 2019). Belirtilen ve araştırmaları devam eden tüm kromozom anomalileri tümör supresör genler ve / veya onkogenler ile ilişkilidir.

#### **2.4.5 Transkriptomiks**

Gen ekspresyon analizi hücrenin fenotipik etkilerinin anlaşılmasında oldukça önemli bir metottur. Birçok mRNA düzeyindeki çalışma BHTRK'nın fenotipik seviyede genlerle ilişkisine ışık tutmuştur. Hastalarda yapılan mRNA seviyesine dayalı çalışmalar hastaların böbrek fonksiyon kaybı, düşük metabolizma ve düşük

seviye immün aktivasyon gibi fenotipik parametreleri baz alındığında ilişkisi tanımlanan yüzlerce gen tespit edilmiştir (Zhou et al., 2001). Global veri bankası tarafından profillemiş 537 hasta üzerindeki çalışmada 186 farklı gende istatistiksel olarak anlamlı ifade değişikliği belirlenmiştir (Yange et al., 2007). Örneğin *CD31*, *EDNRB* ve *TSPAN7* genlerinin ifade artışı iyi prognoz ile korele olduğu saptanmıştır (Wuttig et al., 2012). *VCAM1*, *EDNRB* ve *RGS5* genlerinin ifade artışlarının prognozu tahmin etmede etkili olduğu ve artan ifadelerinin iyi prognozla korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Yao et al., 2008). Genlerin ifade seviyelerine dayalı fenotipik yaklaşım hastaların prognozunu ön görmede ve dahası moleküler alt gruplama ile hastaya kişiye özgü etkin tedavi verebilme olanağı sunmaktadır.

#### **2.4.6. Berrak Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinom'da Genlerin Rolü**

BHTK vakalarının % 90'ında *VHL* genindeki somatik / germline mutasyonlar ve 3p koromozom kaybı gözlemlenmektedir (Wierzbicki et al., 2019). Bu durum *VHL* genini BHTK çalışmalarında üstünde durulması ve sahip olduğu genetik ve epigenetik etkilerin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Yapılan moleküler yolak çalışmaları ışığında BHTRHK gelişiminde *VHL* doğrudan *HIF1A* geni ile etkileşim halinde olduğu analiz edilmiştir. Bu durum BHTRHK'nın moleküler alt yapısının anlaşılmasında *HIF1A* geninide önemli kılmaktadır (Guo et al., 2012). *VHL* ve *HIF1A* genlerine ek olarak in silico analizler sonucu *VHL* ve *HIF1A* geni ile hücrel stres cevabı oluşturulmasında birlikte çalışan *KAT5* geni bu çalışma dahilinde BHTRHK'nın moleküler yapısının anlaşılmasında aday gen olarak seçilmiştir (Perez-Perri et al., 2016). P53 geninin aşırı ifadesinin BHTRHK'da kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Wierzbicki et al., 2019). Bu bağlamda *p53* düzenleyicisi olan *KAT5* geni bu açıdanda BHTRK kapsamında çalışılması önem arz eden genler arasındadır.

##### **2.4.6.1 HIF1A**

*HIF1A*, hipoksiye hücrel ve gelişimsel yanıtın ana transkripsiyonel regülatörü olarak kabul edilmektedir (Karner et al., 2009). *HIF1A*'nın hipoksi veya genetik değişimler tarafından düzensizleştirilmesi ve aşırı ekspresyonu, kanser biyolojisinde (vaskülarizasyon, anjiyogenez, enerji metabolizması, hücre hayatta kalması ve tümör invazyonu alanlarında) ve bir dizi farklı patofizyolojide büyük rol oynamaktadır (Wierzbicki et al., 2019). *HIF1A* polipeptidi, bir nükleer lokalizasyon

sinyal motifi, iki transaktive edici CTAD ve NTAD alanı ve CTAD ve NTAD'ın transkripsiyonel aktivitelerini baskılayabilen inhibitör domain bölgesi içerir. Alternatif birleştirme ile oluşturulan toplam üç HIF1A izoformu vardır.

*HIF1A* ekspresyon seviyesi, GC açısından zengin promotör aktivasyonuna bağlıdır (Krieg et al., 2000). Çoğu hücrede, *HIF1A* geni normal oksijen seviyesi koşulları altında yapısal olarak düşük seviyelerde eksprese edilir (Krieg et al., 2000). Ancak hipoksi altında *HIF1A* transkripsiyonu genellikle önemli ölçüde artış gösterir. *HIF1A* tipik olarak oksijene bağımlı metabolik yolları düzenleyen en önemli düzenleyici gendir. *HIF1A* ekspresyonu redoks tepkimelerine duyarlı bir mekanizma ile ifade artışına geçebilmektedir (Jewell et al., 2001).

*HIF1A*, memelilerde sistemik oksijen düzeylerine hücresele yanıtta önemli bir rol oynar (Wu et al., 2018). *HIF1A* aktivitesi, hidroksilasyon, asetilasyon ve fosforilasyon gibi bir dizi post-translasyonel modifikasyon ile düzenlenir. HIF1A'nın, hipoksik bölgelere oksijen verilmesini desteklemeye ve arttırmaya yardımcı olan anjiyogenez ve eritropoez gibi biyolojik işlemlerde yer alan *VEGF* ve eritropoietin dahil 60'tan fazla genin transkripsiyonunu indüklediği bilinmektedir (Karner et al., 2019). Ayrıca HIF1A hücre çoğalması ve canlılığı ile glikoz ve demir metabolizmasında rol alan genlerin transkripsiyonunu indükler. Dinamik biyolojik rolüne uygun olarak HIF1A, sistemik oksijen seviyelerine konformasyonel değişiklikler yaparak yanıt verir ve transkripsiyonu indüklemek için hipoksiye duyarlı genlerin promotörleri ile ilişki halindedir.

*HIF1A* transkripsiyonel aktivitesi özellikle oksijen seviyesinden etkilenir. Alfa alt birimi, beta alt birimi ile bir heterodimer oluşturmaktadır. Normal koşullar altında, *VHL* aracılı ubiquitin proteaz yolu HIF1A'yı hızla bozar, bununla birlikte hipoksi altında HIF1A protein yıkımı önlenir ve HIF1A seviyeleri hedef genler üzerinde transkripsiyonel roller uygulamak için HIF1B ile birleşmek üzere birikmektedir (Iyer et al., 1998).

Oksijen sensörü dioksijenazın enzimatik aktivitesi, HIF1A'nın prolin kısmına transfer etmek için ana substratlarından biri olarak oksijene ihtiyaç duyar, bu yüzden oksijen seviyesine bağlı aktivasyon göstermektedir. HIF1A'nın hidroksillenmiş prolin kısmı daha sonra *VHL* geni tarafından tanınır ve kendisi ubiquitin ligaz enziminin bir parçası olan von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı proteininin hidrofobik kısmına

bağlanmaktadır. HIF1A prolin kalıntısının hidroksilasyonu ayrıca hipoksi altındaki ko-aktivatörlerle birleşme yeteneğini de düzenlemektedir.

Yaralanma sonrası normal koşullarda HIF1A, prolin hidroksilazlar (PHD'ler) tarafından bozunmaktadır. Bilim insanları, *HIF1A*'nın PHD inhibitörleri yoluyla sürekli ifade artışının, onarım yanıtı olarak memelilerde kayıp veya hasarlı dokuyu yeniden oluşturduğunu tespit etmişlerdir. *HIF1A* geninin ifadesinin düzenlenebilmesi, memeli rejenerasyonunun temel süreçlerini kapatabilir veya açabilir özellikte görev almaktadır (Rathmell & Godley, 2010). *HIF1A*'nın dahil olduğu başka bir rejeneratif süreç periferik sinir rejenerasyonudur. Akson hasarını takiben HIF1A, yenilenmeyi ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklemek için *VEGF*'yi aktive eder (Heng et al., 2009).

PHD'ler, HIF1A'yı hidroksile etmek için demir içerikli birleşikler kullanır. Bu nedenle, desferrioksamin gibi demir şelatörlerin HIF1A stabilizasyonunda başarılı oldukları kanıtlanmıştır (Shuliang Chen, Peter Novick, 2017).

*HIF1A* birçok kanser türünde aşırı eksprese edilir. *HIF1A* aşırı ekspresyonu, anjiyogenezin başlatılması ve hipoksinin üstesinden gelmek için hücrel metabolizmanın düzenlenmesindeki rolü ile tümör büyümesini ve metastazını teşvik etmede büyük rol oynamaktadır (Beleut et al., 2012). Hipoksi hem normal hem de tümör hücrelerinde apoptozu destekler. Bununla birlikte, tümör mikroçevresindeki hipoksik durumlar, özellikle genetik değişimlerin birikmesi ile birlikte HIF-1 aşırı ekspresyonuna sıklıkla katkıda bulunur.

Kolon, meme, pankreas, böbrekler, prostat, yumurtalık, beyin ve mesane kanserlerini içeren çalışmaların çoğunda tümörlerde önemli derece *HIF1A* ekspresyonu artışı kaydedilmiştir (Iyer et al., 1998). Klinik olarak serviks kanseri, küçük hücreli dışı akciğer karsinomu, meme kanseri, oligodendroglioma, orofaringeal kanser, yumurtalık kanseri, endometriyal kanser ve özofagus kanseri dahil olmak üzere birçok kanserde yüksek HIF1A seviyeleri agresif tümör progresyonu ile ilişkilendirilmiştir ve bu nedenle radyasyon tedavisine, kemoterapiye ve artmış mortaliteye direnç için prediktif ve prognostik bir belirteç olarak gösterilmiştir (Perl et al., 2017).

*HIF1A* ekspresyonu ayrıca meme kanseri ilerlemesini de düzenleyebilir. Erken kanser gelişiminde yüksek HIF1A seviyeleri tespit edilebilir ve meme kanseri gelişiminde pre-invaziv bir aşama olan in situ erken duktal karsinomda kullanılabilen

bir biyobeliteçtir. Ayrıca tümör lezyonlarında artmış mikro damar yapısı yoğunluğu ile ilişkilidir. Ek olarak, histolojik olarak belirlenen düşük dereceli, lenf nodu negatif meme tümöründe anlamlı *HIF1A* ekspresyonunun saptanması tedaviye zayıf yanıtı bağımsız olarak tahmin edebilmiştir. Beyin tümörü ve yumurtalık kanseri çalışmalarında da benzer bulgular bildirilmiştir ve *HIF1A*'nın *VEGF* gibi pro-anjiyojenik faktörlerle etkileşimler yoluyla anjiyogenezin başlatılmasındaki düzenleyici rolünü kanıtlamıştır. Glioblastoma çalışmaları, *HIF1A* ekspresyon paterni ile *VEGF* gen ifade seviyesi arasında çarpıcı benzerlik göstermektedir (Karner et al., 2019). Ek olarak, *HIF1A* aşırı ekspresyonu ile meme kanserine benzer şekilde, yüksek *VEGF* ekspresyon paternli yüksek dereceli glioblastoma çok formulu tümörler, tümör neovaskülarizasyonunun önemli artışını gösterir (Banerjee et al., 2004). *HIF1A*'nın, muhtemelen hipoksinin neden olduğu *VEGF* ekspresyon yolları yoluyla tümör ilerlemesini teşvik etmede düzenleyici rolü olduğu düşünülmektedir.

Yüksek *HIF1A* seviyesi ve *VEGF* aşırı ekspresyonuna ek olarak, *PI3K / AKT* yolu da tümör büyümesinde rol oynar (Rosalie Fisher et al., 2014).

Hipoksi sırasında, tümör baskılayıcı *p53* aşırı ekspresyonu apoptozu başlatmak için *HIF1A*'ya bağımlı olarak çalışmaktadır. Ayrıca *p53*'ten bağımsız olan yol, *Bcl-2* yolundan apoptozu da indükleyebilir. Bununla birlikte, *HIF1A*'nın aşırı ekspresyonu kansere türüne, kişinin ailesel geçmişine, genetik değişimlere ve anti-apoptotik faktörlerin seviyelerine bağlıdır (Wierzbicki et al., 2019).

Hipoksiyle ilişkili tümör hücrelerini hedeflemek için terapötik ilaçlar geliştirme çabaları yıllardır devam etmekle birlikte, tümör ilerlemesini ve anjiyogenezini azaltmak için *HIF1A* yollarını hedeflemede seçicilik ve etkinlik gösteren herhangi bir atılım olmamıştır. Gelecekte başarılı terapötik yaklaşımlar, kansere ve bireye özgü geliştirilebilir. Ancak, birçok kanser türü ve alt tipinin genetik olarak heterojen doğası nedeni ile her kanser türü için yaygın olarak uygulanabilir olması muhtemel görünmemektedir.

#### **2.4.6.2 VHL**

*VHL* geninin mutasyonları Von Hippel-Lindau hastalığı ile ilişkilidir. Bu hastalığa üçüncü kromozomun kısa kolundaki *VHL* geninin mutasyonları neden olmaktadır (Karner et al., 2009). Bu genin bir germ-line mutasyonu, *VHL* sendromunun ailesel kalıtımının temelidir. *VHL* sendromlu bireyler, *VHL* proteininde

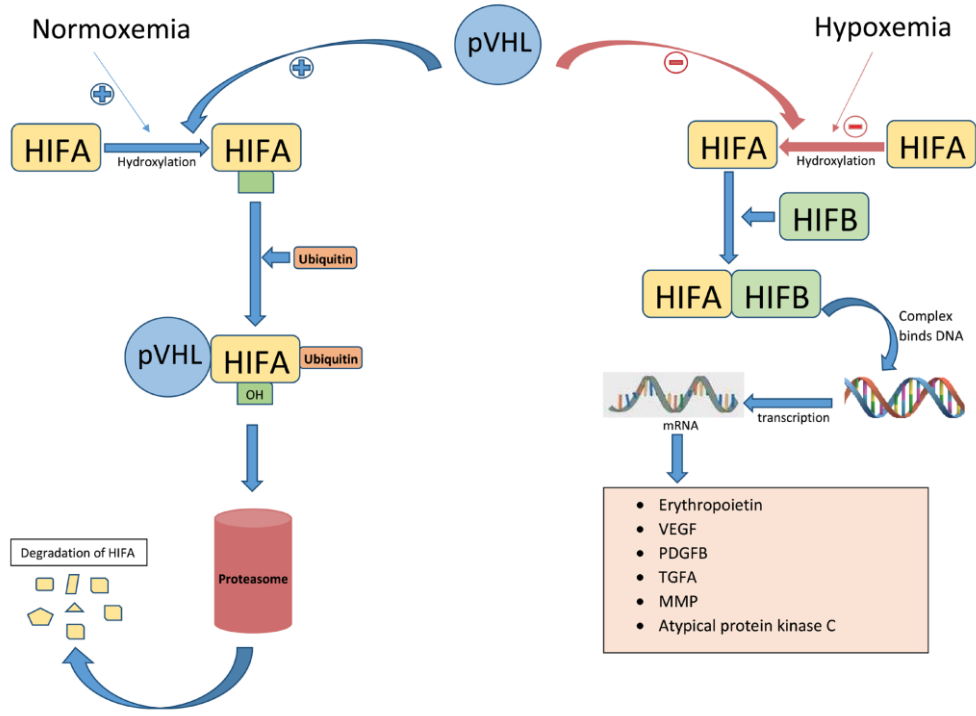


(pVHL), proteinin normal fonksiyonunun kaybolmasına veya değiştirilmesine neden olan bir mutasyonu miras almaktadır. Zamanla, *VHL* 'nin ikinci kopyasındaki sporadik mutasyon, karsinomlara, özellikle de karaciğer ve böbrekleri etkileyen hemanjioblastomlara, BHTRHK'ya yol açabilmektedir (Karner et al., 2009).

Bu gen tarafından kodlanan protein, yapısında cullin-2'yi içeren ve ubikuitin ligaz E3 aktivitesine sahip olan protein kompleksinin bir bileşenidir (Gossage et al., 2015). Bu kompleks, oksijen ile gen ekspresyonunun düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan HIF ubikitinasyonu rol oynar. RNA polimeraz II alt birimi POLR2G / RPB7'nin de bu proteinin bir hedefi olduğu bildirilmektedir. Alternatif olarak, farklı izoformları kodlayan eklenmiş transkript varyantları gözlenmiştir (Guo et al., 2012).

*HIF1A*'nın pVHL tarafından düzenlenmesi: Normal oksijen seviyeleri altında, HIF1A pVHL'yi hidrosillenmiş prolin kısmına bağlar ve pVHL ile poliubikitinlenmektedir (Dalglish et al., 2010). Bu, proteozom yoluyla bozunmasına yol açar. Hipoksi sırasında, prolin kalıntıları hidrosile olmaz ve pVHL bağlanamaz. HIF1A, hipoksi duyarlı yapıları içeren genlerin transkripsiyonuna neden olur (şekil 7). VHL hastalığında, mutasyonlar pVHL proteininde, genellikle HIF1A bağlanma bölgesinde değişikliklere neden olmaktadır.

Elde edilen protein, bir tümör baskılayıcı olarak işlev gören 18 kDa ve 30 kDa protein olmak üzere iki şekilde üretilmektedir. pVHL ana etkisinin, spesifik hedef proteinlerin degradasyon için seçici olmasına neden olan E3 ubikitin ligaz aktivitesi olduğu düşünülmektedir (Maranchie et al., 2002).



**Şekil-7 Hipoksi yoluğu (Nabi et al., 2018)**

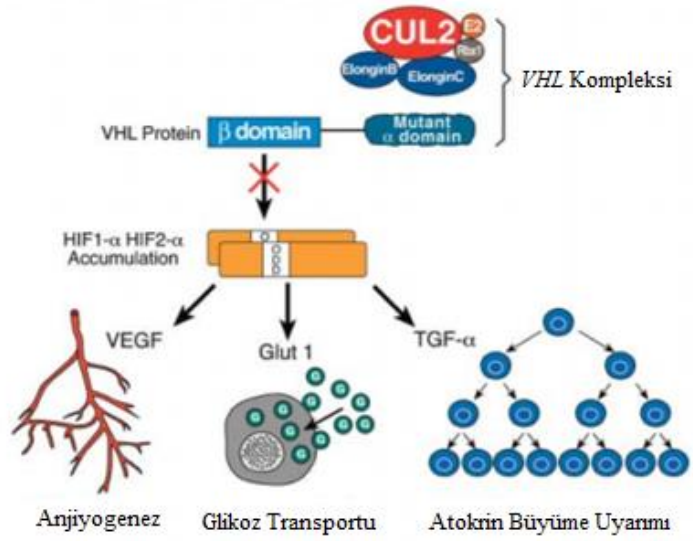
HIF, tümör büyümesi için gereklidir, çünkü çoğu kanser yüksek metabolik aktivite gerektirir ve bu aktivite sadece yapısal veya fonksiyonel olarak yetersiz damar sistemi ile sağlanmaktadır. HIF'nin aktivasyonu, artmış anjiyogeneze izin verir, bu da daha fazla glikoz alımına izin verir. HIF çoğunlukla hipoksik koşullarda aktifken, VHL kusurlu renal karsinom hücreleri oksijenli ortamlarda bile HIF'in konstitütif aktivasyonunu göstermektedir (Nabi et al., 2018).

VHL ve HIF'in yakın etkileşime girdiği açıktır. İlk olarak, *VHL*'de test edilen tüm RHK mutasyonları, proteinin *HIF1A* ifade miktarını değiştirme yeteneğini etkilemektedir.

Aktif VHL proteini olan normal hücrede, HIF1A oksijen varlığında dahi hidroksilasyon ile düzenlenmektedir. Demir, 2-oksoglutarat ve oksijen mevcut olduğunda HIF tarafından inaktive edilmektedir. HIF'nin hidroksilasyonu, pVHL için bir bağlanma yeri oluşturmaktadır. pVHL, bu proteinin proteazom tarafından bozunmasını sağlayarak, HIF1A'nın poliubikütinasyonunu yönlendirir. Hipoksik koşullarda, HIF1A alt birimleri birikir ve HIF1B'ye bağlanır. Bu HIF heterodimeri, her ikisi de anjiyogeneze katılan proteinler olan VEGF ve EPO gibi proteinleri kodlayan

genleri aktive eden bir transkripsiyon faktörüdür. Anormal pVHL'li hücreleri bu dimerlerin oluşumunu bozamaz ve bu nedenle oksijenli ortamlarda bile hipoksik gibi davranırlar.

HIF, büyüme faktörlerinin merkezi kontrolörü olan mTOR ile de bağlantılıdır (Scelo et al., 2014). Son zamanlarda HIF1A aktivasyonunun mTOR'u inaktive edebildiği gösterilmiştir. HIF1A, VHL sendromunun organa özgü doğasını açıklamaya yardımcı olabilir. Teorik olarak herhangi bir hücrede yapısal olarak HIF1A'yı aktive etmenin kansere yol açabileceği düşünülmektedir. Ancak VHL sendromundaki bir hastada dahi sendromdan etkilenmeyen doku ve organlarda HIF1A'nın *VHL* dışında düzenleyici genler tarafından kontrol edilebildiği gösterilmiştir (Cowey & Rathmell, 2009). HIF1A ile etkileşime ek olarak VHL proteini tübülün ile de birleşebilir. Daha sonra, mikrotübülleri stabilize ederek uzatabilir. Bu fonksiyon, mitoz sırasında için stabilizasyonunda önemli bir rol oynar. *VHL*'nin delesyonu mitoz sırasında yanlış yönlendirilmiş ve dönen iğlerde ciddi bir artışa neden olur. *VHL* protein aktivitesinin kaybı, artan miktarda HIF1A'ya ve dolayısıyla VEGF ve PDGF dahil olmak üzere artmış anjiyojenik faktör seviyelerine yol açar (Karner et al., 2019). Ayrıca, *VHL* - / - hücreleri ile hücre kültürü deneyleri, pVHL ilavesinin mezenkimalden epitelyal geçişe neden olabileceğini göstermiştir. Bu kanıt *VHL*'nin hücrede farklılaşmış bir fenotipin korunmasında merkezi bir rolü olduğunu düşündürmektedir. *VHL* ile ilişkili kanserler için önerilen hedefler arasında VEGF gibi HIF moleküler yolunun hedefleri bulunmaktadır (Rosalie Fisher et al., 2014) (Şekil 8).

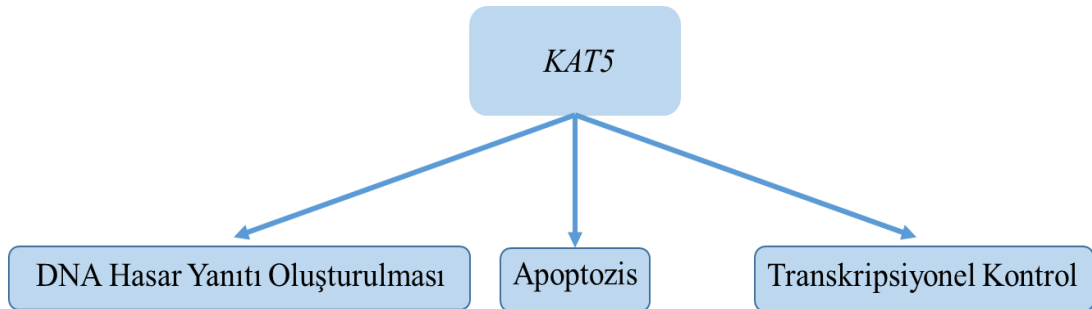


**Şekil-8 BHTRHK’da *VHL* geninin kanser gelişimindeki etkisi (Alvarez et al., 2011)**

VEGF reseptörü sorafenib, sunitinib, pazopanib ve son zamanlarda aksitinib inhibitörleri FDA tarafından onaylanmıştır. MTOR inhibitörü rapamisin analogları everolimus ve temsirolimus veya VEGF monoklonal antikor bevacizumab da bir tedavi seçeneği olabilecek potansiyel taşımaktadır (Grimm et al., 2010).

#### **2.4.6.3 *KAT5***

Histon asetiltransferaz (HAT) olan *KAT5*, insanlarda *KAT5* geni tarafından kodlanan bir enzimdir.



**Şekil-9 *KAT5* geninin görev aldığı yolaklar**

Moz, Ybf2 / Sas3, Sas2, KAT5 proteinleri (HIV-1 TAT) en büyük histon asetiltransferaz ailesini oluşturur ve tüm ökaryotlarda bulunmaktadır (Perez-Perri et al., 2016). HAT'lar, histon ve histon olmayan proteinleri asetile ederek kromatin yeniden şekillenmesi, transkripsiyon ve diğer nükleer süreçlerin düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır (Şekil 9). KAT5 proteini, DNA onarımı ve apoptozda rol oynayan ve sinyal iletiminde önemli bir rol oynadığı düşünülen bir histon asetilazdır (Gorrini et al., 2007). Bu genin alternatif splicing ile çoklu transkript varyantları meydana gelmektedir. KAT5'in yapısı, bir asetil CoA bağlanma domainini ve MYST bağlanma alanında bir çinko parmağı ve bir CHROMO bağlanma alanı içermektedir. CHROMO alanı, DNA onarımı için önemli olan KAT5'in kromatini bağlama yeteneğine yardımcı olmaktadır (Legube et al., 2002). KAT5 enzimi, DNA ile bağlanmayı değiştiren nükleozomdaki histonları asetile etmek için kullanılır. Asetilasyon, histonlar üzerindeki pozitif yükü nötralize ederek, negatif yüklü DNA'nın bağlanma afinitesini azaltmaktadır. KAT5'in üç temel işlevi; transkripsiyon, DNA onarımı ve apoptozu düzenleme yeteneği olmasıdır. E2F proteinleri ve c-Myc gibi transkripsiyon faktörleri, proteinlerin özellikle hücre döngüsüne dahil olanların ekspresyonunu düzenleyebilmektedir. KAT5, aktivitelerini destekleyen bu transkripsiyon faktörlerinin genleri üzerindeki histonları asetillemektedir (Hejna et al., 2008). KAT5, ataksi telanjiektazi mutant (ATM) protein kinaz regülasyonu ile DNA'nın onarımı ve hücre fonksiyonunun normale dönmesi için önemli bir enzimdir. ATM protein kinazı, DNA onarımında yer alan proteinleri fosforile eder ve aktive eder. Bununla birlikte, işlevsel olabilmesi için ATM protein kinazının KAT5 proteini tarafından asetillenmesi gerekir (Sun et al., 2005). KAT5 eksikliği, ATM protein kinaz aktivitesini baskılar ve bir hücrenin DNA'sını düzeltme yeteneğini azaltmaktadır.

KAT5; ayrıca *TRRAP* geni için bir kofaktör görevi görmesinden dolayı DNA onarım sürecinde de çalışır. *TRRAP*, kırık çift sarmallı DNA dizilerinin yakınında kromatine bağlanarak DNA'nın yeniden modellenmesini geliştirmektedir (Hejna et al., 2008). KAT5 bu tanımaya yardımcı olmaktadır.

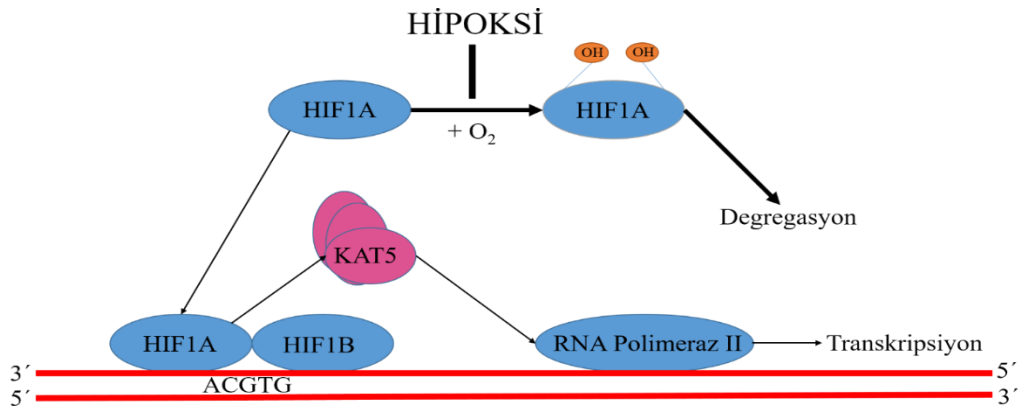
*P53*'ün, DNA hasarından sonra hücre apoptozuna neden olduğu iyi bilinmektedir. *P53*'ün *KAT5* tarafından asetilasyonu ile hücre ölümü indüklenir (Kim et al., 2007). Bu nedenle, KAT5 eksikliği, DNA'sı hasar görmüş hücrelerin apoptozdan kaçınmasına ve bölünmeye devam etmesine izin verir. KAT5'in tanısal veya terapötik

yaklaşımlar için yararlı bir hedef olmasını sağlayan birçok klinik önemi vardır. Dolayısıyla, *KAT5*; kanserleri, HIV'i ve nörodejeneratif hastalıkları düzenlemeye yardımcı olur. Yukarıda belirtildiği gibi *KAT5*, *p53* gibi tümör süpresörlerinin onarılmasına yardımcı olur. *KAT5* ayrıca metastaz ve malignite ile bağlantılıdır (Legube et al., 2002).

*KAT5* 'in doğrudan ilgili olduğu kanserler; kolon kanseri, akciğer kanseri, meme kanseri, pankreas, mide kanseri, metastatik melanom kanserleridir.

Çalışmalar ayrıca *KAT5* ifadesinin artmasının kemoterapinin tümör büyümesini durdurma yeteneğini artırdığını ve kombinasyon tedavilerinde potansiyel biyobelirteç olduğunu göstermektedir (Kim et al., 2007) . Ancak *KAT5*, her zaman anti-kanser etkiye sahip değildir. İnsan T hücreli lenfotropik virüs tip-1 (HTLV) gibi kansere neden olan virüslerin proteinlerinin aktivitesinde artırabilir, bu durum lösemi ve lenfomaya neden olabilir. Ayrıca *KAT5*, rahim ağzı kanserinden sorumlu virüs olan insan papilloma virüsü (HPV) ile reaksiyona girer (Legube et al., 2002). *KAT5* 'in etkilediği diğer proteinler de kansere yol açabilirler. Örneğin, bir transkripsiyon faktörü olan aşırı eksprese edilmiş E2F1, melanom gelişiminde rol oynar. *KAT5*'in gen ifadesinin kanser gelişimindeki genel rolünü açıkça ortaya çıkarmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Sun et al., 2005).

*KAT5* ve CDK8'in HIF1A transkripsiyonunun bir bölümünü düzenleyerek, hipoksi sırasında kanser hücrelerinin sağ kalımı ve proliferasyonuna katkı sağladığı gösterilmiştir. *KAT5*, DNA hasar cevabı sinyallerini modüle eder ve onkogenler tarafından uyarılan tümör gelişimini etkisiz hale getirebilmektedir.



**Şekil-10 BHTRHK'da *KAT5* (*TIP60*) geninin hipoksi yolağındaki etkisi (Perez-Perri et al., 2016)**

Bu durum KAT5 protein komplekslerinin, kromatin çift zincir kırıklarının tamirinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. KAT5 komplekslerinin kaybı, çift zincirli DNA kırıklarının birikimine yol açmaktadır (Hejna et al., 2008). pVHL ile birlikte KAT5 p53'ün trans aktivasyonunda da görev almaktadır. Ayrıca KAT5, HIF1A ile birlikte RNA polimeraz II ile etkileşime girerek KAT5 transkripsiyonunda düzenleyici etki göstermektedir (Şekil 10) (Perez-Perri et al., 2016). KAT5 ile ilgili yapılan çalışmalar, bu proteinin meme kanseri, mide kanseri, prostat kanseri gibi çok farklı kanser tipleriyle bağlantılı olduğunu göstermektedir.

#### **2.4.7. Berrak Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinom'da Heterojenite**

Darwin'ın ortaya koymuş olduğu evrimsel dallanma ve çeşitlilik kanser hücreleri için de benzerdir. Tarihsel olarak yapılan öncül çalışmalar gösterdi ki; BHTRK oldukça heterojen yapıda bir hastalıktır. Yakın tarihte yapılan çalışmalarda ise bu yüksek heterojenitenin tek bir hastadaki tümör dokusunun kısımları arasında bile olabileceğini göstermektedir (Marco Gerlinger et al., 2015). Tümör yapısındaki bu farklılık hastalığın tiplendirilmesinde tek bir biyopsi örneğininin yetersiz kalacağını, bir tümör dokusunun farklı bölgelerinden elde edilen örneklerin araştırılmasının ve alt guruplama yapılmasının daha sağlıklı olacağını göstermektedir. Alt gruplar arası yapılan çalışmalarda tümörün farklı iki kısmından alınan örneklerin mutasyonları incelendiğinde sadece 50% 'lik bir benzerliğin olduğu ortaya çıkarılmıştır (M Gerlinger & Gore, 2012). Tümörün alt grupları arasındaki mutasyon miktar ve çeşitleri analiz edilerek filogenetik yaklaşım ile belirlenebilmektedir. Örneğin; anneden ve babadan gelen her iki allelde de stop kodonu ile sonlanan baz değişimi mutasyonu (Truncate mutasyon) diğer somatik mutasyonlara göre daha sık görülmektedir. Tümör yapısındaki alt grupların tespit edilmesi, hastalığın tedavisinde oldukça yarar sağlayabilmekte olup hastalığın anlaşılmasında yol gösterici niteliktedir. Tümör alt grupları arasında oluşan mutasyon deseni *VHL* 3p kromozom kaybı temelinde ortak olsa da, her bir alt grup örneğin 9p ve 14q delesyonu ya da farklı somatik mutasyonları ihtiva etmesiyle farklılık göstermektedir (M Gerlinger & Gore, 2012). Ayrıca her, hastada tümör içi alt grupların barındırdığı mutasyon farklılıkları hastalığın prognozunu yakından etkilemektedir. Heterojenitenin çok yüksek olması hastalığın tedavisinde bireye özgü tedavi modellemesinin önemini yeniden açığa çıkarmaktadır.

## 2.5 miRNA'ların Yapı ve Biyogenezi

MiRNA'lar 1990'lı yıllarda keşfedilmiş olsa da, 2000'li yıllardan sonra, hücre moleküler biyolojisi ve kanser ile ilgili araştırmalarda miRNA moleküllerinin öneminden bahsedilmeye başlanmıştır. MiRNA'ların keşfine kadar geçen süreç içerisinde, genomda bulunan kodlamayan bölgelerin fonksiyonu bilinmemekteydi. Bu yüzden çoğu bilim insanının kabul ettiği tabirle, kodlama yapmayan gen bölgeleri “çöp” DNA olarak adlandırılmaktaydı. Günümüzde ise, bu bölgelerin büyük çoğunluğunun miRNA'ları kodladığı açık ve net olarak kanıtlanmıştır. MiRNA'lar, 17-25 nükleotid büyüklüğünde, mRNA kodlamayan, çoğunlukla gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde görev alan ve tüm ökaryotik hücrelerde bulunan moleküllerdir (Park et al., 2011). MiRNA'ların hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, strese karşı cevap, apoptozis, immünite ve transkripsiyonel düzenleme gibi hemen hemen tüm hücresel fonksiyonlarda rol aldıkları ve bu yolların durdurulması ya da bozulmasının da kanser oluşumu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Lu et al., 2005). Böylece, miRNA'ların tümör gelişiminde hem onkogen hem de tümör baskılayıcı fonksiyon gösterdikleri ortaya çıkmaktadır. Darwinist model ile uyum gösteren miRNA'ların canlı yaşamında üstlenmiş oldukları düzenleyici görev; onların evrimsel süreçte türler arasında yapı ve fonksiyonel değişiklik olmaksızın korunmasına neden olmuştur. Örneğin; miR90 ailesi, balık ve memelilerde yapı, işlev ve fonksiyon olarak aynıdır.

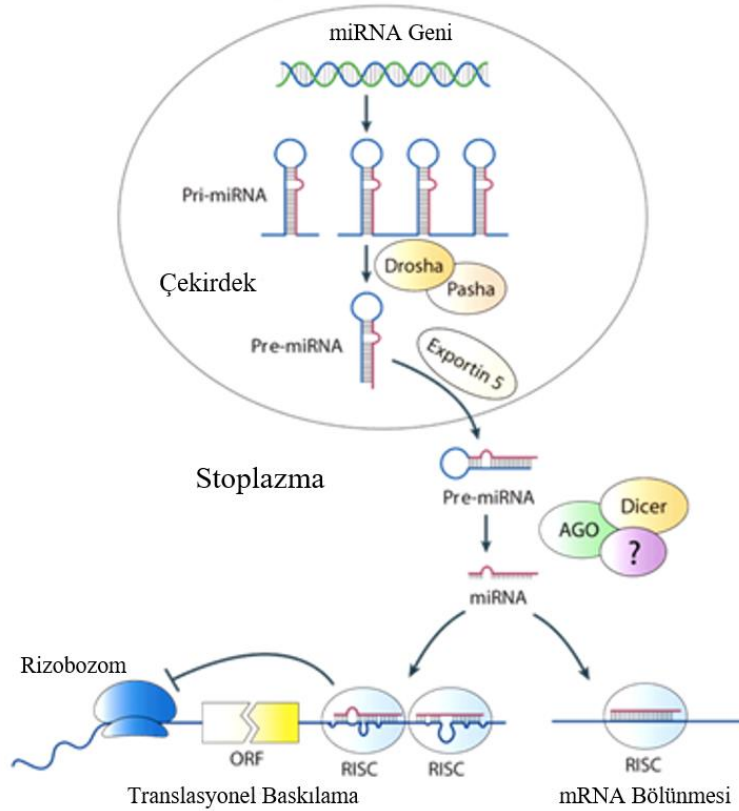
### 2.5.1. miRNA'ların Biyogenezi

Primer transkript olan primer miRNA (pri-miRNA)'nın RNA polimeraz II (RNA pol II) tarafından transkripsiyonu, nükleusta pri-miRNA'nın prekürsör miRNA (pre-miRNA)'ya dönüşümü ve sitoplazmada olgun (fonksiyonel) miRNA'ların oluşturulması olmak üzere birbirini izleyen üç basamaklı işlem süreci sonucunda miRNA'lar oluşmaktadır (Lee et al., 2003). Pri-miRNA, çekirdek içerisinde RNAaz II enzimi tarafından genomik DNA üzerindeki ilgili genlerden sentezlenmektedir ve 500-3000 baz çiftine sahip olup “cap” ve “poli A” kuyruğundan oluşan sap - ilmik yapılarından oluşmaktadır (Şekil 11). Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülmektedir (Lee et al., 2003). Pre-miRNA molekülü bir nüklear taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nüklear bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınmaktadır. Sitoplazmada pre-miRNA, transaktivasyondan sorumlu RNA bağlayıcı protein



(TRBP) ve Dicer enzimi tarafından kesilerek, bir zinciri kılavuz miRNA, diğer zinciri ise kılavuz miRNA ile eşleşen diziyi barındıran çift zincirli molekül oluşmaktadır. Bu çift zincirli molekülün daha kararlı olan kılavuz zinciri, RNA ile uyarılan susturma kompleksi olan RISC kompleksinin içinde yer alan ve bir RNAaz olan Argonaute'nın (Ago2) etkisiyle RISC kompleksi ile birleşip hedef mRNA dizisinin inhibisyonuna neden olmakta veya translasyonunu engellemektedir, yolcu zincir ise RISC kompleksi tarafından parçalanmaktadır (Luo et al., 2019).

MiRNA'lar hedef mRNA molekülüne kısmi ya da tam komplementerlik göstererek bağlanabilmektedir. Hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3' bölgesi (3'UTR) ile miRNA çekirdek dizisi arasındaki komplementerliğin seviyesi miRNA'nın hedefini hangi seviyede ve nasıl baskılayacağını belirtmektedir (Park et al., 2011).



**Şekil-11 miRNA biyogenezi (Zhao & Srivastava, 2007)**

### 2.5.2 miRNA'ların Kanser İle İlişkisi

MiRNA'lar işlevsel olarak hedef genlerin mRNA'larının 3'UTR bölgesine bağlanarak mRNA degradasyonu ya da translasyonel inhibisyon yoluyla gen ekspresyonunun düzenlenmesini sağlamaktadır. MiRNA'ların mRNA'lara bağlanma özelliklerine dayanarak yapılan hesaplamalar, her bir miRNA'nın yaklaşık 100 farklı mRNA'yı hedefleyebildiğini teorik olarak ortaya koymaktadır.

Birçok kanser türünde etkili olan onkogen ve tümör supresör genlerin, 3'UTR bölgelerine bağlanan miRNA'ların sayısı ve çeşidinin bu bölgede belirlenen varyasyonlar sonucunda değiştiği gözlenmektedir. Bu şekilde spesifik 3'UTR genotipi içeren kanser hastalarında 3'UTR'ye bağlanan miRNA'ların sayısının ve çeşidinin değişmesi, etkili genin mRNA'sını destabilize ederek kanser gelişiminin tetiklendiği düşünülmektedir (White et al., 2011).

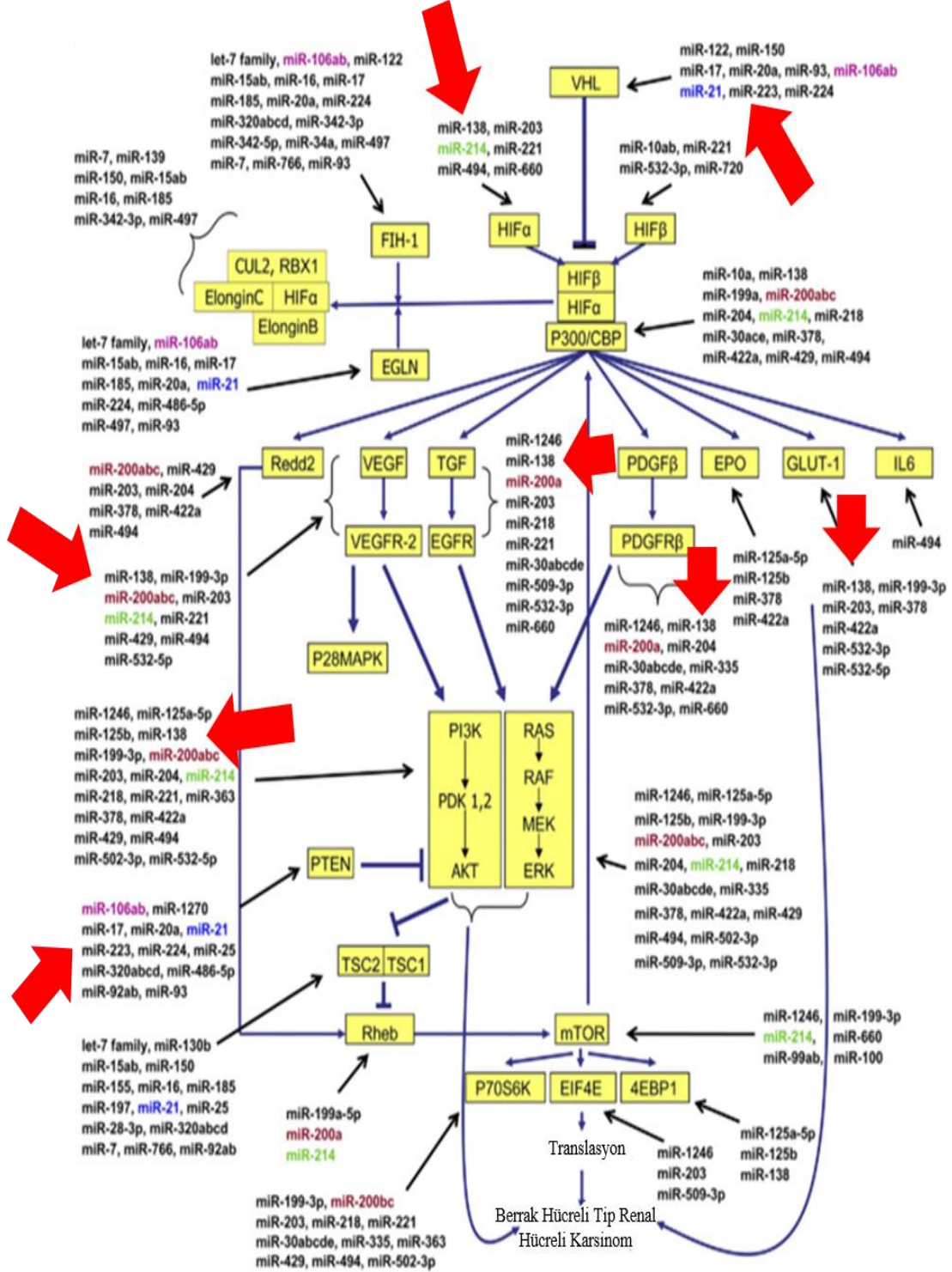
İnsanlarda mRNA'nın fonksiyonu, miRNA tarafından translasyonun başlangıcının baskılanması, translasyonun uzama fazının baskılanması ve poli(A) kuyruğunun kısalması gibi basamaklarda düzenlenmektedir. Protein kodlayan genleri etkileyen amplifikasyon, translokasyon, delesyon, nokta mutasyonlar ve epigenetik mekanizmalar kanserli hücrelerde miRNA'nın da fonksiyonunu etkilemektedir. İnsan miRNA'larının yaklaşık %50'si, DNA üzerinde kanserle ilişkili genomik bölgelerden ve kromozomlarda boşluklar, kırıklar oluşması ve kromozomların yeniden düzenlenmesi sonucu meydana gelen hassas ve kırılğan bölgeler olarak tanımlanan, kromozomlar üzerinde lokalize olmuş fragil bölgelerden kodlanmaktadır. Bu durum, miRNA'ların bugüne kadar açıklanamayan biyolojik olaylarda yer alan hedef moleküller olabileceğini düşündürmektedir (Juan et al., 2010).

Günümüze kadar farklı kanser tiplerinde miRNA ekspresyon düzeyindeki değişiklikleri tanımlayan birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Genom genelinde yapılan çalışmalar miRNA'ların tümörigenez süresince olan rollerini destekler nitelikte olup, bu moleküllerin kanserle ilişkili genomik bölgelerde lokalize olduğunu ve değişen derecedeki ekspresyonlarının onkogen ve tümör supressör gen fonksiyonu ile ilgili olduğunu göstermektedir. Kanserleşme sürecinde bazı miRNA'ların hücre proliferasyonunu arttırırken, diğerlerinin azalttığı bildirilmektedir. MiRNA'ların bu iki sınıfı kanser gelişiminde onkogenler ve tümör supressör genler gibi merkezi bir rol oynamaktadır. MiRNA'ların büyük çoğunluğunun kanserli hücrelerde düşük seviyede

eksprese olduğu ifade edilmektedir. Normal dokularda, bu miRNA'ların bazılarının proto-onkogenlerin inhibe ettiği (mRNA'ların 3' ucunu hedef alarak) bildirilmiştir. Bu nedenle bu miRNA'lara "tümör supressör miRNA'lar (TS-miR) denmektedir (Lee et al., 2003). Çünkü bunların normal fonksiyonları, onkogenlerin ekspresyonlarını kontrol altında tutmaktır. Bazı miRNA'ların ise kanserli hücrelerde yüksek seviyelerde eksprese oldukları belirlenmiştir. Bu miRNA'lar ise oncomiR'ler (onco-miR) olarak tanımlanmaktadır. MiRNA'ların birden fazla potansiyel hedefleri olduğu için, hücrenel durumuna göre bir miRNA, TS-miR ya da onco-miR özelliği gösterebilmektedir.

### 2.5.3 Berrak Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinom'da miRNA'lar

BHTRHK gelişiminde miRNA'lar oldukça etkilidir. Hipoksi yolağında dahil olmakla birlikte birçok moleküler yolakta düzenleyici görev almaktadırlar (Şekil 12).



Şekil-12 RHK'da etkili olan miRNA'lar (White et al., 2011)

### 2.5.3.1 miR-22

MiR-22 başlangıçta HeLa hücrelerinde (rahim ağzı kanseri hücrelerinden türetilen bir hücre hattında) tanımlanmıştır. Ancak, daha sonra farklı dokularda ifade edildiği belirlenmiştir. MiR-22'yi kodlayan gen, kromozom 17'nin kısa kolunda lokalizedir. Şempanze, fare, sıçan, köpek ve at dahil olmak üzere birçok omurgalı türünde oldukça korunmuş halde bulunmaktadır. MiR-22'nin bu koruma düzeyi işlevsel önemini göstermektedir. MiR-22'nin ilk olarak eritrosit olgunlaşmasında rol oynadığı tespit edilmiştir (Gong et al., 2019). Birçok miRNA düzensizliğinin onkogeneze rolü olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. MiR-22'nin prostat kanserinde aşırı ifade edildiği, ancak meme kanseri, multiple miyelom ve hepatosellüler karsinomda az ifade edildiği bilinmektedir. MiR-22 ekspresyonu, birden fazla meme kanseri veri setinde sağkalım ile ilişkiliydi. Spesifik olarak miR-22, bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebilir. Bilinen hedeflerinden biri kanser gelişiminde kritik bir rolü olduğu bilinen histon deasetilaz 4'tür (HDAC4). Mir-22 ayrıca Myc Bağlayıcı Proteini (MYCBP) de hedefler. Bu, c-MYCBP'yi susturmak suretiyle c-Myc hedef genlerinin transkripsiyonunu önler. Bununla birlikte, c-Myc, pozitif bir geri besleme döngüsünde miR-22 ekspresyonunu da inhibe eder. Bu kontrol mekanizması inaktive olduğunda kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olabilir (Hu et al., 2020).

### 2.5.3.2 miR-138

İnsan genomunda miR-138'yi kodlayan iki gen bölgesi vardır ve bunlar aynı kromozom üzerinde bulunmazlar. MiR-138-1 geni 3p21.3'te ve miR-138-2 ise, kromozom 16q13 üzerinde bulunur. Yetişkin farelerde miR-138-1 sadece beyin dokusunda eksprese edilir. İfadesi beyin boyunca eşit değildir. MiR-138-2, tüm dokularda eksprese edilir. MiR-138'in tanımlanmasından bu yana yapılan çalışmalar ile canlı yapısında üstlendiği bir dizi görev ve farklı gen hedefleri tespit edilmiştir. Ayrıca, çeşitli kanser türleri ile ilişkisi tespit edilmiştir (Girgis et al., 2012).

*HIF1A* ile ilişkisi; kanser hücrelerindeki anahtar düzenleyicilerden biri olan *HIF1A*, miR-138'in bir hedefi olarak gösterilmiştir. *HIF1A* üzerindeki düzenleyici etkisi BHTRHK'nın moleküler al yapısının aydınlatılmasında çalışılması gereken bir miRNA olmasına neden olmaktadır (Song et al., 2011).

### 2.5.2.3 miR-223

MiR-223 miyeloid gelişiminde önemli fonksiyonları olan hematopoietik spesifik bir miRNA'dır. Eritrositik farklılaşmanın baskılanması ile ilişkili olmasına rağmen, granülositik farklılaşmanın desteklenmesinde önemli bir rol oynar. MiR-223 yaygın olarak hepatosellüler karsinomda ve lösemide baskılanır. Daha yüksek miR-223 ekspresyon seviyeleri, midenin mukozaya bağlı lenfoid dokusunun ektranodal marjinal zon lenfoma ve tekrarlayan yumurtalık kanseri ile ilişkilidir. Bazı kanserlerde miR-223 ifade azalması, daha yüksek tümör yükü ve kötü prognostik faktörlerle ilişkilidir. MiR-223 ayrıca romatoid artrit, sepsis, tip 2 diyabet ve hepatic iskemi ile ilişkilidir (Luo et al., 2019).

MiR-223 başlangıçta biyoinformatik analiz ile tanımlandı ve daha sonra hematopoietik sistemin bir parçası olarak karakterize edildi. Geni, miyeloid genine benzerdir ve miyeloid transkripsiyon faktörleri olan PU.1 ve C/EBPa proteinleri tarafından düzenlenebilir.

MiR-223, AU bakımından zengin elementleri barındıran farklı transkript grubunu seçici olarak hedefler. Daha spesifik olarak, RhoB mRNA'sının miR-223'in hedefi olduğu doğrulanmıştır. miR-223 ayrıca FBXW7 proteininin ekspresyonunu düzenleyerek siklin E aktivitesini artırır. Özellikle miR-223'ün aşırı ekspresyonu, endojen siklin E proteininin ve ifade seviyesini artırırken FBXW7 mRNA seviyelerini azaltır (Zhang et al., 2020).

MiR-223'in ifadesi, hepatosellüler karsinom, kronik lenfositik lösemi, akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloid lösemi, gastrik MALT lenfoma ve nükseden yumurtalık kanserinde yaygın olarak baskılanır (Xiao et al., 2019).

MiR-223, hücre döngüsü ilerlemesinin ve ardından miyeloid farklılaşmasının önlenmesine yol açan E2F1'in translasyonunu bloke eder. Akut miyeloid lösemi (AML)'de miR-223 ifadesi azalır ve böylece E2F1 aşırı ekspresyonuna yol açar. E2F1'in aşırı ekspresyonunun, hücreleri transformasyona yatkın hale getiren onkojenik bir olay olduğu gösterilmiştir. AML'de miR-223 rolünün bir göstergesi olsa da, kronik lenfositik ve akut lenfoblastik lösemide bu miRNA fonksiyonu hakkında hala çok az şey bilinmektedir. MiR-223 ifadesinin azalması daha yüksek tümör yükü ve kötü prognostik faktörlerle ilişkilendirilmiştir (Karner et al., 2009).

Gastrik MALT lenfoma ve nükseden yumurtalık kanseri gelişiminde, miR-223 ifade artışının etkili olduğu gösterilmiştir.

## **2.6. Biyoinformatik**

Disiplinlerarası bir bilim alanı olarak biyoinformatik, biyolojik verileri analiz etmek ve yorumlamak için biyoloji, bilgisayar bilimi, bilgi mühendisliği, matematik ve istatistik bilim dallarını birleştirir. Biyoinformatik, biyolojik sorguların matematiksel ve istatistiksel teknikler kullanılarak silico analizlerinde kullanılmasıdır (Nobile et al., 2017). Ayrıca, bilgisayar programlama metodolojilerinin bir parçası olarak biyoinformatik, biyolojik çalışmaları kullanan ve özellikle genomik veriyi kullanan nicel bir analiz perspektifi sunmaktadır. Yaygın kullanımları arasında aday; NGS (Next Gene Sequencing) sonuçlarının anlaşılması, genlerin ve tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) tanımlanması yer alır. Nükleik asit ve protein dizileri içindeki proteomik adı verilen organizasyonel prensiplerin etkileşim analizleri de sıklıkla kullanılan alanlardandır (Oliver et al., 2015).

Tarihsel olarak Paulien Hogeweg ve Ben Hesper 1970 yılında biyotik sistemlerde bilgi süreçlerinin incelenmesine biyoinformatik analizle başvurmuşlardır. Bu tanım biyoinformatiği biyolojik sistemlerde kimyasal işlemlerin incelenmesi adına biyokimyaya paralel bir alan olarak yerleştirmiştir.

Normal hücrel aktivitelere farklı hastalık durumlarında nasıl değiştiğini incelemek için biyolojik veriler, bu aktivitelerin kapsamlı bir resmini oluşturmak üzere birleştirilmelidir. Bu nedenle, biyoinformatik alanı çeşitli veri türlerinin analizini ve yorumlanmasını içerecek şekilde gelişmiştir. Biyokimyasal perspektif, zamanla yapısına nükleotid ve amino asit sekansları, protein ürünleri, protein yapıları ve etkileşimlerini katmıştır (Jünemann et al., 2017).

Biyoinformatiğin getirmiş olduğu yaklaşımlar;

1. Çeşitli bilgilere etkin erişim, yönetim ve kullanım sağlayan bilgisayar programlarının geliştirilmesi ve uygulanması,
2. Büyük veri kümelerinin arasındaki ilişkileri değerlendiren yeni algoritmaların ve istatistiksel yöntemlerin geliştirilmesi. Örneğin, bir genin bir sekans içindeki yerini belirleme, protein yapısını ve / veya fonksiyonunu tahmin etme ve protein dizisi ile ilgili sekansların yapısına göre gruplama yöntemleri,

3. Biyoinformatiğin temel amacı biyolojik süreçlerin anlaşılmasını arttırmaktır. Ancak elde ettiği bir analiz sonucunu tüm canlı yapılarına uygulayamaz. Bu durumdan dolayı, her biyolojik data anlaşılabilirliği adına kendi içinde bir takım yeni algoritma ve modellerin oluşması zorundadır.

Örnekler: Örnekleme, veri madenciliği, makine öğrenme algoritmaları ve görselleştirme. Genom diziliminde dizi hizalaması, hastalıkla ilişkili aday gen bulma, genomlar arası karşılaştırma, ilaç tasarımı, ilaç keşfi, protein yapı eşleştirmesi, protein yapı tahmini, gen ekspresyonunun tahmini ve protein-protein etkileşimleri, genom çapında ilişki çalışmaları, evrimin modellenmesi yer almaktadır.

Biyoinformatik biyolojik verilerin yönetimi ve analizinden kaynaklanan biçimsel ve pratik problemleri çözmek için veri tabanları, algoritmalar, hesaplama ve istatistiksel teknikler ve teorilerin oluşturulmasını ve geliştirilmesini gerektirmektedir. Son yıllarda, genomik ve diğer moleküler araştırma teknolojilerindeki hızlı gelişmeler ile bilgi teknolojilerindeki gelişmeler, moleküler biyoloji ile ilgili kapsamlı bilgi üretmek için bir araya getirilmiştir.

Biyoinformatikteki yaygın faaliyetler arasında DNA ve protein dizilerinin haritalanması ve analizi, DNA ve protein dizilerinin karşılaştırılması ve protein yapılarının 3 boyutlu modelleri oluşturulması ve görüntülenmesi yer almaktadır.

Biyoinformatik, biyolojik hesaplama benzerliğine rağmen farklı olan bir bilim alanıdır. Ancak, genellikle hesaplama biyolojisinin eş anlamlısı olarak kabul edilir. Biyolojik hesaplama, biyolojik bilgisayarlar oluşturmak için biyomühendislik ve biyolojiyi kullanırken, biyoinformatik biyolojiyi daha iyi anlamak için hesaplamayı kullanır. Biyoinformatik ve hesaplamalı biyoloji, biyolojik verilerin, özellikle DNA, RNA ve protein dizilerinin analizini içerir. Biyoinformatik alanında, 1990'ların ortalarından başlayarak, büyük ölçüde bir büyüme (İnsan Genom Projesi ve DNA sekanslama teknolojilerindeki hızlı ilerlemeleri nedeniyle) yaşanmıştır.

Anlamlı verilerin üretilmesi için biyolojik verilerin analizi, grafik teorisi, yapay zeka, bilgi işlem, veri madenciliği, görüntü işleme ve bilgisayar simülasyonundan algoritmalar kullanan yazılım programlarının yazılmasını ve çalıştırılmasını içerir. Algoritmalar sırayla ayrık matematik, kontrol teorisi, sistem teorisi, bilgi teorisi ve istatistik gibi teorik temellere dayanır.



Veritabanları biyoinformatik araştırma ve uygulamaları için gereklidir. Çeşitli bilgi türlerini kapsayan birçok veri tabanı bulunmaktadır: örneğin, DNA ve protein dizileri, moleküler yapılar, fenotipler ve biyolojik çeşitlilik. Veritabanları ampirik veriler (doğrudan deneylerden elde edilir), tahmin edilen veriler (analizden elde edilir) veya en yaygın olarak her ikisini içerebilir. Veriler belirli bir organizmaya, yolağa veya ilgili moleküle spesifik olabilirler. Alternatif olarak, diğer birçok veritabanından derlenen verileri de içerebilirler. Bu veritabanları biçimlerine, erişim mekanizmalarına ve herkese açık olup olmadıklarına göre değişir (Jünemann et al., 2017).

En sık kullanılan veritabanlarından bazıları aşağıda listelenmiştir.

- Biyolojik dizi analizinde kullanılan veri tabanları: Genbank, UniProt
- Yapı analizinde kullanılan veri tabanları: Protein Veri Bankası (PDB)
- Protein Aileleri ve Motif Bulmada kullanılan veri tabanları: InterPro, Pfam
- Yeni Nesil Sekanslama için kullanılan veri tabanları: Sekans Okuma Arşivi
- Ağ Analizinde kullanılan veri tabanları: Metabolik Yol Veritabanları (KEGG, BioCyc)
- Sentetik genetik devrelerin tasarımında kullanılır: GenoCAD

Biyoinformatik yaklaşımın bir diğer avantajı genlerin multimodal (çok yönlü) incelenmesine olanak sağlamasıdır. Multimodal yaklaşımlar, bir genin ifadesel ölçümünü bunun proteinsel karşılığını ve sonuçların global veri bankalarında modellenmesini içerir. Bu yaklaşım özelden genele olabileceği gibi, genelden yani global veriden spesifik bir hasta verisine doğru yapılabilmektedir. Bu yaklaşımla hastalığın prognozu, tedavi modelinin etkinliği gelişimi ve hastalığın heterojenitesinin ayırt edilebilmesi hakkında çok daha fazla bilgiye sahip olurken, biyoinformatik hesaplamalar ile nicel değeri kuvvetli data elde edilmektedir. Bir diğer yaklaşım olan genetik ağ analizleri ise, hastalığın analizlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Ağ analizlerinin temelinde protein-protein etkileşimi (PPE) vardır. Kanser supresör genlerinden onkogenlere kadar her genin işlevsel yolunun detaylı analizine olanak sağlamaktadır. Yapılan biyoinformatiksel modellemeler ile de olası ağ yapıları tespit edilerek hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi mümkün kılınmaktadır. PPE diğer analizlere göre, daha kapsamlı ve karmaşık alt birimlerden oluşmaktadır. İyi bir analiz için mutlak büyük veri bankalarında veri madenciliği yapılarak olası tüm alt modellemeler hesaplamaya dahil edilmelidir. Hataya açık bir sistem olmakla birlikte,

elde ettiği sonuçların işlevselliği ilaca yönelik etkin tedavide oldukça başarılıdır. STRING veritabanı PPE’de aktif olarak kullanılan ulusal alanda kabul görmüş bir PPE analiz veri tabanı olarak hizmet vermektedir. Bünyesinde çok sayıda veri bankasının verisini bulundurmaktadır (Croft et al., 2011).

Genler arası etkileşim ve sinyal yollarının etkisi, PPE çok daha anlamlı bir perspektif kazandırmaktadır. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) genler arası etkileşim ve sinyal yollarının anlaşılmasında kullanılan ulusal kabul görmüş bir veri bankasıdır. Bu çalışmalara ek olarak transkripsiyon faktörlerinin tespiti ve bu faktörler arası ilişkinin tespiti çalışmaların bütününde büyük bir yer tutmaktadır (Kanehisa et al., 2012).

Sonuç olarak, bir çalışmanın kalitesi sonuca ulaşılırken alt yapısında yapılan analiz çeşitliliğinin gücüne göre belirlenmektedir. Sadece mutasyon taramasını ya da sadece mRNA düzeyini içeren çalışmalar, BHTRK gibi heterojenitesi yüksek hastalık gruplarında hastalığın gelişimi, prognozu ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde ciddi sınırlar oluşturmaktadır.

## **2.6.1. Global Veri Bankaları**

### **2.6.1.1. GEO Data**

Gene Expression Omnibus (GEO), MIAME uyumlu veri gönderimlerini destekleyen bir genel fonksiyonel genomik veri deposudur. Bu veri tabanına DNA dizi ve dizi tabanlı veriler kabul edilir. Kullanıcıların deneyleri sorgulamalarına ve verileri indirmelerine ve gen ifadesi profillerini incelemelerine yardımcı olacak araçlar sağlanmıştır (Z. Wang et al., 2018).

Deneysel koşullar arasında farklı şekilde eksprese edilen genleri tanımlamak için iki veya daha fazla örnek grubunun karşılaştırılması amacıyla GEO2R adında ki sistemin içeriğinde gömülü bir data analiz programı mevcuttur. Sonuçta, genler önem sırasına göre oluşturulan bir tablo olarak sunulmaktadır.

GEO veritabanı, yüksek verimli gen ifadesini ve diğer fonksiyonel genomik veri setlerini arşivleyen ve serbestçe dağıtan uluslararası bir kamu deposudur. 2000 yılında gen ekspresyonu çalışmaları için dünya çapında bir kaynak olarak oluşturulan GEO, hızla değişen teknolojilerle geliştirildi. Günümüzde GEO, genom metilasyonunu, kromatin yapısını ve genom-protein etkileşimlerini inceleyenler de dahil olmak üzere, birçok veri uygulaması için yüksek verimli verileri yapısına dahil

etmektedir. GEO, ham veriler, işlenmiş veriler ve açıklayıcı meta veriler dahil olmak üzere birçok kritik çalışma ögesinin sağlanmasını belirten topluluk kaynaklı raporlama standartlarını desteklemektedir. Veritabanları yalnızca on binlerce çalışma için verilere erişim sağlamakla kalmaz, aynı zamanda kullanıcıların kendi ilgi alanlarına uygun verileri bulmalarını, verileri görselleştirmelerini ve analiz etmelerini sağlayan web tabanlı araçlar ve stratejiler sunmaktadır.

GEO DataSets: Kullanıcılar, ilgi çekici çalışmaları araştırmak için bu veritabanını kullanmaktadır. Veri tabanı, tüm tedarikçinin sağladığı Platform, Sample ve Series kayıtlarının yanı sıra gen ifadesi DataSet kayıtlarını depolar. Bulgular, her bir kayıt için unvan, özet, organizma ve katılımın yanı sıra ilgili verilere bağlantılar içermektedir. GEO DataSets arama arayüzü <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/> adresinde mevcuttur veya <http://www.tr> adresindeki NCBI ana sayfasındaki ana arama kutusundan açılan veritabanları menüsünden seçilebilir. [Ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)2.GEO Profiller: Kullanıcılar, bu veritabanını genlerin ifade profillerini aramak için kullanmaktadır (Şekil 13).

## A) GEO ana sayfası

COVID-19 is an emerging, rapidly evolving situation.  
Get the latest public health information from CDC: <https://www.coronavirus.gov>.  
Get the latest research from NIH: <https://www.nih.gov/coronavirus>.  
Find NCBI SARS-CoV-2 literature, sequence, and clinical content: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>

### Gene Expression Omnibus

GEO is a public functional genomics data repository supporting MIAME-compliant data submissions. Array- and sequence-based data are accepted. Tools are provided to help users query and download experiments and curated gene expression profiles.

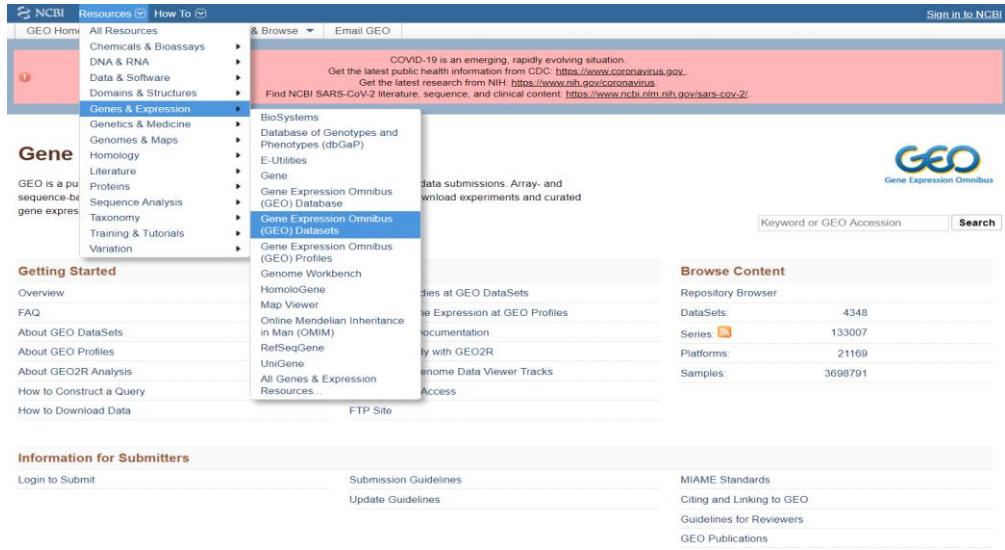
Keyword or GEO Accession

Getting Started	Tools	Browse Content
<a href="#">Overview</a>	<a href="#">Search for Studies at GEO DataSets</a>	Repository Browser
<a href="#">FAQ</a>	<a href="#">Search for Gene Expression at GEO Profiles</a>	DataSets: 4348
<a href="#">About GEO DataSets</a>	<a href="#">Search GEO Documentation</a>	Series: 133007
<a href="#">About GEO Profiles</a>	<a href="#">Analyze a Study with GEO2R</a>	Platforms: 21169
<a href="#">About GEO2R Analysis</a>	<a href="#">Studies with Genome Data Viewer Tracks</a>	Samples: 3698791
<a href="#">How to Construct a Query</a>	<a href="#">Programmatic Access</a>	
<a href="#">How to Download Data</a>	<a href="#">FTP Site</a>	

### Information for Submitters

<a href="#">Login to Submit</a>	<a href="#">Submission Guidelines</a>	<a href="#">MIAME Standards</a>
	<a href="#">Update Guidelines</a>	<a href="#">Citing and Linking to GEO</a>
		<a href="#">Guidelines for Reviewers</a>
		<a href="#">GEO Publications</a>

## B) GEO veri bankası üzerinden gen ifade verilerinin açılması



The screenshot shows the NCBI GEO website interface. The top navigation bar includes 'NCBI', 'Resources', 'How To', and 'Email GEO'. A search bar is located on the right. The main content area is divided into several sections: 'Gene', 'Getting Started', 'Browse Content', and 'Information for Submitters'. The 'Gene' section is highlighted, and a dropdown menu is open, showing options like 'BioSystems', 'Database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP)', 'E-Utilities', 'Gene', 'Gene Expression Omnibus (GEO) Database', 'Gene Expression Omnibus (GEO) Datasets', 'Gene Expression Omnibus (GEO) Profiles', 'Genome Workbench', 'HomoloGene', 'Map Viewer', 'Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)', 'RefSeqGene', 'UniGene', 'All Genes & Expression Resources...', and 'FTP Site'. The 'Browse Content' section shows a table with columns for 'Repository Browser', 'DataSets', 'Series', 'Platforms', and 'Samples'. The 'Information for Submitters' section includes links for 'Login to Submit', 'Submission Guidelines', 'Update Guidelines', 'MIAME Standards', 'Citing and Linking to GEO', 'Guidelines for Reviewers', and 'GEO Publications'.

## C) BHTRHK araması sonrası ilişkili veri setlerinin görünümü

- Platform: GPL16791 17 Samples  
Download data: TXT  
Series Accession: GSE149005 ID: 200149005  
[PubMed](#) [Similar studies](#) [SRA Run Selector](#)
12. [HIF-1a and HIF-2a differently regulate tumour development, metabolism and inflammation of clear cell renal cell carcinoma in mice](#)  
(Submitter supplied) Mutational inactivation of VHL is the earliest genetic event in the majority of clear cell renal cell carcinomas (ccRCC), leading to accumulation of the HIF-1alpha and HIF-2a transcription factors. While correlative studies of human ccRCC and functional studies using human ccRCC cell lines have implicated HIF-1a as an inhibitor and HIF-2a as a promoter of aggressive tumour behaviours, their roles in tumour onset have not been functionally addressed. more...  
Organism: Mus musculus  
Type: Expression profiling by high throughput sequencing  
Platform: GPL21103 39 Samples  
Download data: TAB  
Series Accession: GSE150983 ID: 200150983  
[SRA Run Selector](#)
13. [Malignant melanotic Xp11 neoplasms exhibit a clinicopathological spectrum and gene expression profiling akin to alveolar soft part sarcoma: a proposal for reclassification](#)  
(Submitter supplied) We employed RNA sequencing-based clustering analysis to better understand the relationship of this unique entity to its closest histopathologic and immunophenotypic counterparts, including ASPS, conventional PEComa, and Xp11 translocation RCC  
Organism: Homo sapiens  
Type: Expression profiling by high throughput sequencing  
Platform: GPL20301 51 Samples  
Download data: TXT  
Series Accession: GSE150474 ID: 200150474  
[SRA Run Selector](#)
14. [Expression data from patients with different stages of clear cell renal cell carcinoma](#)  
(Submitter supplied) **Clear cell renal cell carcinoma** is the most common type among kidney cancers, accounting for 80% of all kidney cancer cases and over 30% of patients have metastases at the time disease is diagnosed. The process of epithelial-mesenchymal transition is crucial for the development and progression of cancer, and here we wanted to check the expression of genes on different stages of tumor progression, and find which of them changes significantly with increased grade.  
Organism: Homo sapiens  
Type: Expression profiling by array  
Platform: GPL17692 60 Samples  
Download data: CEL, CHP  
Series Accession: GSE150404 ID: 200150404  
[Analyze with GEO2R](#)
15. [Expression data of renal cancer cell treated with Oncolytic virus VSVd51 and Kadcyia](#)  
(Submitter supplied) We propose a strategy to boost the therapeutic efficacy of Oncolytic therapy by combining it with Kadcyia The mechanism of action was examined by microarray analysis using the Affymetrix Human PrimeView Array.  
Organism: Homo sapiens



bu genin deneysel koşullar arasında farklı şekilde ifade edilip edilmediğini hemen görmeyi mümkün kılmıştır. GEO data analizleri sonrasında elde edilen sonuçlarda 5 ayrı parametre elde edilir (Tablo 6) .

**Tablo-6 GEO data analiz sonucu elde edilen veri türleri.**

<b>adj.P.Val</b>	Çoklu test için ayardan sonra P değeri. Bu sütun genellikle sonuçları yorumlamak için birincil istatistik olarak önerilir. En küçük P değerlerine sahip genler en güvenilir olanlardır.
<b>P.Value</b>	P değeri
<b>t</b>	Denetimli t-istatistiği (yalnızca iki grup Örnek tanımlandığında kullanılabilir)
<b>B</b>	Genin farklı şekilde ifade edildiği B-istatistiği veya log-olasılıkları (sadece iki örnek grubu tanımlandığında kullanılabilir)
<b>logFC</b>	Log2 kat değişimi (sadece iki örnek grubu tanımlamalı kullanılabilir)
<b>F</b>	Denetimli F-istatistiği, tüm çift-bazlı karşılaştırmalar için t-istatistiklerini o gen için genel bir anlamlılık testinde birleştirir (sadece ikiden fazla Örnek grubu tanımlandığında kullanılabilir)

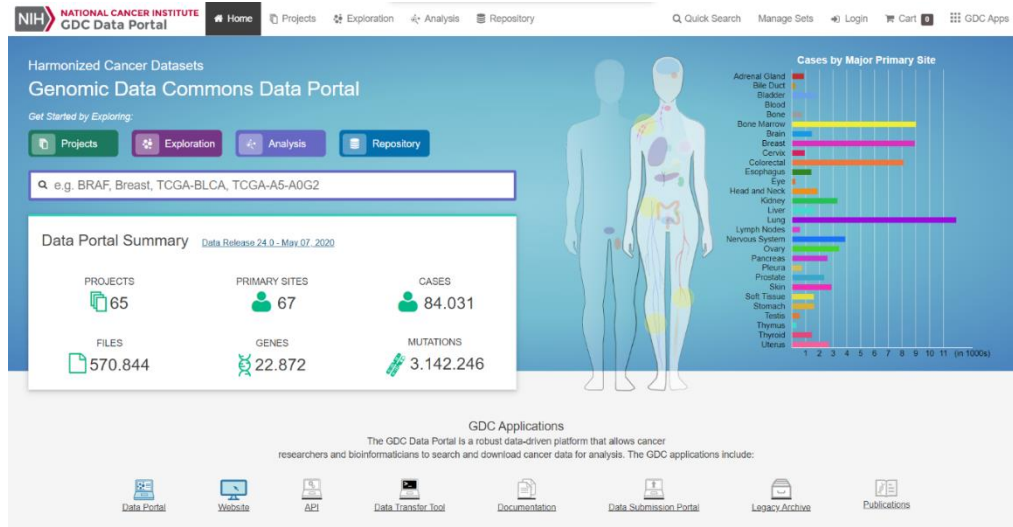
### 2.6.1.2. TCGA Data

Kanser Genom Atlası (TCGA), genom dizilimi ve biyoinformatik kullanarak kanserden sorumlu genetik mutasyonları kataloglamak için 2006 yılında başlatılan bir projedir. TCGA, kanserin genetik temelini daha iyi anlayarak teşhis etme, tedavi etme ve önleme yeteneğini geliştirmek için yüksek verimli genom analiz teknikleri uygulamaktadır.

TCGA, Ulusal Kanser Enstitüsü'nün Kanser Genomikleri Merkezi ve ABD hükümeti tarafından finanse edilen Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü tarafından denetlenmektedir. TCGA çalışmalarına 2006 yılında üç yıllık bir pilot proje ile başlamıştır. Proje kapsamında glioblastoma, akciğer ve yumurtalık kanserinin karakterizasyonuna odaklandı. Çalışmaların odak noktası 2009 yılında, 2014 yılına kadar 20-25 farklı tümör tipinin genomik karakterizasyonunu ve sekans analizini içermektedir (Brooks et al., 2014). Günümüzde TCGA 20,000'in üzerinde hasta verisini ve 33 kanser türünü kapsayan merkezi bir kanser genomik veri bankası olarak güncel halini almıştır. Kullanılan moleküler yöntemler arasında gen ekspresyon profili, kopya sayısı varyasyon profili, SNP genotipleme, genom DNA metilasyon

profili, miRNA profili ve en az 1.200 genin ekson sekanslaması yer almaktadır. TCGA, en az 6.000 aday gen ve miRNA dizileri de dahil olmak üzere bazı tümörlerin tüm genomlarını dizilemektedir.

Geçmiş 10 yılda, TCGA 2.5 petabayttan fazla genomik, epigenomik, transkriptomik ve proteomik veriyi yapısına dahil etmiştir. Kanseri teşhis etme, tedavi etme ve önleme kabiliyetimizde gelişmelere yol açan veriler, araştırma topluluğundaki araştırmacılara açık kaynak olarak sunulmaktadır (Şekil 14).



Şekil-14 TCGA veri bankasının anasayfa görüntüsü

### 2.6.1.3. cBioportal

Kanser genomik verileri için cBioPortal orijinal olarak Memorial Sloan Kettering (MSK) Kanser Merkezi'nde geliştirilmiştir. Genel cBioPortal sitesi, MSK'daki Moleküler Onkoloji Merkezi tarafından araştırmacılara sunulmaktadır (Şekil 15). CBioPortal yazılımı artık GitHub aracılığıyla bir açık kaynak lisansı altında bulunmaktadır. Yazılım şimdi MSK, Dana Farber Kanser Enstitüsü, Toronto'daki Prens Margaret Kanser Merkezi, Philadelphia Çocuk Hastanesi, Hollanda'daki Hyve ve Ankara'daki Bilkent Üniversitesi'nden oluşan çok kurumlu bir ekip tarafından geliştirilmekte ve sürdürülmektedir. Kanser Genomiği için cBioPortal, çok boyutlu kanser genomik veri kümelerinin etkileşimlerinin ve özelliklerinin araştırılması için açık erişimli, açık uçlu bir kaynaktır. cBioPortal'ın amacı, büyük ölçekli kanser

genomik projelerinden moleküler profillere ve klinik özelliklere hızlı ve yüksek kalitede erişim sağlayarak karmaşık genomik veriler ve kanser araştırmaları arasındaki engelleri önemli ölçüde azaltmaktadır (Manuscript, 2014).

Portalda; mutasyonları, DNA kopya numarası verilerini, gen ifade değerlerinin log2 veya doğrusal kopya numarası verilerini, mRNA ve miRNA ifade verilerini depolar ve saklar. Protein seviyesi ve fosfoprotein seviyesi verileri (RPPA veya kütle spektrometresi bazlı), DNA metilasyon verileri ve tanımlanmamış klinik veriler yine araştırmacıya sunulan veri türleri arasındadır (Chakravarty et al., 2017).

The screenshot displays the cBioPortal website interface. The main content area is titled 'Select Studies for Visualization & Analysis' and shows a search bar with '0 studies selected (0 samples)'. Below the search bar, there is a list of cancer types with their respective sample counts. The 'Kidney' category is selected, showing 17 studies. The detailed view for 'Kidney Renal Cell Carcinoma' is shown, listing various studies with their sample counts and filters. The right sidebar contains 'What's New' and 'Cancer Studies' sections, including a 'Cases by Top 20 Primary Sites' bar chart.

**Şekil-15 cBioportal veri tabanı anasayfa görüntüsü**

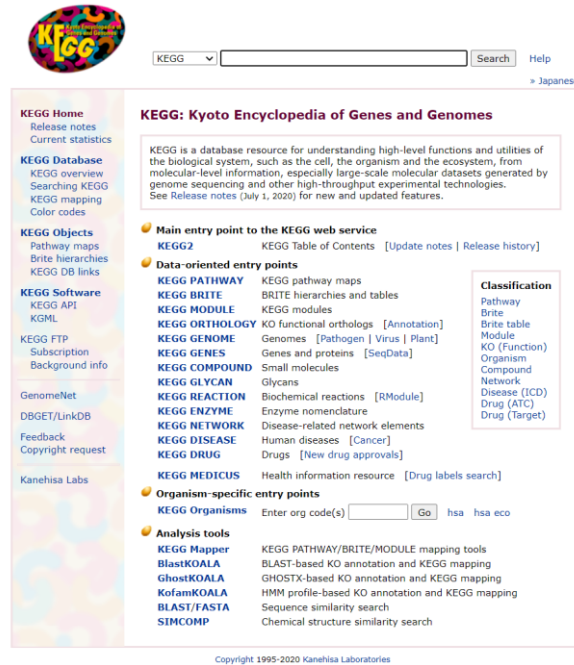
cBioPortal, TCGA gibi büyük konsorsiyum çabalarının yanı sıra bireysel laboratuvarlardan yayımları barındıran büyük ölçekli kanser genomik veri setlerini araştırmak için bir analiz aracıdır. Bir grup hastada bir dizi kanser türünde genomik değişiklikleri hızlı bir şekilde görebilir, hayatta kalma analizi gerçekleştirilebilir ve grup karşılaştırmaları yapılabilir.



#### 2.6.1.4. KEGG

KEGG, hücre, organizma ve ekosistem gibi biyolojik sistemin üst düzey fonksiyonlarını ve faydalarını, moleküler düzeydeki bilgilerden, özellikle genom dizilimi ve diğer yüksek verimlilikle üretilen büyük ölçekli moleküler veri kümelerinden anlamlandırmak için kullanılan bir veritabanı kaynağıdır (Şekil 16).

Etkileşim, reaksiyon ve ilişki ağlarının moleküler bağlantı şemaları (sistem bilgileri) ile entegre olan genlerin ve proteinlerin moleküler yapı taşlarından (genomik bilgi) ve kimyasal maddelerden (kimyasal bilgi) oluşan biyolojik sistemin bilgisayar diline dönüştürülmüş veri bankası olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu analiz programı, biyolojik sistemi bozan hastalık ve ilaç bilgileri içermektedir (Kanehisa et al., 2012).



Şekil-16 KEGG anasayfa görüntüsü

KEGG veritabanı 1995 yılından beri Kanehisa Laboratories tarafından geliştirilmektedir ve genom dizilemesi, diğer yüksek verimli deneysel teknolojiler tarafından üretilen büyük ölçekli moleküler veri setlerinin entegrasyonu ve yorumlanması için önemli bir referans bilgi tabanıdır (Z. Wang et al., 2018).

KEGG, on sekiz veritabanından oluşan entegre bir veritabanı kaynağıdır. Web sayfalarının renk kodlaması ile ayırt edilen sistem, genomik, kimyasal ve sağlık bilgileri olarak kategorize edilirler.

## **2.6.2. Analiz Programları**

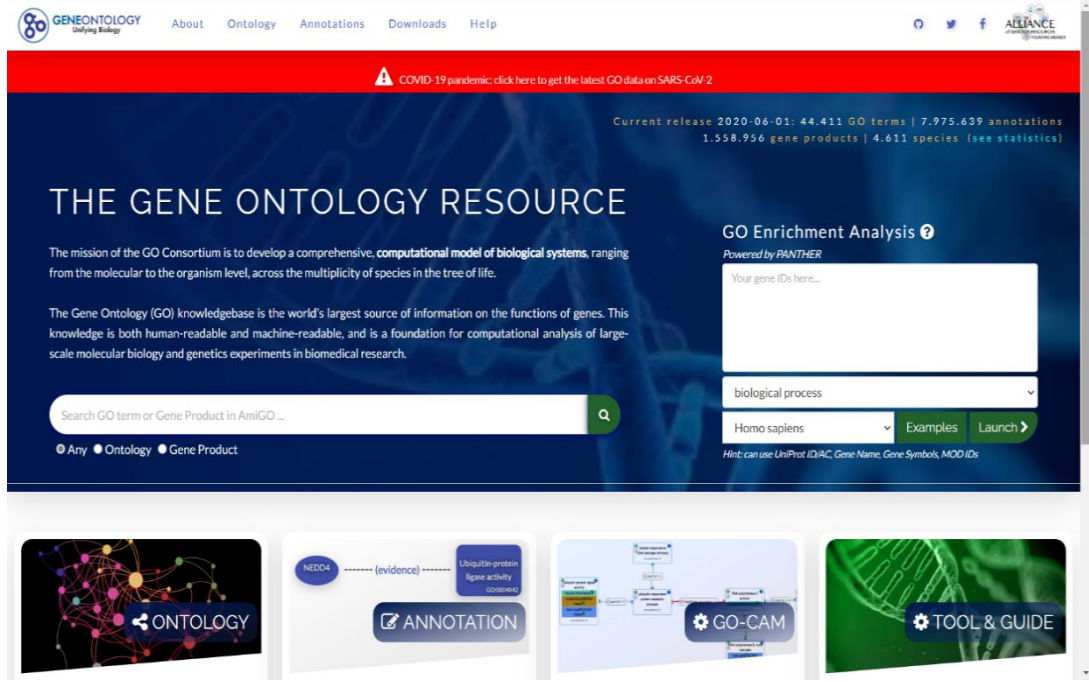
### **2.6.2.1. Ağ Varyantları**

KEGG veri tabanı içerisinde yolak analizleri ve bu yolaklar arası etkileşimlerin analiz edilebildiği bir arayüz sunmaktadır. KEGG analizi ile farklı organizmalar arasında genlerin, genom yapılarının korunmasına ve varyasyonuna odaklanarak geliştirilmiştir. KEGG yolak haritalarının, BRITE hiyerarşilerinin ve KEGG modüllerinin referans veri setlerini fonksiyonel ortologlar (KO) kavramı ile bir araya getirilerek geliştirilmiştir. Böylece KEGG yolak analizi ve diğer prosedürler herhangi bir hücrel organizmaya uyarlanabilmektedir.

KEGG ağı, KEGG tarafından sadece gen varyantlarının değil, virüslerin ve diğer faktörlerin neden olduğu ağ varyantları açısından hastalıklar ve ilaçlar hakkında analiz yapabilme olanağı sağlamaktadır.

### **2.6.2.2. Gene Ontology**

Gen ontolojisi (GO), tüm türler arasında gen ve gen ürünlerini niteliklerinin aralarındaki ilişkinin nicel anlamda analiz edilmesinde önemli bir biyoinformatik analiz aracı olarak kullanılmaktadır. GO, ilk olarak 1998'de üç model organizmanın genomlarını inceleyen bir araştırmacı konsorsiyumu tarafından inşa edilmiştir (Denny et al., 2018) (Şekil 17). *Drosophila melanogaster* (meyve sineği), *Mus musculus* (fare) ve *Saccharomyces cerevisiae* (bira veya fırıncı mayası) gibi diğer birçok model organizma genetik veri tabanı, GO Konsorsiyumu'na katılmıştır. GO sadece verinin tanımlanması değil, aynı zamanda verileri görüntülemek ve uygulamak için araçların geliştirilmesine de katkıda bulunan bir veri bankası olarak inşa edilmiştir. Birçok bitki, hayvan ve mikroorganizma veri tabanı bu projeye katkıda bulunmaktadır. Temmuz 2019 itibarıyla, GO 44.945 adet genomik veriyi içermektedir. 4.467 farklı biyolojik organizmaya ait 6.408.283 moleküler veriyi yapısında bulundurmaktadır. GO'nun gelişimi ve kullanımı hakkında önemli bir literatür vardır ve biyoinformatik tarafından standart bir araç haline gelmiştir. Biyoinformatiksel yaklaşımın GO'sinde hedeflediği üç basamak vardır: GO'si oluşturmak, gen / gen ürünlerine ontoloji ilişkisi skoru oluşturmak ve ilk iki madde için yazılım ve veritabanları geliştirmektir.

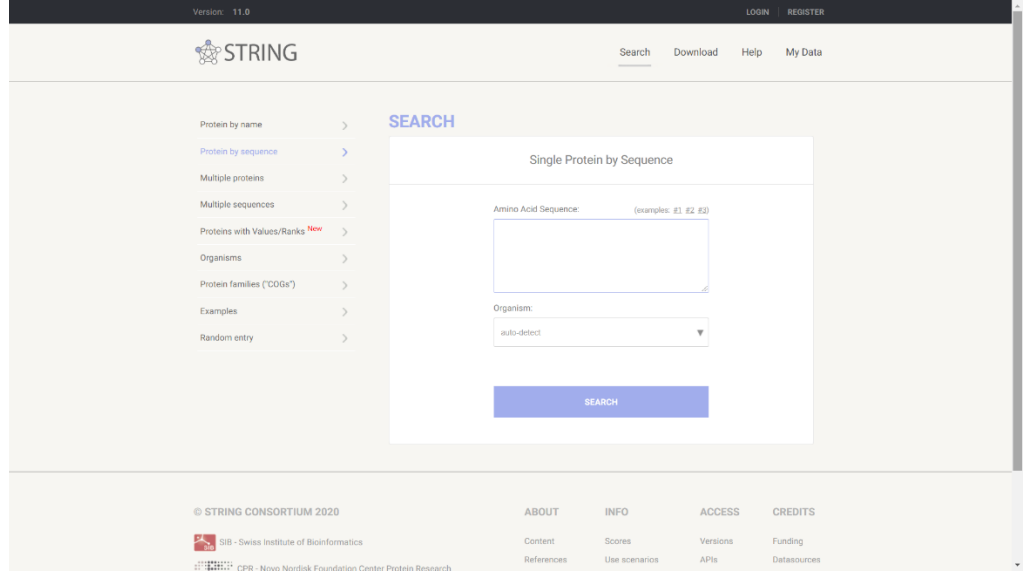


Şekil-17 GO anasayfa görüntüsü

GO genlerin ve gen ürünlerinin işlevine odaklanmaktadır. Biyoloji ve ilgili alanlarda evrensel bir standart moleküler terminoloji kullanılamamaktadır. Genetik verinin kullanımı bir türe, araştırma alanına ve hatta belirli bir araştırma grubuna özgü olabilmektedir. Bu durum elde edilen bilginin bir araya getirilerek analiz edilmesini zorlaştırmaktadır. GO projesi, farklı çalışmalardan saptanan gen ürün özelliklerini temsil eden tanımlanmış verilerin bir araya getirilmesine, analiz edilebilmesine olanak sağlamaktadır.

### 2.6.2.3. String

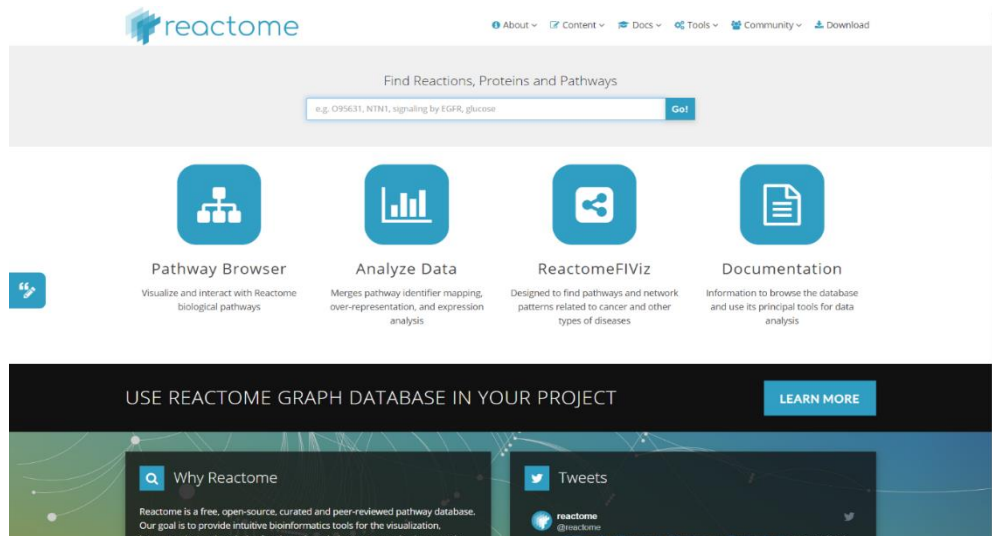
String, bilinen ve tahmin edilen protein-protein etkileşimlerinin incelendiği bir veritabanıdır. Bu veri tabanı etkileşimler arasında doğrudan (fiziksel) ve dolaylı (fonksiyonel) ilişkiler; hesaplama tahmininden, organizmalar arasındaki bilgi transferinden ve diğer veritabanlarından toplanan etkileşimlerden kaynak olarak analizlerini gerçekleştirmektedir. STRING veritabanı şu anda 5900 organizmadan gelen 24.584.628 proteini kapsamaktadır (Croft et al., 2011).



Şekil-18 String anasayfa görüntüsü

#### 2.6.2.4. Reactome

Reactome; açık kaynaklı, açık erişimli ve uluslararası hakemli bir veritabanıdır. Sistemin temel amacı moleküler ve klinik araştırmalar için; genom analiz verisi, sistem biyolojisi, moleküler yolak verileri gibi birden fazla ve farklı verinin görselleştirilmesi, yorumlanması ve analizi için silico biyoinformatik araçlarını kullanmaktır. 2003 yılında kurulan Reactome projesi; Lincoln Stein, Peter D'Eustachio, Henning Hermjakob ve Guanming Wu tarafından yürütülen bir çalışmadır (Croft et al., 2011) (Şekil 19).



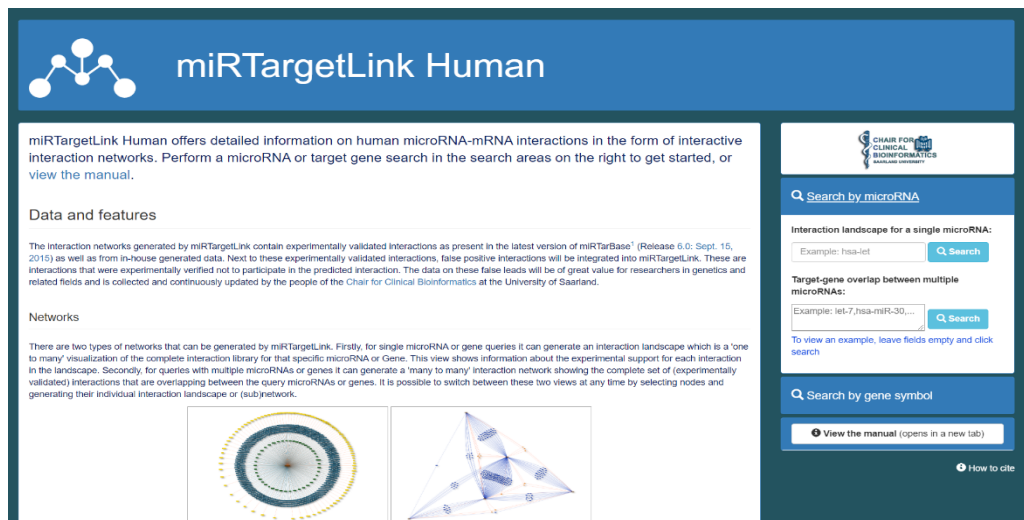
Şekil-19 Reactome anasayfa görüntüsü

Biyolojik bilgi son yıllarda o kadar çok sayıda ve karmaşık hale geldi ki, uzman kişilerin dahi geleneksel yayın formatlarında ve mevcut bilgi yönetimi araçlarıyla bilgiyi yönetmesi imkânsız hale gelmiştir.

Reactome, sinyal ve metabolik moleküllerin arasındaki ilişkisel yapıyı nicel olarak analizyen ve biyolojik yollara, metabolik süreçlere, döngülere etkisini modelleyerek hesaplayan bir veri tabanıdır. Reactome veri modelinin ana birimi moleküllerin kimyasal tepkisidir. Reaksiyonlara katılan yapıların (nükleik asitler, proteinler, kompleks moleküller, aşilar, anti-kanser terapötikleri ve küçük moleküller) arasında bir biyolojik etkileşim ağı oluşturur ve bunları yollar halinde gruplandırılır. Reactome'daki biyolojik yolların örnekleri arasında klasik ara metabolizma, sinyalizasyon, transkripsiyonel düzenleme, apoptoz ve hastalık yapısı bulunmaktadır.

#### 2.6.2.5. miRTargetLink Human

miRTargetLink Human, insan miRNA-mRNA etkileşim ağlarını ayrıntılı bilgiler şeklinde sunan bir veri tabanıdır (Şekil 20). MiRTargetLink tarafından oluşturulan etkileşim ağları, miRTarBase1'in (Sürüm 6.0: 15 Eylül 2015) en son sürümünde olduğu gibi oluşturulan verilerden deneysel olarak doğrulanmış etkileşimler içerir. Bu programda deneysel olarak doğrulanmış bu etkileşimlerin yanında, yanlış pozitif etkileşimler miRTargetLink yapısında analiz edilmektedir. Bunlar, tahmin edilen etkileşime katılmadığı deneysel olarak doğrulanmış etkileşimlerdir.



Şekil-20 miRTargetLink Human anasayfa görüntüsü

miRTargetLink tarafından oluşturulabilen iki tür ağ vardır. İlk ağ tek bir gen veya miRNA'nın genomdaki etkileşim kurduğu gen ve miRNA 'ların arasındaki ilişkiyi analizler. İkinci ağ ise birden fazla gen veya miRNA' nın tek bir seferde analiz edilmesini sağlar. Analize sokulan her bir gen veya miRNA için modelleme yapılarak düğüm noktaları ve ilişki katsayıları analizlenmektedir.

Bu veri bankası sayesinde bir hastalıktan sorumlu geni hedef alan miRNA tespitinden, bir hastalığın gelişiminden sorumlu olduğu düşünülen çok sayıda gen veya miRNA yapısının hastalığın gelişim yolağındaki etkilerinin derece büyüklüklerine kadar hesaplaması yapılabilmektedir.

### 2.6.2.6. TargetScan Human Predicts Biological Targets

TargetScan, her miRNA'nın dizisi üzerindeki desenleri araştırarak miRNA'ların biyolojik hedeflerini tahmin edebilen bir algoritmaya sahiptir (Agarwal et al., 2015) (Şekil 21). Memelilerde tahminler, miRNA dizisinin kümülatif ağırlıklı bağlam puanları kullanılarak hesaplanır ve hedeflemenin skoru en yüksekten düşüğe doğru öngörülen etkinliğine göre sıralanır.

**TargetScanHuman**  
Prediction of microRNA targets  
Release 7.2: March 2018 Agarwal et al., 2015

Search for predicted microRNA targets in mammals [Go to TargetScanMouse]  
[Go to TargetScanWorm]  
[Go to TargetScanFly]  
[Go to TargetScanFish]

1. Select a species

AND

2. Enter a human gene symbol (e.g. "Hmga2")  
or an Ensembl gene (ENSG00000149948) or transcript (ENST00000403681) ID

AND/OR

3. Do one of the following:

- Select a broadly conserved\* microRNA family
- Select a conserved\* microRNA family
- Select a poorly conserved but confidently annotated microRNA family
- Select another miRBase annotation

Note that most of these families are star miRNAs or RNA fragments misannotated as miRNAs.

Enter a microRNA name (e.g. "miR-9-5p")

\* broadly conserved = conserved across most vertebrates, usually to zebrafish  
conserved = conserved across most mammals, but usually not beyond placental mammals

TargetScan predicts biological targets of miRNAs by searching for the presence of conserved 8mer, 7mer, and 6mer sites that match the seed region of each miRNA (Lewis et al., 2005). As an option, predictions with only poorly conserved sites are also provided. Also identified are sites with mismatches in the seed region that are compensated by conserved 3' pairing (Friedman et al., 2009) and centered sites (Shin et al., 2010). In mammals, predictions are ranked based on the predicted efficacy of targeting as calculated using cumulative weighted context++ scores of the sites (Agarwal et al., 2015). As an option, predictions are

© 2006-2016 Whitehead Institute for Biomedical Research  
Whitehead Institute for Biomedical Research  
Questions: help@targetscan.edu  
Computability

### Şekil-21 TargetScan Human anasayfa görüntüsü

TargetScanHuman, UCSC tüm genom verileri tarafından tanımlanan insan genomundaki tüm 3 'UTR'leri ve ortologlarıyla eşleşmektedir.

### 2.6.2.7. Gene Set Enrichment Analyze (GSEA)

Gen setleri arasında istatistiksel bir farkın olup olmadığını analizleme metodudur (Subramanian et al., 2005). Veri setleri arasında tümör derecesi, invazyon durumu, Fuhrman derecesi, nüks görülüp görülmemesi gibi birçok biyolojik parametrenin karşılaştırılmalı bilgisini sunar (Şekil 22). Bu metod hasta bilgilerine göre oluşturulan iki farklı grup arasında analizleme yapar ve genlerin gruplar arasındaki gen ifade farklılıklarını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar 95% güven aralığındadır.

**UC San Diego** **BROAD INSTITUTE**

**Gene Set Enrichment Analysis** GSEA Home Downloads Molecular Signatures Database Documentation Contact Team

**Overview**

**Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)** is a computational method that determines whether an a priori defined set of genes shows statistically significant, concordant differences between two biological states (e.g. phenotypes).

- ▶ **Download** the GSEA software and additional resources to analyze, annotate and interpret enrichment results.
- ▶ **Explore the Molecular Signatures Database (MSigDB)**, a collection of annotated gene sets for use with GSEA software.
- ▶ **View documentation** describing GSEA and MSigDB.
- ▶ View guidelines for **using RNA-seq datasets with GSEA**.
- ▶ Use the **GenePattern** platform to run analyses, including classical GSEA and a variation designed for single-sample analysis (**ssGSEA**).

**What's New**

30-Mar-2020: MSigDB 7.1 released. New C3 sub-collections from the Gene Transcription Regulation Database and miRDB. Updated gene sets from Reactome 72 and GO (as of Jan 15, 2020). Gene annotations updated to Ensembl 99. See the [release notes](#) for details.

28-Feb-2020: We've added a new integration to the NDExProject IQuery tool on our [Investigate Gene Sets](#) page. To use it from a [Gene Set](#) just click on the Advanced query 'Further Investigate' link.

20-Aug-2019: MSigDB 7.0 released. This is a major release that includes a complete overhaul of gene symbol annotations, Reactome and GO gene sets, and corrections to miscellaneous errors. See the [release notes](#) for more information.

20-Aug-2019: GSEA 4.0.0 released. This release includes support for MSigDB 7.0, plus major internal updates for Java 11 support and performance improvements. See the [release notes](#) for more information.

[Follow @GSEA\\_MSigDB](#)

**License Terms**

GSEA and MSigDB are available for use under these license terms.

Please register to download the GSEA software, access our web tools, and view the MSigDB gene sets. After registering, you can log in at any time using your email address. Registration is free. Its only purpose is to help us track usage for reports to our funding agencies.

**Citing GSEA**

To cite your use of the GSEA software, a joint project of UC San Diego and Broad Institute, please reference Subramanian, Tamayo, et al. (2005, PNAS 102, 15545-15550) and Mootha, Lindgren, et al. (2003, Nat Genet 34, 267-273).

**Funding**

GSEA and MSigDB are currently funded by a grant from NCI's Informatics Technology for Cancer Research (ITCR)

**NIH NATIONAL CANCER INSTITUTE**  
Informatics Technology for Cancer Research

**Molecular Profile Data** **Gene Set Database** **Run GSEA** **Enriched Sets**

### Şekil-22 GSEA anasayfa görüntüsü

## 2.7. Biyoistatistik

Biyoistatistik, biyolojide çok çeşitli konulara istatistiksel yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanması olarak tanımlanmaktadır. Biyolojik deneylerin tasarımını, bu deneylerden verilerin toplanmasını, analizini ve sonuçların yorumlanmasını kapsamaktadır (Eloranta et al., 2020).

Biyostatistiksel modelleme çok sayıda modern biyolojik teorisinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Biyolojik çalışma yapan araştırmacılar gözlemleri sonucu elde ettiği deneysel veriyi anlamak için istatistiksel kavramları kullanmıştır. Bazı genetik bilimcileri, yöntem ve araçların geliştirilmesinde istatistiksel ilerlemelere bile katkıda bulunmuşlardır. Örneğin Gregor Mendel, bezelye ailelerindeki genetik ayrışma modellerini araştıran genetik çalışmalara başladı ve toplanan verileri açıklamak için istatistik analizleri kullanmıştır.

Araştırmacıların biyolojik verilerde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde ettiklerinin genel kanıtı, saptadıkları p-değerleridir. Biyoistatistik analizlerde p-değeri, sıfır hipotezinin ( $H_0$ ) doğru olduğu varsayılarak, gözlemlenen farklı sonuçlar elde etme olasılığı olarak adlandırılmaktadır. Bu analize hesaplanmış olasılık da denmektedir. P-değerini güven aralığı ( $\alpha$ ) ile karıştırmak araştırmacılar için yaygın bir hatadır, ancak  $\alpha$  önceden tanımlanmış bir eşiktir. P,  $\alpha$ 'dan küçükse, sıfır hipotezi ( $H_0$ ) reddedilmektedir (Eloranta et al., 2020).

Biyolojik verilerin istatistik analizinde birçok analiz tipi kullanılmaktadır. Örneğin, RT-qPCR ve mikrodizilerde olduğu gibi RNA-Dizileme (RNA-Seq) verilerinden genlerin ifade değerlerinin logaritmik karşılaştırılması gerektirmektedir.

### **2.7.1. T testi**

T-testi, test istatistiğinin bir araştırmacının sıfır hipotezi altındaki t-dağılımını takip ettiği herhangi bir istatistiksel hipotez testidir (Potochnik et al., 2018).

Test istatistiğindeki bir ölçkleme teriminin değeri biliniyorsa, test istatistiği normal bir dağılımı takip ederse, en yaygın olarak bir t-testi uygulanır. Ölçeklendirme terimi bilinmiyorsa ve yerine verilere dayalı bir tahmin verildiğinde, test istatistikleri (belirli koşullar altında) dağılımını takip eder. T-testi, örneğin, iki veri kümesinin ortalamalarının birbirinden önemli ölçüde farklı olup olmadığını belirlemek için kullanılabilir .

Ortalamadaki bir fark için iki örnekle t-testleri bağımsız örnekleri (eşlenmemiş örnekleri) veya eşleştirilmiş örnekleri içerir. Eşleştirilmiş t-testleri bir engelleme şeklidir. Eşleştirilen birimler karşılaştırılan iki gruba üyeliğinden bağımsız olan ile benzer olduğunda eşleştirilmemiş testlerden daha fazla güce sahiptir. Farklı bir bağlamda, bir gözlemsel çalışmada farklı faktörlerin etkilerini azaltmak için eşleştirilmiş t-testleri kullanılabilir. Her durumda, sıfır hipotezi altında bir t dağılımını



tam olarak takip eden veya yakından takip eden bir test istatistiği için formül verilmelidir. Ayrıca, her durumda uygun serbestlik dereceleri verilmektedir. Bu istatistiklerin her biri, tek örneklemlili veya iki örneklemlili bir test yapmak için kullanılabilir (Ruxton, 2006).

T değeri ve serbestlik derecesi belirlendikten sonra, p-değeri, Student'in t-dağılımındaki değerler tablosu kullanılarak bulunabilir. Hesaplanan p değeri istatistiksel anlamlılık için seçilen eşik altındaysa (genellikle 0.10, 0.05 veya 0.01 seviyesi), o zaman sıfır hipotezi alternatif hipotez lehine reddedilir.

### 2.7.1. Ki-Kare ( $X^2$ ) Testi

$X^2$  testi olarak da yazılan 'ki-kare testi' terimi, test istatistiği sıfır hipotezi altında ki-kare olarak dağıtıldığında gerçekleştirilmesi gereken belirli istatistiksel hipotez testleri türlerini ifade etmektedir. Distribution dağılımını takip eden test istatistikleri, gözlemler bağımsız ve normal olarak dağıtıldığında ortaya çıkar ve bu varsayımlar genellikle merkezi limit teoremi altında gerekçelendirilmektedir. Çiftlerin gözlemlerine dayanarak bir çift rastlantısal değişkenin sıfır bağımsızlık hipotezini test etmek için de  $X^2$  testi kullanılmaktadır (Mchugh, 2013).  $2 \times 2$  'lik karşılaştırma tablolarında Fisher,  $2 \times N$  ve  $N \times N$  tablolarında Pearson ki-kare testi kullanılmaktadır. 'Ki-kare testi' terimi genellikle test istatistiğinin dağılımının asimptotik olarak  $X^2$  dağılımına yaklaştığı, yani test istatistiğinin (sıfır hipotezi doğruysa) örneklem büyüklüğü arttıkça kare dağılımı gittikçe daha net görülmektedir.

Pearson'un ki kare testi, bir veya daha fazla kategorideki bir veya daha fazla kategoride beklenen frekanslar ve gözlemlenen frekanslar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için kullanılmaktadır (Mchugh, 2013).

Bu testin standart uygulamalarında gözlemler birbirini dışlayan sınıflara ayrılmaktadır. Eğer sıfır hipotezi denilen şey doğruysa, gözlemlerden hesaplanan test istatistiği  $X^2$  dağılımını takip etmektedir. Testin amacı, gözlenen frekansların sıfır hipotezinin doğru olduğunu varsayma olasılığını değerlendirmektir.

Fisher testi beklenmedik durum tablolarının analizinde kullanılan istatistiksel anlamlılık testi olarak kullanılmaktadır. Uygulamada, örneklem boyutları küçükken kullanılmasına rağmen, tüm örneklem boyutları için geçerlidir. Mucidi Ronald Fisher'dan isimlendirilmiştir ve tam bir hipotezden (örn. P-değeri) sapmanın önemi bir yaklaşıma dayanmak yerine tam olarak hesaplanabileceğinden, tam bir test sınıfından

biri olarak kullanılmaktadır. Bu birçok istatistiksel testte olduğu gibi, örneklem büyüklüğü sonsuza kadar büyüdükçe sınırdaki kesinleşmektedir.

### 2.7.3. Korelasyon Testi

İstatistiksel analizlerde, korelasyon veya bağımlılık, iki rastgele değişken veya iki değişkenli veri arasında nedensel olsun veya olmasın herhangi bir istatistiksel ilişkidir. En geniş anlamda korelasyon herhangi bir istatistiksel ilişkidir, ancak genellikle bir çift değişkenin doğrusal olarak ilişkili olduğu dereceyi ifade eder (Bishara & Hittner, 2012). Bağımlı fenomenlerin tanıdık örnekleri arasında, ebeveynlerin fiziksel durumları ile yavruları arasındaki korelasyon ve bir malın fiyatı ile tüketicilerin satın almak istediği miktar arasındaki korelasyon, talep eğrisinde gösterildiği gibidir.

Korelasyonlar faydalıdır, çünkü pratikte öngörücü bir ilişkiyi gösterebilirler. Resmi olarak, rastlantısal değişkenler olasılıklı bağımsızlığın matematiksel bir özelliğini karşılamıyorlarsa bağımlıdırlar. Bununla birlikte, teknik anlamda kullanıldığında korelasyon, test edilen değişkenler ve bunların beklenen değerleri arasındaki birkaç spesifik matematiksel işlem tipinden herhangi birini ifade eder. Esasen, korelasyon iki veya daha fazla değişkenin birbiriyle nasıl ilişkili olduğunun ölçüsüdür. Korelasyon derecesini ölçen, genellikle  $\rho$  veya  $r$  olarak gösterilen birkaç korelasyon katsayısı vardır. Bunlardan en yaygın olanı, sadece iki değişken arasındaki doğrusal bir ilişkiye duyarlı olan Pearson korelasyon katsayısıdır. Spearman'ın sıralama korelasyonu gibi diğer korelasyon katsayıları Pearson'dan daha sağlam, yani doğrusal olmayan ilişkilere daha duyarlı olacak şekilde geliştirilmiştir (Bishara & Hittner, 2012).

### 2.7.4. Sağ kalım Modellemesi

Sağ kalım modellemesi hastalıkların tanısal, prognostik ve tedavi süreçlerine etki eden her bir etkinin hastanın genel sağ kalımı üzerine etkisini sayısal olarak analiz edilmesidir. Heterojenitenin yüksek olduğu BHTRK hasta grubunda hastalığın tanımlanabilmesi ve uygun tedavi modellerinin seçilebilmesi adına yapılan sağ kalım modellemesi çalışmaları büyük önem arz etmektedirler (Bewick et al., 2004). Modellemenin ana girdisi olay - zaman ilişkisidir. Amaç bir ya da daha fazla ortak değişkenin olayın gerçekleşmesine kadar geçen süredeki etkisinin ölçülmesidir. Bu modellemede dikkat edilmesi gereken iki önemli husus vardır; öncelikle seçilen olay

durumunun tüm hastalarda gözlemlenebilir olmasıdır (Örneğin; ölüm, cerrahi eksizyon, ilaç uygulaması v.b), ikincil olarak ise olay gerçekleşene kadar geçen sürede hastaların yakın takipte tutulması gereklidir. Ayrıca, hastanın modellemeye dahil edilmeyen bir başka değişkeni ihtiva etmemesi gerekmektedir (Örneğin: Hastanızın başka bir sağlık kuruluşundan yardım, tedavi ve ilaç alması v.b).

Bu fonksiyon sayesinde sağ kalım modellemesinden elde edilen ham verinin işlenerek her bir değişkenin olay durumuna kadar geçen süredeki etki oranını analizler. Böylelikle hastalıkla ilişkili her bir parametrenin genel sağ kalım üzerine etkisi tespit edilmiş olmaktadır (Bewick et al., 2004).

Modelin doğru çalışabilmesi ve elde edilen sonuçların güvenilirliğinin yüksek olması için olay çok iyi analizlenmelidir. Yapılan en büyük hata hastalarda olay gerçekleşmeksizin takipten çıkan hastanın çıkış tarihinin olay olarak sisteme tanımlatılmasıdır. Model, bu veriyi de olay olarak kabul ederek analiz yapar ve sonuçlarınızın hiçbir güvenilirliği kalmaz (Bewick et al., 2004). Bu sorun için geliştirilen bir diğer sağ kalım modelleme fonksiyonu Kaplan Meier (KM) yöntemidir. KM yönteminin yapısı, size hem olayı hem de takipten çıkan hastalarınızın verilerini sisteme tanıtabilme özelliği sunmaktadır. KM' nin farkı sağ kalımda hayatta kalmaya %100 lük bir oran vererek olayı ve kayıp verili bilginin sağ kalımına oranını ayrı ayrı analizleyebilmesidir. Ancak KM iki yada daha fazla grup arasındaki sağ kalım oranlarını karşılaştıramaz (Örneğin; tedavi alan hasta grubu ve almayan hasta grubu, seviye I ve seviye IV hasta grubu v.b). Grupların karşılaştırılmasına olanak veren diğer metotlar mevcuttur.

Longrank testi, iki ya da daha fazla grup arasındaki sağ kalım farklılıklarını karşılaştırabilmektedir. Testin alt yapısında KM'nin modellemesinde kullandığı fonksiyonel yapı temel alınmaktadır. Bu test sadece gruplar arası farkı ortaya çıkarır, gruplar arasındaki sağ kalım durumları hakkında bilgi vermemektedir. Bir başka test rekabetçi risk modellemesidir ve daha spesifik analizlerde kullanılır. Örneğin olayımız ölüm ise, bu test ölümü araştırdığımız hastalıktan ya da etmeden dolayı mı yoksa, dolaylı sebeplerden dolayı mı olduğunu sisteme tanımlatmamızı sağlar kümülatif risk oranı ile hastalığın etkisini diğer testlere göre daha güvenilir olarak hesaplar (Bewick et al., 2004).

Cox oransal risk modeli, sağ kalımda en çok kullanılan modellerden biridir. Bağımlı değişkene ihtiyaç duyan bu model her bir değişkenin regresyon kat sayı analizini yaparak modele etki derecelerinin analiz edilmesine olanak sağlar.

#### 2.7.5. Delta CT Analizi

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) analizi sonucunda elde edilen ham CT datası delta CT analiz metodu ile işlenerek çalışılarda kullanılabilen sayısal değerlere dönüştürülür (Rao et al., 2013).

$X_n = X_0 (1 + EX)^n$  eşitliği ile tanımlanmaktadır. Bu eşitlikte, “ $X_n$ ”, n sayıda gerçekleşen PCR döngüsü sonucunda oluşan hedef molekül sayısını, “ $X_0$ ”, hedef molekülün başlangıç sayısını, “EX”, hedef molekülün amplifikasyonunun verimliliğini ve “n” de PCR reaksiyonunda gerçekleşen döngü sayısını ifade etmektedir. RT-qPCR deneylerinde, floresan sinyal miktarının gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısını ifade eden Ct (cycle threshold) değeri;  $X_T = X_0 (1 + EX)^{CT,X} = KX$  eşitliği ile açıklanabilmektedir. Bu eşitlikte, “ $X_T$ ” ile hedef molekülün Ct sayısı, “ $CT,X$ ” ile de hedef molekülün amplifikasyonu için gerçekleşen döngü sayısı tanımlanmaktadır. “ $Kx$ ” ise sabit değerdir. Endojen kontrol için de benzer bir eşitlik söz konusudur. Buna göre,  $RT = R_0 (1 + ER)^{CT,R} = KR$  eşitliğinde, “ $RT$ ” ile referans molekülün CT sayısı, “ $CT,R$ ” ile de referans molekülün amplifikasyonu için gerçekleşen döngü sayısı tanımlanmaktadır. “ $KR$ ” ise sabit değerdir. Hedef molekülün CT sayısının, referans molekülün CT sayısına bölünmesi ile oluşan, formülünden elde edilen sonuç ekspresyon değerini yani mutlak kantifikasyon değerini ifade etmektedir. Göreceli kantifikasyon değerinin hesaplanabilmesi için,  $X_N = K (1 + E)^{-\Delta CT}$  eşitliğinden yararlanılmaktadır. Bu eşitlikte yer alan “ $X_N$ ” değeri örneklemin normalize edilmiş mutlak kantifikasyon değerini ( $X_T/RT$ ) ifade etmektedir. “ $\Delta CT$ ” değeri ise hedef molekülün ve referansın eşik döngüleri arasındaki farkı ( $CT,X - CT,R$ ) ifade etmektedir. En son basamakta ise, “q” adı verilen bir örneklemin “ $X_N$ ” değeri ( $X_N,q$ ), “cb” adı verilen bir kalibratörün “ $X_N$ ” değerine ( $X_N,cb$ ) bölünür. Elde edilen değer,  $(\Delta CT,q \Delta CT,cb)$ ’ye eşit olup  $-\Delta \Delta CT$  değerini olarak adlandırılmaktadır. 150 bđ’den daha küçük olan amplikonlarda ve primer ve  $Mg^{2+}$  konsantrasyonları optimize edilmiş reaksiyonlarda “EX” değeri 1’e yakın olduğundan dolayı, örneklemin miktarı endojen kontrole ve relatif kalibratöre normalize edilmektedir. Bu nedenle, reaksiyon

sonunda elde edilen örneklem miktarı  $2^{-\Delta\Delta CT}$  olarak hesaplanmaktadır (Rao et al., 2013).

$2^{-\Delta\Delta CT}$  değerinin hesaplanmasından sonraki aşama, gen ve miRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin, tümör dokularda normal dokulara göre kaç kat arttığı ya da azaldığı ile ilişkilidir. Fold change (kat değişimi) olarak adlandırılan bu hesaplamada, hastaların normal böbrek dokularından elde edilen  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerlerinin ortalaması alınarak, her bir hastaya ait tümör dokudan elde edilen  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerinin, normal dokuların ortalama  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değerine bölünme işlemi gerçekleştirilir. Bu işlemin sonucundan elde edilen değerler ile her bir hedef gen ve miRNA için ayrı olmak üzere fold change grafikleri çizdirilir. Böylece, tümör dokularında normal dokuya göre, analiz edilen hedef gen ve ilgili miRNA'ların hangilerinin yüksek eksprese (up-regüle), hangilerinin düşük eksprese (down-regüle) olduğu hesaplanır (Rao et al., 2013).

#### **2.7.6. R Analizi**

R, istatistiksel hesaplama ve grafik için bir dil ve ortamdır. John Chambers ve meslektaşları tarafından Bell Laboratories'de (eski adıyla AT&T, şimdi Lucent Technologies) geliştirilen S dili ortamına benzeyen bir GNU projesidir. R, S'nin farklı bir uygulaması olarak kabul edilebilir. Bazı önemli farklılıklar vardır, ancak S için yazılan çok sayıda kod R altında değiştirilmemiştir (Bivand et al., 2012).

R çok çeşitli istatistiksel (doğrusal ve doğrusal olmayan modelleme, klasik istatistiksel testler, zaman serisi analizi, sınıflandırma, kümeleme v.b) ve grafiksel teknikler sağlar ve oldukça genişletilebilir. S dili genellikle istatistiksel metodolojide araştırma için tercih edilen araçtır ve R bu aktiviteye katılım için Açık Kaynaklı bir yol sağlamaktadır.

R'nin güçlü yanlarından biri, gerektiğinde matematiksel semboller ve formüller de dahil olmak üzere, iyi tasarlanmış yayın kalitesinde grafikler üretmenin kolaylığıdır. Grafiklerdeki küçük tasarım seçenekleri için varsayılanlara büyük özen gösterilmiştir, ancak kullanıcı tam kontrolü elinde tutmaktadır.

R, çok çeşitli UNIX platformlarını ve benzer sistemleri (FreeBSD ve Linux dahil), Windows ve MacOS üzerinde derler ve çalıştırmaktadır.

R, veri işleme, hesaplama ve grafiksel görüntüleme için entegre bir yazılım araçları paketidir (Şekil 23). Araştırma kapsamında global veri bankalarından elde



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Global Veri Bankalarının Taranması

Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), TCGA ve cBioPortal veri bankalarında "Clear Cell Renal Carcinoma" anahtar kelimeleri kullanılarak yapılan taramalarda çıkan sonuçlar incelenmiştir. Tespit edilen çalışma setleri içermiş oldukları klinik verilerine (yaş, evre, cinsiyet, kullanılan ilaç, metastaz durumu, ilaç direnci, nüks v.b) ve veri türüne (Gen ifade ve sekans verisi) göre klasifiye edilerek tek bir dosya halinde derlenmiştir.

##### 3.1.1. Aday Genlerin Tespiti

GEO, TCGA ve cBioportal 'dan sağlanan klasifiye edilmiş ekspresyon ve mutasyon profilleri analiz edilmiştir. GEO platformundaki verilerin analizi GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) sistemine uygunsuzsa GEO2R üzerinden yapılmıştır. Çalışma setlerinde verilen datanın çevrimiçi analizi mevcut olmayanların ham datası toplanarak R studio programı üzerinden Biocouductor cran ara yüzünde limma paketi kullanılarak analizlenmiştir. Elde edilen veri sonuçlarının sadece GEO üzerinden olması bir bias oluşturmaması için elde edilen sonuçlar The Cancer Genome Atlas (TCGA) veri bankasının verilerini de yapısında bulunduran The cBioPortal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org/>) ve Gen Expression Profiling Interactive Analysis (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) ile karşılaştırılmıştır.

##### 3.1.2. Aday Genleri Hedefleyen miRNA'ların Tespiti

GEO, TCGA ve cBioportal veri bankalarından saptanan yeni aday gen ve miRNA'larda; KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) kullanılarak kanser gelişiminde etkisi muhtemel sinyal yollarının analizleri yapılmıştır. Yine bu platformda BHTRK'da kullanılan kanser ilaçları ile ilişkileri incelenmiştir. GO (<http://geneontology.org/>) kullanılarak (<http://pantherdb.org/>) sinyal yolağı analizleri yapılmıştır.

Protein-Protein Interaction Networks (String Version 11.0) (<https://string-db.org/>) veri tabanı kullanılarak biyobelirteç gen ürünlerinin hastalık ve diğer genlerle ilişkileri analiz edilmiştir. TargetScan Human Prediction of miRNA Targets veri tabanı ([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)) kullanılarak biyobelirteç olarak

belirlenen miRNA'ların hangi genler ile etkileşim kurabileceğinin skorlaması yapılmıştır.

Tüm bu analizler sonucunda BHTRHK ile ilişkisi en yüksek derecede olan potansiyel biyobelirteçler (Üç gen ve üç miRNA) belirlenmiştir.

### **3.2. Aday Gen ve miRNA'ların Yolak Analizleri**

MiRNA Pathway Dictionary Database (miRPathDB) (<https://mpd.bioinf.uni-sb.de/overview.html>) kullanılarak hastalıkla ilişkisi belirlenen miRNA'ların sinyal yollarının üzerideki etkilerinin analizleri yapılmıştır.

Reactome veri tabanı kullanılarak belirlenen aday genlerin yolak analizleri ve metabolik görevleri analizlenmiştir.

### **3.3. Hasta Grubu**

Mevcut çalışma kapsamında, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı tarafından 01.01. 2005- 31.12.2016 yılları arasında opere edilen BHTRHK hastalarından tümör ve normal dokular alınmıştır. Aday biyobelirteç çalışmaları sonucunda tespit edilen *VHL*, *HIF1A*, *KAT5* genleri ve miR-22, miR-138, miR-223 miRNA'larının tümör gelişimi ile ilgili ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. BHTRHK'da Von HippelLindeu Sendromundan da sorumlu olan *VHL* geninin sekans analizi ile mutasyon taraması ve western blot yöntemi ile protein analizleri yapılmıştır.

Bu amaçla, 100 adet BHTRHK hastasının parafinize edilmiş tümör ve normal dokularına ait örneklerle, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın arşivinden ulaşılarak ve ilgili hastaların dokularının histopatolojik özellikleri Doç. Dr. Berna Aytaç Vuruşkan tarafından değerlendirilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Belirlenen hastaların klinik özellikleri, tümörlerin histolojik ve patolojik özellikleri, Patoloji Anabilim Dalı hasta arşivinden elde edilmiştir.

Planlanan tez çalışması ile ilgili olarak oluşturulan tez projesi, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun OUAP(T)2017/3 sayılı proje numarası ile kabul edilmiştir. Çalışmaya dahil edilmesi planlanan BHTRHK hastalarının tümör ve normal doku materyalleri, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'nun, 07 Şubat 2017 tarihli 2017-1/23 numaralı etik kurul kararı ile uygun bulunduktan sonra, Patoloji Anabilim Dalı arşivinden temin edildi.



### 3.4. Gereçler

#### 3.4.1. Kullanılan Aletler

- Gene Amp PCR 9700 Thermocycler, Applied Biosystems, USA.
- Spektrofotometre, Life Science Uv/Vis DU730, Beckman Coulter
- LightCycler 480II, Roche Diagnostics, USA
- Isıtıcı blok (DB-2A), Techne, England.
- Santrifüj (Z-23), Hermle, Germany.
- Santrifüj (22R), Beckman Coulter, Germany.
- Plate santrifüjü, Thermo, USA.
- Manyetik Karıştırıcı (Vorteks), Velp Scientifica, Italy.
- + 4°C Buzdolabı, Alaska, İstanbul, Turkey.
- -20°C Buzdolabı, Bosch, İstanbul, Turkey.
- -80°C Buzdolabı, Nüve, İstanbul, Turkey.
- PCR UV kabini, Biosan, Latvia.
- Pipet, (0.5-10 µl), Eppendorf, USA.
- Pipet, (10-100 µl), Eppendorf, USA.
- Pipet, (20-200 µl), Eppendorf, USA.
- Pipet F2, (100-1000 µl), Thermo, USA.
- C-DiGit® Blot Scanner.
- Shakers, Biologix, USA.
- Mini Gel Tank, Thermo Fisher, USA.
- Elektroforez Güç Kaynağı, EV202, USA.
- Genomalab GeXP, Sekans cihazı, Beckman Coulter, German

#### 3.4.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Biostic Paraffin Removal Reagent, MO BIO, USA.
- RNeasy FFPE kiti (200 örneklik), Qiagen, USA.
- miRNeasy FFPE kiti (200 örneklik), Qiagen, USA.
- Taqman High Capacity RNA to cDNA Master Mix, Applied Biosystems, USA.
- Taqman MicroRNA Reverse Transkripsiyon Kiti, Applied Biosystems, USA.
- Taqman MaturemiRs Assays, Applied Biosystems, USA.
- Real Time Ready Catalog Assays, Roche Diagnostics, USA.

- Taqman Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA.
- Light Cycler 480 Probe Master, Roche Diagnostics, USA.
- Etanol, Merck, Germany.

### **3.5. Yöntemler**

#### **3.5.1. Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi**

Operasyon sırasında çıkartılan, dokuların formalin ile fikse edilip parafin içerisine gömülen ve ilgili patalog tarafından değerlendirilen 100 BHTRHK hastasına ait tümör ve normal doku bloklarından alınan kesitlerden ilk olarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, deney prosedürü kapsamında, hastaya ait doku örneklerinden bistüri yardımıyla 0.2-0.5 cm kesilerek ependorf tüpler içerisine alınmıştır. Doku materyalleri, Biostic Parafin Removal Reagent (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA) kullanılıp, parafinden uzaklaştırma işlemine tabi tutularak, 3 serilik %100'lük alkol aşamalarından geçirilmiştir. Materyallerdeki alkol kalıntıları, oda sıcaklığında iyice uçurulduktan sonra, Total RNA izolasyonu "Qiagen RNA izolasyon kiti" ile, miRNA izolasyonları ise; Qiagen miRNAeasy kiti kullanılarak yapıldıktan sonra elde edilen RNA'ların spektrofotometrede A260/280 ve A260/230 dalga boyundaki ölçümleri yapılarak kalite parametreleri analiz edilmiştir. RIN skoru (RNA Kalite) > 0.7 olan RNA'lar kabul edilmiştir.

#### **3.5.2. Elde Edilen RNA ve DNA'nın Miktar ve Kalite Tayini**

Çalışmamızda izole edilen total RNA örneklerinin miktar ve kalitesi, NanoDrop 2000 Spektrometre (Thermo scientific, Wilmington, DE, USA) cihazı kullanılarak ölçülmüştür ve ekspresyon analiz deneyleri için uygunluğu değerlendirilmiştir (Tablo 7,8).

Elde edilen total RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için, RNA örneklerinin 260 ve 280 nm' deki dalga boylarında yapılan ölçümleri ve bu dalga boylarından elde edilen değerlerin birbirlerine olan oranları kullanılmıştır. RNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranları esas alınmaktadır. 260 nm DNA'nın, 280 nm proteinin, 230 nm de fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boyunu ifade etmektedir. A260/A280 oranının 1,8-2,2 aralığında olması RNA'nın saf olduğunu göstermektedir. DNA için bu değer oranı 1,8 aralığında olmalıdır. 1,8'in altı protein ve reaksiyon kalıntıları olarak değerlendirilirken 1,8'in üstü bir değer RNA kontaminasyonu olduğunu

göstermektedir. Fenol, protein veya benzeri diğer safsızlıkların olması durumunda bu oranlar belirtilen aralığın dışında çıkmaktadır. RNA' nın konsantrasyonunun saptanmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemler DNA' nın spektral analizi ile tamamen aynıdır. Sadece tek zincirli RNA' nın miktarının belirlenmesinde kullanılan formül farklıdır. Total RNA (ng/μl) = 260 nm' deki absorbands x 40 x Dilüsyon Faktörü RNA molekülleri için 1 optik dansitenin 40 μg/mL' ye karşılık geldiği bilinmektedir.

**Tablo-7 Hastaların tümör ve normal dokularından elde edilen RNA'nın ölçüm değerleri**

Hasta No	260 /230	Konsantrasyon	Birim	Hasta No	260 /230	Konsantrasyon	Birim
1 T	1,8	50	ng/μl	51 T	1,76	850	ng/μl
1 N	2	153	ng/μl	51 N	1,73	990	ng/μl
2 T	2,1	117	ng/μl	52 T	1,76	569	ng/μl
2 N	2,2	185	ng/μl	52 N	1,75	754	ng/μl
3 T	2,1	189	ng/μl	53 T	1,76	407	ng/μl
3 N	2,1	304	ng/μl	53 N	1,8	593	ng/μl
4 T	2,01	92	ng/μl	54 T	1,66	556	ng/μl
4 N	1,9	290	ng/μl	54 N	1,7	458	ng/μl
5 T	2	85	ng/μl	55 T	1,6	897	ng/μl
5 N	2	131	ng/μl	55 N	1,81	651	ng/μl
6 T	2	508	ng/μl	56 T	1,71	463	ng/μl
6 N	2	402	ng/μl	56 N	1,76	759	ng/μl
7 T	2	74	ng/μl	57 T	1,76	490	ng/μl
7 N	2	149	ng/μl	57 N	1,95	455	ng/μl
8 T	2	166	ng/μl	58 T	2,23	50	ng/μl
8 N	2	222	ng/μl	58 N	1,98	409	ng/μl
9 T	1,62	460	ng/μl	59 T	1,9	651	ng/μl
9 N	1,76	612	ng/μl	59 N	1,97	388	ng/μl
10 T	1,9	373	ng/μl	60 T	1,92	250	ng/μl
10 N	1,91	766	ng/μl	60 N	2,05	406	ng/μl
11 T	1,75	276	ng/μl	61 T	2,07	395	ng/μl
11 N	1,82	355	ng/μl	61 N	1,95	244	ng/μl
12 T	1,96	624	ng/μl	62 T	2	101	ng/μl
12 N	1,92	344	ng/μl	62 N	1,78	80	ng/μl
13 T	1,85	300	ng/μl	63 T	1,93	473	ng/μl
13 N	1,86	257	ng/μl	63 N	1,96	460	ng/μl

**Tablo-7'nin devamı**

Hasta No	260 /230	Konsantrasyon	Birim	Hasta No	260 /230	Konsantrasyon	Birim
14 T	1,95	738	ng/ $\mu$ l	64 T	2,01	95	ng/ $\mu$ l
14 N	1,73	969	ng/ $\mu$ l	64 N	2,01	270	ng/ $\mu$ l
15 T	1,6	372	ng/ $\mu$ l	65 T	1,84	562	ng/ $\mu$ l
15 N	1,7	558	ng/ $\mu$ l	65 N	2,07	378	ng/ $\mu$ l
16 T	1,8	505	ng/ $\mu$ l	66 T	1,97	471	ng/ $\mu$ l
16 N	1,7	416	ng/ $\mu$ l	66 N	1,86	306	ng/ $\mu$ l
17 T	1,8	352	ng/ $\mu$ l	67 T	1,97	294	ng/ $\mu$ l
17 N	1,7	311	ng/ $\mu$ l	67 N	2,02	343	ng/ $\mu$ l
18 T	1,8	378	ng/ $\mu$ l	68 T	1,88	823	ng/ $\mu$ l
18 N	1,8	316	ng/ $\mu$ l	68 N	2,05	227	ng/ $\mu$ l
19 T	1,4	311	ng/ $\mu$ l	69 T	1,74	410	ng/ $\mu$ l
19 N	1,7	295	ng/ $\mu$ l	69 N	1,62	218	ng/ $\mu$ l
20 T	1,7	649	ng/ $\mu$ l	70 T	1,54	514	ng/ $\mu$ l
20 N	1,8	424	ng/ $\mu$ l	70 N	1,86	267	ng/ $\mu$ l
21 T	1,45	293	ng/ $\mu$ l	71 T	1,54	411	ng/ $\mu$ l
21 N	1,8	165	ng/ $\mu$ l	71 N	1,93	243	ng/ $\mu$ l
22 T	1,8	251	ng/ $\mu$ l	72 T	1,66	516	ng/ $\mu$ l
22 N	1,89	508	ng/ $\mu$ l	72 N	2,05	146	ng/ $\mu$ l
23 T	1,8	824	ng/ $\mu$ l	73 T	1,69	187	ng/ $\mu$ l
23 N	1,92	809	ng/ $\mu$ l	73 N	1,83	436	ng/ $\mu$ l
24 T	1,9	425	ng/ $\mu$ l	74 T	1,7	169	ng/ $\mu$ l
24 N	1,96	560	ng/ $\mu$ l	74 N	1,73	142	ng/ $\mu$ l
25 T	1,41	505	ng/ $\mu$ l	75 T	1,83	809	ng/ $\mu$ l
25 N	1,76	145	ng/ $\mu$ l	75 N	1,63	254	ng/ $\mu$ l
26 T	1,5	608	ng/ $\mu$ l	76 T	1,8	411	ng/ $\mu$ l
26 N	1,83	548	ng/ $\mu$ l	76 N	2,12	221	ng/ $\mu$ l
27 T	1,83	400	ng/ $\mu$ l	77 T	2,18	234	ng/ $\mu$ l
27 N	1,89	367	ng/ $\mu$ l	77 N	1,9	63	ng/ $\mu$ l
28 T	1,86	382	ng/ $\mu$ l	78 T	2,06	107	ng/ $\mu$ l
28 N	1,91	447	ng/ $\mu$ l	78 N	2,04	237	ng/ $\mu$ l
29 T	1,87	568	ng/ $\mu$ l	79 T	1,49	283	ng/ $\mu$ l
29 N	1,97	578	ng/ $\mu$ l	79 N	2,04	255	ng/ $\mu$ l
30 T	1,82	752	ng/ $\mu$ l	80 T	1,83	382	ng/ $\mu$ l
30 N	1,88	255	ng/ $\mu$ l	80 N	1,86	785	ng/ $\mu$ l
31 T	1,94	725	ng/ $\mu$ l	81 T	1,9	815	ng/ $\mu$ l
31 N	1,91	634	ng/ $\mu$ l	81 N	2	696	ng/ $\mu$ l

**Tablo-7'nin devamı**

Hasta No	260 /230	Konsantrasyon	Birim	Hasta No	260 /230	Konsantrasyon	Birim
32 T	1,96	541	ng/ $\mu$ l	82 T	1,94	338	ng/ $\mu$ l
32 N	1,95	734	ng/ $\mu$ l	82 N	2	446	ng/ $\mu$ l
33 T	1,81	766	ng/ $\mu$ l	83 T	1,95	606	ng/ $\mu$ l
33 N	1,84	950	ng/ $\mu$ l	83 N	1,98	410	ng/ $\mu$ l
34 T	1,81	409	ng/ $\mu$ l	84 T	1,92	409	ng/ $\mu$ l
34 N	1,93	413	ng/ $\mu$ l	84 N	1,95	267	ng/ $\mu$ l
35 T	1,91	514	ng/ $\mu$ l	85 T	2	385	ng/ $\mu$ l
35 N	1,85	311	ng/ $\mu$ l	85 N	1,85	370	ng/ $\mu$ l
36 T	1,9	500	ng/ $\mu$ l	86 T	1,93	600	ng/ $\mu$ l
36 N	1,91	420	ng/ $\mu$ l	86 N	1,83	365	ng/ $\mu$ l
37 T	1,71	327	ng/ $\mu$ l	87 T	1,98	265	ng/ $\mu$ l
37 N	1,83	337	ng/ $\mu$ l	87 N	1,83	394	ng/ $\mu$ l
38 T	1,88	369	ng/ $\mu$ l	88 T	1,97	724	ng/ $\mu$ l
38 N	1,9	498	ng/ $\mu$ l	88 N	2	559	ng/ $\mu$ l
39 T	1,82	259	ng/ $\mu$ l	89 T	2	448	ng/ $\mu$ l
39 N	1,96	334	ng/ $\mu$ l	89 N	2	361	ng/ $\mu$ l
40 T	2,02	363	ng/ $\mu$ l	90 T	2,05	475	ng/ $\mu$ l
40 N	2,05	570	ng/ $\mu$ l	90 N	2	580	ng/ $\mu$ l
41 T	1,87	520	ng/ $\mu$ l	91 T	2,07	317	ng/ $\mu$ l
41 N	2,07	462	ng/ $\mu$ l	91 N	2	568	ng/ $\mu$ l
42 T	1,81	571	ng/ $\mu$ l	92 T	1,9	692	ng/ $\mu$ l
42 N	1,83	626	ng/ $\mu$ l	92 N	1,9	275	ng/ $\mu$ l
43 T	1,5	913	ng/ $\mu$ l	93 T	1,7	196	ng/ $\mu$ l
43 N	1,79	663	ng/ $\mu$ l	93 N	1,8	819	ng/ $\mu$ l
44 T	1,85	565	ng/ $\mu$ l	94 T	1,6	96	ng/ $\mu$ l
44 N	1,97	197	ng/ $\mu$ l	94 N	2	552	ng/ $\mu$ l
45 T	1,97	418	ng/ $\mu$ l	95 T	1,8	962	ng/ $\mu$ l
45 N	2,37	52	ng/ $\mu$ l	95 N	1,8	240	ng/ $\mu$ l
46 T	2,03	285	ng/ $\mu$ l	96 T	1,6	560	ng/ $\mu$ l
46 N	1,93	326	ng/ $\mu$ l	96 N	2	344	ng/ $\mu$ l
47 T	1,88	284	ng/ $\mu$ l	97 T	1,5	1039	ng/ $\mu$ l
47 N	1,92	308	ng/ $\mu$ l	97 N	1,9	777	ng/ $\mu$ l
48 T	1,96	245	ng/ $\mu$ l	98 T	1,5	983	ng/ $\mu$ l
48 N	2,02	346	ng/ $\mu$ l	98 N	1,9	761	ng/ $\mu$ l
49 T	1,75	754	ng/ $\mu$ l	99 T	2	630	ng/ $\mu$ l
49 N	1,72	749	ng/ $\mu$ l	99 N	1,8	835	ng/ $\mu$ l
50 T	1,63	753	ng/ $\mu$ l	100 T	1,4	1039	ng/ $\mu$ l
50 N	1,88	396	ng/ $\mu$ l	100 N	1,9	837	ng/ $\mu$ l

**Tablo-8 Hastanın tümör dokularından elde edilen DNA'nın ölçüm değerleri**

Hasta No	260/230	Konsantrasyon	Birim	Hasta No	260/230	Konsantrasyon	Birim
1	1,43	87	ng/µl	51	1,59	205	ng/µl
2	1,68	491	ng/µl	52	1,66	509	ng/µl
3	1,7	574	ng/µl	53	1,69	831	ng/µl
4	1,6	898	ng/µl	54	1,66	62	ng/µl
5	1,4	738	ng/µl	55	1,81	440	ng/µl
6	1,5	304	ng/µl	56	1,37	30	ng/µl
7	1,56	322	ng/µl	57	1,31	120	ng/µl
8	1,49	378	ng/µl	58	1,67	112	ng/µl
9	1,65	388	ng/µl	59	1,56	455	ng/µl
10	1,6	350	ng/µl	60	1,58	811	ng/µl
11	1,53	273	ng/µl	61	1,23	250	ng/µl
12	1,51	34	ng/µl	62	1,73	365	ng/µl
13	1,49	115	ng/µl	63	1,6	214	ng/µl
14	1,58	185	ng/µl	64	1,46	611	ng/µl
15	1,42	209	ng/µl	65	1,69	663	ng/µl
16	1,59	957	ng/µl	66	1,83	603	ng/µl
17	1,45	572	ng/µl	67	1,58	596	ng/µl
18	1,54	811	ng/µl	68	1,44	543	ng/µl
19	1,33	217	ng/µl	69	1,65	943	ng/µl
20	1,61	190	ng/µl	70	1,3	128	ng/µl
21	1,67	823	ng/µl	71	1,6	193	ng/µl
22	1,28	393	ng/µl	72	1,38	196	ng/µl
23	1,45	356	ng/µl	73	1,4	319	ng/µl
24	1,46	146	ng/µl	74	1,21	100	ng/µl
25	1,78	456	ng/µl	75	1,6	492	ng/µl
26	1,59	407	ng/µl	76	1,34	200	ng/µl
27	1,72	626	ng/µl	77	1,36	216	ng/µl
28	1,61	100	ng/µl	78	1,48	33,59	ng/µl
29	1,34	302	ng/µl	79	1,62	462	ng/µl
30	1,4	332	ng/µl	80	1,78	266	ng/µl
31	1,47	526	ng/µl	81	1,48	551	ng/µl
32	1,35	328	ng/µl	82	1,74	123	ng/µl
33	1,54	418	ng/µl	83	1,8	310	ng/µl

**Tablo-8'in devamı**

Hasta No	260/230	Konsantrasyon	Birim	Hasta No	260/230	Konsantrasyon	Birim
34	1,68	515	ng/ $\mu$ l	84	1,59	676	ng/ $\mu$ l
35	1,48	753	ng/ $\mu$ l	85	1,51	468	ng/ $\mu$ l
36	1,64	770	ng/ $\mu$ l	86	1,78	1000	ng/ $\mu$ l
37	1,53	900	ng/ $\mu$ l	87	1,35	96	ng/ $\mu$ l
38	1,48	169	ng/ $\mu$ l	88	1,24	355	ng/ $\mu$ l
39	1,75	990	ng/ $\mu$ l	89	1,57	546	ng/ $\mu$ l
40	1,61	338	ng/ $\mu$ l	90	1,61	121	ng/ $\mu$ l
41	1,66	88	ng/ $\mu$ l	91	1,42	381	ng/ $\mu$ l
42	1,67	986	ng/ $\mu$ l	92	1,45	65	ng/ $\mu$ l
43	1,4	544	ng/ $\mu$ l	93	1,15	20	ng/ $\mu$ l
44	1,58	215	ng/ $\mu$ l	94	1,37	102	ng/ $\mu$ l
45	1,67	964	ng/ $\mu$ l	95	1,4	129	ng/ $\mu$ l
46	1,7	423	ng/ $\mu$ l	96	1,46	172	ng/ $\mu$ l
47	1,46	380	ng/ $\mu$ l	97	1,8	956	ng/ $\mu$ l
48	1,5	1288	ng/ $\mu$ l	98	1,2	300	ng/ $\mu$ l
49	1,67	763	ng/ $\mu$ l	99	1,42	485	ng/ $\mu$ l
50	1,63	508	ng/ $\mu$ l	100	1,51	422	ng/ $\mu$ l

### **3.5.3. RNA ve miRNA'lardan cDNA Sentezi**

Konsantrasyon ve kalite tayinleri yapılan total RNA' lardan Taqman High Capacity RNA to cDNA Master Mix (Applied Biosystems, USA) kiti kullanılarak, değerlendirilecek hedef genlere özgü komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında, izole edilen total RNA'lardan, Taqman miRNA Reverse Transkripsiyon kiti ile ilgili genleri hedef alan miRNA'ların ekspresyon analiz deneylerinde kullanılacak olan cDNA'lar da elde edilmiştir. Her iki cDNA sentez reaksiyonunda, PCR döngüsü esnasında oluşan spesifik PCR ürününü belirlemek ve eş zamanlı değerlendirmek amacıyla florasan ışığa yapabilen, Taqman prob işaretli primerler kullanılmıştır. Elde edilen total RNA örneklerinden cDNA eldesi için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) karışımları ve programları tablolarda verilmiştir (Tablo 9-12).

**Tablo-9 cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon bileşenleri**

cDNA	Miktar (µl)
RNase-free H <sub>2</sub> O	4,2
10 X RT Buffer	2
10X RT Random Primers	2
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
MultiScribe Reverse Transcriptase	1
Ara Stok mRNA	10

**Tablo-10 Reverse transkripsiyon PCR programı**

Sıcaklık (°C)	25°C	42°C	85°C	4°C
Zaman (dk)	5 dk	30 dk	5 dk	∞

**Tablo-11 miRNA'lara özgü cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon bileşenleri**

CDNA Protokolü	Miktar (µl)
100mM dNTP	0,15
Reverse Transkriptaz Enzimi	1
10X Transkripsiyon Buffer	1,5
RNase inhibitör, 20 U/µL	0,2
Reverse Primer 5X (Herbir miRNA için ayrı)	1,00
RNase-free H <sub>2</sub> O	6,15
RNA Örneği	5
Total	15

**Tablo-12 miRNA'lar için reverse transkripsiyon PCR programı**

Sıcaklık (°C)	25°C	42°C	85°C	4°C
Zaman (dk)	30 dk	30 dk	5 dk	∞

Çalışılacak her bir örnek için 0,2 ml' lik PCR tüpü içerisinde Tablo 9' de verilen malzemelerden buz üzerinde 20 µl' lik bir reaksiyon karışımı oluşturulup, elde edilen miks pipetaj yapılarak karıştırılmış ve santrifüje alınarak spin atılmıştır. PCR



tüpü içerisindeki miks, Taqman High Capacity RNA to cDNA Master Mix için optimize edilmiş PCR programına alınarak reaksiyon hacmi 20 µl'ye ayarlanmıştır. Reverse Transkripsiyon reaksiyonu sonrası elde edilen cDNA' lar, bir sonraki aşamaya kadar -20°C' de saklanmıştır.

Çalışılacak her bir örnek için 0,2 ml' lik PCR tüpü içerisinde Tablo 11' de verilen malzemelerden buz üzerinde 15 µl'lik bir reaksiyon karışımı oluşturulup, elde edilen master miks pipetaj yapılarak karıştırılmış ve santrifüje alınarak spin atılmıştır. PCR tüpü içerisindeki master miks içerisine, her miRNA için spesifik özellikte olan 1 µl 5X ReverseTranskripsiyon primer ilave edilip iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan master miks ve primer karışımına, 1-10 ng olacak şekilde 5 µl RNA örneği eklenip toplamda 15 µl'lik reaksiyon elde edilmiştir. Elde edilen reaksiyon karışımı, Taqman miRNA Reverse Transkripsiyon Kiti için optimize edilmiş PCR programına alınarak reaksiyon hacmi 15 µl'ye ayarlanmıştır. Reverse Transkripsiyon reaksiyonu sonrası elde edilen cDNA' lar, bir sonraki aşamaya kadar -20°C' de saklanmıştır.

#### **3.5.4. RT-qPCR ile *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5* Genlerinin ve Bu Genleri Hedef Alan *mir22*, *mir138* ve *mir223* 'ün Ekspresyon Analizleri**

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan ve kesin sonuçlar veren nicel PCR metodlarından biri olan RT-qPCR, son ürün analizlerinden farklı olarak reaksiyonun gerçekleştiği zamanla eş zamanda reaksiyonu görüntülemektedir. Bu sistemlerdeki PCR reaksiyonunda, ardı ardına gerçekleşen döngülerde üretilen PCR ürününün miktarı, orantılı biçimde yayılan bir florasan sinyali ile ilişkilendirilmiştir. Her bir reaksiyon döngüsünde, üretilen PCR ürününün miktarı ile orantılı olarak bu sinyal artar. Her bir döngüde florasan sinyal miktarı kayıt edilir ve logaritmik faz boyunca PCR reaksiyonu görüntülenir. Florasan sinyalinin ilk önemli artışı hedef RNA'nın başlangıçtaki miktarı ile ilişkilidir.

Bir PCR reaksiyonunda çoğaltılmak istenen amplikonun florasan yöntemlerle tespitini özelleştirmek için PCR primer çiftlerinin içinde bulunan, florasan işaretleyiciler taşıyan, sekansa özel prob lar kullanılır. Sekans özel prob tabanlı qRT-PCR yöntemlerinden biri olan, degradasyon probu olarak bilinen Taqman prob yönteminde, Taq DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi, 5' ucundaki reporter (haberci) florasan boya ile 3' ucundaki quencher (söndürücü) boya arasındaki probu degrades eder. Bu durum, amplifikasyon ilerledikçe florasan sinyalinin artmasına neden

olur. Çalışma kapsamında kullanılan RT-qPCR reaksiyon protokolleri alttaki tablolarda verilmiştir (Tablo 13-15).

**Tablo-13 Genler için Real Time PCR reaksiyonu protokolü**

Protokol RT-PCR	Miktar (µl)
Taqman Universal PCR Master Mix	10
Taqman RNA Assay	1
dH2O	5
cDNA	4

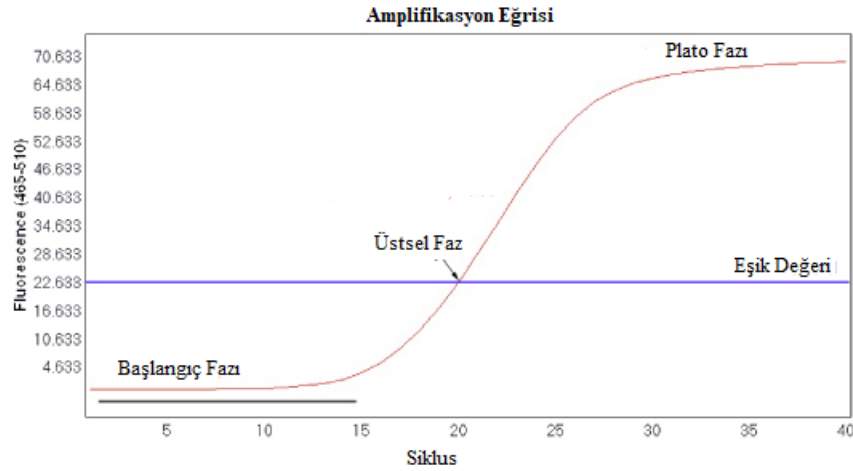
**Tablo-14 miRNA'lar için Real Time PCR reaksiyonu protokolü**

miRNA Protokol RT-PCR	Miktar (µl)
Taqman Assay 20X	1,00
Taqman Universal Master Mix 2X	10,00
dH2O	7,00
cDNA	2,00

**Tablo-15 mRNA ekspresyon analizi için kullanılan RT-qPCR programı**

	Başlangıç Aşaması		Amplifikasyon Basamağı (40 Siklus)	
Sıcaklık (°C)	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Zaman (dk)	2 dk	10 dk	15 sn	1 dk

Eş zamanlı PCR uygulanırken floresan veri (Rn biriminde), döngü sayısına karşı sinyal miktarını bulmak için bir grafikte toplanmaktadır. qRT-PCR'da üç farklı aşama görmek mümkündür. Bunlar; arka plandaki sinyalle ilgili hafif dalgalanmaların olduğu ilk 'lag' aşaması, artan paralel verilerin bulunduğu ikinci logaritmik aşama (üstel faz) ve verilerin platoya ulaştığı üçüncü aşama olarak sıralanmaktadır (Şekil 25).



**Şekil-25 RT-qPCR analizi tanımlayıcı görüntüsü**

Çalışmamızda kullanılmak üzere belirlediğimiz genler ve miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar, Ct metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Hedef genler ve miRNA ekspresyonlarının başlangıç kopya sayısı ve Ct değerleri, Light Cycler 480 II cihazının veri tabanından yararlanılarak elde edilmiştir. Eşik değer (Threshold) olarak tanımlanan Ct değeri, floresan ışımada ( $\Delta R_n$ ) artışın başladığı ilk siklusu ifade eder.  $R_n(+)$ , yüklenen örneğin reaksiyona giren tüm komponentlerin floresan emisyonu;  $R_n(-)$  ise negatif kontrolün ve reaksiyonu gerçekleşmeyen örneklerin floresan emisyonu olarak tanımlanmaktadır.  $\Delta R_n$ ;  $R_n(+)$  ve  $R_n(-)$  arasındaki fark olup, Ct değerinin hesaplanmasında kullanılan temel göstergedir. Çalışmada, ham verilerden elde edilen ortalama Ct değerleri, hedef genler için endojen kontrol olan housekeeping (referans) gen *GAPDH* ve miRNA'lar için endojen kontrol olan housekeeping gen *RNU48* ile normalize edilmiştir.

### **3.5.5. RT-qPCR Analizi Sonucu Hedef Genlerin ve İlgili miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi**

Targetscan 5.1 software'de biyoinformatiksel analiz sonrası tespit edilen en yüksek düzeyde ilişkili 3 gen ve *GAPDH* genlerinin mRNA ifade düzeyleri TaqMan™ probolar ile "StepOnePlus Real-Time PCR" cihazında kantitatif olarak analiz edilmiştir. Hasalıkla ilişkili 3 miRNA'nın ifade düzeyleri spesifik olarak dizayn edilen Taqman probolar ile "StepOnePlus Real-Time PCR" cihazında kantitatif olarak analiz edilmiştir. "RNU48" internal kontrol olarak kullanılmıştır

Aday gen ve miRNA'ların tespitinde kullanılan tüm metodolojik yollar elde edilen ekspresyon profilleri sonuçları için yapılmıştır. Böylelikle silico analizler ile elde edilen verinin doğru karşılaştırılmıştır.

### **3.5.6. Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden DNA Elde Edilmesi**

Hasta doku materyallerinden DNA izolasyonu için "Qiagen DNA izolasyon kiti" protokolü takip edilmiştir. Elde edilen DNA'ların spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülerek  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  değerleri ve 260\280 nm ölçümlerinin değerlerine göre belirlenmiştir.

### **3.5.7. Total DNA'dan PCR ile VHL Geninin Eldesi**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); 1,75 mM  $\text{MgCl}_2$ , her bir dNTP'den 100 mM ve her bir primerden 0,5  $\mu\text{M}$  içeren tampon çözeltiliye 5 ünite Taq Polimeraz ve 50-100 ng genomik DNA eklenerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen amplifikasyon ürünleri %2 'lik agaroz jel elektrofezi ile kontrol edilmiştir.

### **3.5.8. Hetero Dublex Analizi (HDA)**

Hetero-Duplex Analysis (HDA), mutasyonların hızlı taranması için kolay ve uygun maliyetli bir tekniktir. Hedef genlerden DNA eldesi, PCR basamağı ve ardından bir denatürasyon adımı ile amplifiye edilir. Renatürasyondan sonra mutant DNA ve normal DNA bir araya gelerek heterodupleks yapısını oluşturur. Bu heterodupleks DNA, karşılık gelen homodupleks DNA'ya kıyasla farklı bir elektroforetik potansiyele sahiptir. Ayrımın yapılması için DNA'ların yürütüleceği jel hazırlanır. Jel içeriğinde;  $\text{dH}_2\text{O}$  17.3 ml, MDE 16 ml, gliserol 2.8 ml, 10% TBE 2,25 ml, 10% APS 200  $\mu\text{l}$  ve TEMED 20  $\mu\text{l}$  miktarında bulunmaktadır. Dikey jel elektroforez sisteminde yüklenen heterodupleks yapıdaki DNA kontrol grubu ile jel sisteminde yürütülmeye başlanır. Bantlaşmaların tespit edilmesi için gümüş boyama ile bantlar görünür hale getirilir. Gümüş boyama basamakları;

1. Jel 10%'luk asetik asit içersine alınır. 35 dakika çalkalanır ve  $\text{dH}_2\text{O}$  ile yıkanır.
2. 30 dakika boyunca gümüş nitrat solüsyonu (3 gr gümüş nitrat, 2 litre  $\text{dH}_2\text{O}$  ve 4 ml formaldehit) içerisinde çalkalanır. Sonrasında  $\text{dH}_2\text{O}$  ile yıkanır.
3.  $\text{NaCO}_3$  ile bantlaşma görülene kadar çalkalanır.

Normal DNA'ya göre yürme farklılığı veya farklı bantlaşma gösterip göstermediği analiz edilir. Normale göre farklı bir durum tespit edilir ise o hastanın o gende ki DNA

dizisinde bir değişim içerdiği saptanır ve değişimin türünün tespiti için sekans analizi basamağına geçilir.

100 adet BHTRK hastasının DNA örneği normal DNAlar ile karşılaştırılmalı olarak HDA analizi yapılmıştır. Farklılık saptanan hastalar içerdikleri farklılıkların türlerine göre ayırımı yapılarak gruplanılmıştır.

### **3.5.9. Sekans Reaksiyonu**

*VHL* geni mutasyon analizi için her bir hastaya ait elde edilen kaliteli PCR ürünlerinden PCR Clean-Up System ile pürüfikasyon işlemi sonrasında, F ve R primerler ve DTCS quick start Kiti ile her bir hasta için F ve R olarak 2 okuma olacak şekilde ayrı ayrı sekans reaksiyonları gerçekleştirildi. Elde edilen ürünler alkol yıkamalarının ardından Sample Loading Solution ve DNA Size Standard Kit ile muamele edilerek Otomatik Sekans Analizi Cihazı (BECKMAN COULTER) ile sekans analizine tabi tutulmuştur. İncelenen örneğe ait elde edilen nükleotid dizisi, *VHL* geninin ilgili ekzonunun Ensembl’da (<http://www.ensembl.org/index.html>) yer alan normal dizisi ile karşılaştırılarak mutasyon varlığı araştırılmıştır.

### **3.5.10. Western Blot Analizi**

Western Blot analizi ile protein düzeyinde analizler gerçekleştirilmiştir. Parafin dokudan protein izolasyon protokolleri ticari kitler ve manuel yöntemlerde oldukça farklılıklar göstermektedir. Araştırmacılar tüm metodlarda negatiflikler ile karşılaşabilmektedir. Tez kapsamında izlenen izolasyon protokolü birden fazla metodun bir araya getirilerek oluşturulması ile elde edilmiştir.

Parafin dokudan protein izolasyon aşamaları sırasıyla;

1. Deparafinizasyon – Örnekler parçalanarak bir kez ksilol ile yıkama yapıldı. Sonrasında 2 kez %100 etil alkol ile yıkama işlemine tabi tutuldu (14000 rpm 5 dakika)
2. 37 derecede etüv içerisinde alkolden uzaklaştırılması yapıldı.
3. 45 dakika -156 derecede inkübe edilmiştir.
4. Dokular lam üzerine alınarak stick yardımı ile ezilip toz haline getirilir.
5. Lysis Buffer (cell signaling marka 10X buffer)
  - a. 1X cell lysis buffer
  - b. Distile Su
  - c. SDS %2’lik

- d. NP40
  - e. EDTA Free proteaz inhibitör kokteyl tablet
6. 1000 µl lysis buffer örneklere dağıtılır
  7. 100 derece ısıtıcı blokta 20 dakika inkübasyon.
  8. 60 derece ısıtıcı blokta 120 dakika inkübasyon.
  9. 14000 rpm 15 dakika santifüj edildi.
  10. Üst kısımdaki beyaz bulutsu kısım steril ependorflara alınarak -80 derecede saklandı.

Parafin dokudan elde edilen protein konsantrasyonları Qubit cihazında belirlenerek her bir örnekten 20 µg/ml protein “SDS-sample buffer” ile 95°C 5 dk. bekletilerek denatüre edilir. Denatüre protein örnekleri her kuyuya 20 µL olacak şekilde %4-20’lik poliakrilamid jele yüklenip 110V 2 saat boyunca Biorad mini Protean cihazında elektroforezi yapılmıştır. Daha sonra protein bantları PVDF membran üzerine 250mA’de 2 saat buzda transfer yapılarak gerçekleştirilir. Transfer işleminden sonra 1X TBS-Tween 20 solüsyonu ile hazırlanmış %5 yağsız süt ile en az 1 saat boyunca oda sıcaklığında bloklanan membran, %2 BSA ile uygun dilüsyonda seyreltilen uygun primer antikorlar ile +4°C’de bir gece inkübasyona bırakılır. Sonra bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması ve spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi için membran TBS-T solüsyonu ile 3 kez 10 dk yıkandıktan sonra primer antikorlara uygun sekonder antikorlar ile 1-2 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. Son olarak membran 1XTBS-T ile 3 kez 10 dk yıkanarak Pierce kiti ile kemilüminesans görüntüleme yapılmıştır. Kontrol olarak β-Aktin kullanılmıştır.

### **3.5.11. İstatistiksel Analizler**

100 hastanın normal ve tümör dokularından gerçekleştirilen gen ifade analizlerinin sonuçları tanımlayıcı istatistiksel analizler (varyans, medyan vb.) ve alınan kantitatif sonuçlara göre ileri istatistiksel (parametrik T-testi, non-parametrik Wilcoxon-Mann-Whitney testi, Kaplan-Meier testi vb.) değerlendirme, IBM-SSPS Statistics Data Editor.v25 paket veri programı ile yapılmıştır.

### **3.5.12. Elde Edilen Bulguların Klinik İle İlişkisinin Belirlenmesi**

Global veri bankalarındaki BHTRHK hasta verilerinin biyoinformatik analizler sonucu belirlenen genlerin ve miRNA’ların 100 hastanın tümör-normal dokusundan elde edilecek gen ve miRNA ifade düzeyi, *VHL* sekans analizi ve western

blot sonuçları ile karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar hastaların klinik verileri ile karşılaştırılmışve aralarındaki ilişki tespit edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. In-silico biyoinformatiksel hesaplamalar

BHTRK gelişimi ile ilgili biyo belirteç potansiyeli olan genler ve bu genleri hedef alan miRNA'lar analiz edildi.

Yapılan çalışmada cBioportal veri bankasında bulunan 1813 BHTRK hastasına ait veriler biyoinformatiksel hesaplamalar kullanılarak analiz edilmiştir (Tablo 16).

**Tablo-16 cBioPortal veri bankasındaki BHTRK hasta verileri.**

Çalışılan Hasta Grubu	Veri İçeriği	Veri Bankası	Tarih	Yayınlanan Dergi	Hasta Sayısı
BHTRK	Metastatik 35 Hastanın Tüm Ekzom Dizilemesi / Tümör – Normal	DFCI	2019	Science	35
BHTRHK	10 Hastanın Tüm Ekzom Analizi Sonrası Hedefleri Belirlenen 88 Hastanın Dizilemesi / Tümör – Normal	BGI	2012	Nat Genet	98
BHTRHK	10 Hastanın Tüm Ekzom Analizi Sonrası Hedefleri Belirlenen 68 Hastanın Dizilemesi / Tümör – Normal	IRC	2014	Nat Genet	78
BHTRHK	TCGA Ham Datası	TCGA	-	Fire Hose legacy	538
BHTRHK	TCGA Ham Datası	TCGA	2013	Nature	446
BHTRHK	TCGA Ham Datası	TCGA	-	Pan Cancer Atlas	512
BHTRHK	106 Hastanın Tüm Exom Analizi / Tümör – Normal	Utokyo	2013	Nat Genet	106

1813 hastanın klinik özellikleri ve yaş dağılımları değerlendirildiğinde ortalamasının 60 olduğu görülmektedir (Tablo17).

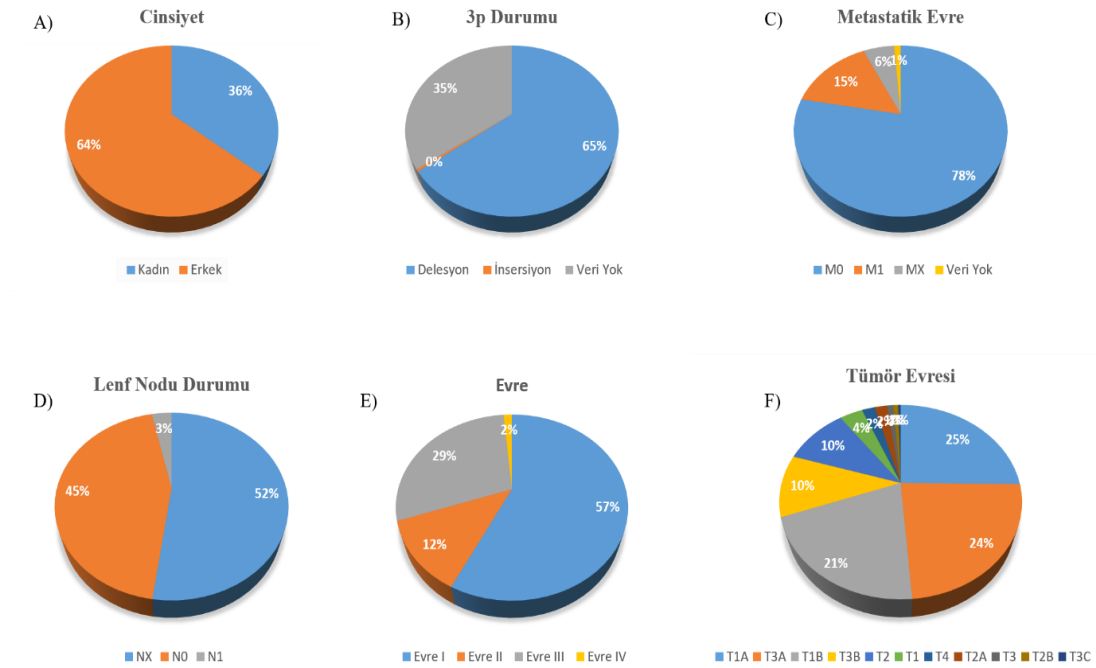
**Tablo-17 cBioportal 1813 hastanın yaş değerlerinin tanımlayıcı istatistiği**

Ortalama		60,4648
95% Güven Aralığında	Alt Değer	59,419
	Üst Değer	61,5107
Median		60
Standart Hata		0,53235
Varyans		145,099
Standart Sapma		12,04569
Minimum Değer		29
Maksimum Değer		90



Hastalığın güncel literatürdeki klinik verileri ile cbioportal hasta verilerinin, 60 yaş ve çevresindeki dağılımı ile uyum gösterdiği tespit edildi.

Hastaların cinsiyete bağlı dağılımları incelendiğinde literatürde erkek hastaların kadınlara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Yapılan analiz sonuçları ışığında erkek hasta sayısı % 63,7 iken, kadın hasta sayısı % 36,3 olarak hesaplanmıştır ( Şekil 26).



**Şekil 26 cBioportal Hastalarının klinik verilerinin pasta dağılım grafikleri**  
**A: Cinsiyet, B: 3p Durumu, C: Metastatik Evre, D: Lenf Nodu Durumu, E:Evre, F:Tümör Evresi**

BHTRK hastalığında 3p kromozom kaybı oldukça sık rastlanan kromozom anomalisi olarak görülmektedir. 1813 hastada yapılan analizde hastaların %64,3'ünde 3p kromozom kaybı belirlendi (Şekil 26).

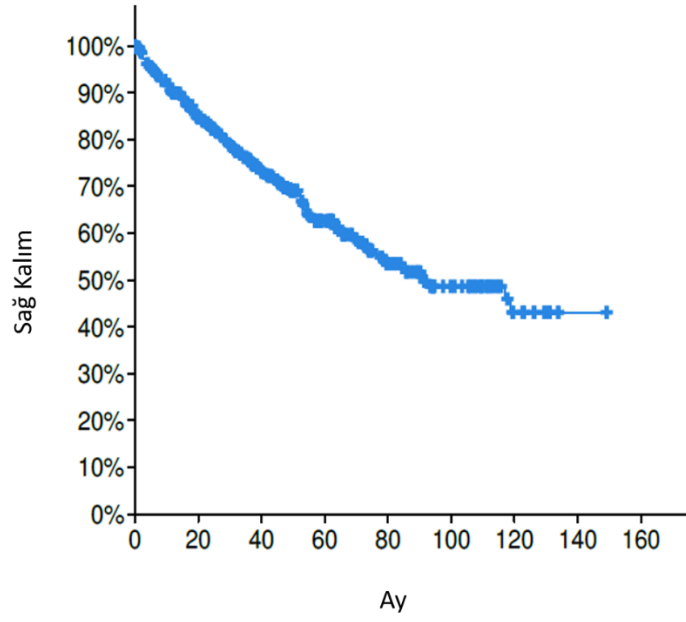
BHTRK'da hasta tedavi modelinin geliştirilmesi ve kötü prognozun öngörülmesi için TNM sınıflandırılması ciddi bir önem arz etmektedir. Hasta verilerinin TNM sınıflandırmaları değerlendirildiğinde M (Metastaz) sınıflandırmasındaki dağılımı % 78,7 ile M0 (Uzak Metastazı Yok), % 15,2 M1 (Uzak Metastazı Var), % 5,7 ise MX (Uzak Metastazı Değerlendirilemeyen Grup) olarak görüldü (Şekil 26).

TNM sınıflandırmasındaki diğer bir parametre olan T (Tümör Evresi) açısından hastalar değerlendirildiğinde %25,2 T1A (Tümör  $\leq$  4 cm), %23,6 T3A (Makroskopik olarak ana renal ven veya mürsküler tabakalı dallarına yayılım veya perirenal ve/veya renal sinüs yağ dokuya invazyon mevcut. Ancak, Gerota fasyasını aşmamaktadır.), %20,7 T1B (Tümör 4-7 cm arasındadır.), %10,4 T3B (Tümör makroskopik olarak diafragma altında vena kavaya invaze olmuştur), %10,2 T2 (Tümör böbreğe sınırlı ve 7 cm'den küçüktür), %3,7 T1 (Tümör böbreğe sınırlı ve 7 cm'e eşit yada küçüktür.), %2,1 T4 (Tümör Gerota fasyasını aşmaktadır ve doğrudan invazyon göstermektedir), %2 T2A (Tümör böbreğe sınırlı ve 7 -10 cm arasında büyüklüğe sahiptir), %1 T3 (Tümör ana venlere veya perinefrik dokulara yayılım göstermektedir. Ancak, aynı taraftaki adrenal beze yayılım göstermemektedir ve Gerota fasyasını aşmamaktadır), %0,8 T2B (Tümör böbreğe sınırlı ve 10 cm'den küçüktür.) ve son olarak %0,4 T3C (Tümör makroskopik olarak diafragma üstünde vena kavaya invaze olmuştur.) şeklinde dağılım göstermektedir (Şekil 26).

TNM sınıflandırmasındaki üçüncü ve son parametre olan N (Lenf Nodu Durumları) açısından veriler incelendiğinde %52,1 NX (Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemiyor), %44,5 N0 (Bölgesel lenf düğümü metastazı yok) ve %3,3 N1 (Bölgesel lenf düğümü metastazı) dağılımı görülmektedir (Şekil 26).

TNM sınıflandırmalarına göre hastaların aldıkları skorlar doğrultusunda oluşan hastalığın evreleri değerlendirildiğinde %48,6 Evre 1 (T1-N0-M0), %24,6 Evre 3 (T1, T2-N1-M0, T3-N0, N1-M0), %16,2 Evre 4 (T4-Tüm N'ler-M0, Tüm T'ler-Tüm N'ler-M1), %10,5 Evre 2 (T2-N0-M0) şeklinde dağılım gösterdiği görüldü (Şekil 26).

Analiz edilen grubun sağ kalım süreleri incelendiğinde 140 aylık takip sürecinde sadece %35'inin BHTRHK nedenli yaşamını kaybettiği hesaplanmıştır (Şekil 27). Genel sağ kalma modeli ele alındığında 150 aylık takip süresinde hastaların %60'ı BHTRHK kaynaklı hayatını kaybettiği belirlendi (Şekil 27).



**Şekil-27 Cbioportal Veri bankasındaki hastaların genel sağ kalım grafiği**

BHTRHK'nın moleküler alt yapısı incelendiğinde 1813 vakanın cBioportal veri bankasındaki değerleri analiz edildiğinde hastalıktan sorumlu çok sayıda mutasyon olduğu görülmektedir. BHTRHK'dan sorumlu mutasyonları genlere göre frekans analizi yaptığımızda %41,3 ile en fazla mutasyonu *VHL* geni içermektedir (Tablo 18).

**Tablo-18 BHTRHK'dan sorumlu mutasyonların listesi**

Gen	Frekans	Kanser Geni	Gen	Frekans	Kanser Geni	Gen	Frekans	Kanser Geni	Gen	Frekans	Kanser Geni
<i>VHL</i>	41.3%	Hayır	<i>MACF1</i>	3.2%	Hayır	<i>KMT2D</i>	2.5%	Evet	<i>APC</i>	1.5%	Evet
<i>PBRMI</i>	38.1%	Evet	<i>LRP1B</i>	3.2%	Evet	<i>STAG2</i>	2.2%	Evet	<i>ZFHX3</i>	1.5%	Evet
<i>TTN</i>	17.2%	Hayır	<i>PKHD1LI</i>	3.2%	Hayır	<i>ATRX</i>	2.0%	Evet	<i>CACNA1D</i>	1.5%	Evet
<i>SETD2</i>	12.2%	Evet	<i>MUC17</i>	3.2%	Hayır	<i>BRCA2</i>	2.0%	Evet	<i>CUX1</i>	1.5%	Evet
<i>BAP1</i>	9.5%	Evet	<i>DNAH2</i>	3.2%	Hayır	<i>EP300</i>	2.0%	Evet	<i>DAXX</i>	1.5%	Evet
<i>MTOR</i>	7.7%	Evet	<i>ABCA13</i>	3.2%	Hayır	<i>NF1</i>	2.0%	Evet	<i>FLT1</i>	1.5%	Evet
<i>MUC16</i>	7.5%	Hayır	<i>ANK3</i>	3.0%	Hayır	<i>PRKDC</i>	2.0%	Evet	<i>GRID2</i>	1.5%	Hayır
<i>KDM5C</i>	5.0%	Evet	<i>PTEN</i>	3.0%	Evet	<i>ROCK1</i>	2.0%	Hayır	<i>HTT</i>	1.5%	Hayır
<i>DNAH9</i>	4.5%	Hayır	<i>SYNE1</i>	3.0%	Hayır	<i>MGA</i>	2.0%	Evet	<i>HIF1A</i>	1.5%	Hayır
<i>HMCN1</i>	4.2%	Hayır	<i>ADGRV1</i>	3.0%	Hayır	<i>FAT4</i>	2.0%	Evet	<i>HSP90AA1</i>	1.5%	Evet
<i>CSMD3</i>	4.2%	Hayır	<i>ERBB4</i>	2.7%	Evet	<i>CHD4</i>	1.7%	Evet	<i>IGSF1</i>	1.5%	Hayır
<i>FBN2</i>	4.0%	Hayır	<i>LRP1</i>	2.7%	Hayır	<i>CLTC</i>	1.7%	Evet	<i>LTBP2</i>	1.5%	Hayır
<i>LRP2</i>	3.7%	Hayır	<i>ROS1</i>	2.7%	Evet	<i>FAT1</i>	1.7%	Evet	<i>MAX</i>	1.5%	Evet
<i>PCLO</i>	3.7%	Evet	<i>RYR3</i>	2.7%	Hayır	<i>ARHGAP35</i>	1.7%	Evet	<i>MUC4</i>	1.5%	Hayır
<i>KMT2C</i>	3.7%	Evet	<i>SMARCA4</i>	2.7%	Evet	<i>AFDN</i>	1.7%	Evet	<i>NF2</i>	1.5%	Evet
<i>XIRP2</i>	3.7%	Hayır	<i>TP53</i>	2.7%	Evet	<i>NOTCH2</i>	1.7%	Evet	<i>PCDH7</i>	1.5%	Hayır
<i>DST</i>	3.5%	Hayır	<i>AKAP9</i>	2.7%	Hayır	<i>RELN</i>	1.7%	Evet	<i>PEG3</i>	1.5%	Hayır
<i>FLG</i>	3.5%	Hayır	<i>PRPF8</i>	2.7%	Hayır	<i>PTPN13</i>	1.7%	Evet	<i>PIK3CA</i>	1.5%	Evet
<i>ARID1A</i>	3.5%	Evet	<i>CSMD1</i>	2.7%	Hayır	<i>RANBP2</i>	1.7%	Evet	<i>PLEC</i>	1.5%	Hayır
<i>SPEN</i>	3.5%	Evet	<i>PCDH15</i>	2.7%	Hayır	<i>POLQ</i>	1.7%	Evet	<i>POLE</i>	1.5%	Evet
<i>AHNAK2</i>	3.5%	Hayır	<i>COL6A6</i>	2.7%	Hayır	<i>PTPRT</i>	1.7%	Evet	<i>KAT5</i>	0.5%	Hayır
<i>ATM</i>	3.2%	Evet	<i>CENPF</i>	2.5%	Hayır	<i>CDK12</i>	1.7%	Evet	<i>FRS2</i>	0.5%	Evet
<i>NEB</i>	3.2%	Hayır	<i>COL6A3</i>	2.5%	Hayır	<i>ARID1B</i>	1.7%	Evet	<i>U2AF2</i>	0.5%	Evet
<i>USH2A</i>	3.2%	Hayır	<i>PTPRZ1</i>	2.5%	Hayır	<i>LRRK2</i>	1.7%	Evet	<i>CHN1</i>	0.2%	Evet

*VHL* geni BHTRHK için tümör supresör olarak tanımlanmaktadır. Bu yüzden çalışma kapsamında belirlenen aday biyobelirteçler *VHL* geni ile ilişkili gen ve miRNA'lar olarak hedef alındı. Veri bankasından elde ettiğimiz hasta grubunun mutasyon taraması sonrasında CNV (genlerin mRNA seviyesinde kopya sayısına göre varyasyon tayini ) analizi uygulandı ve BHTRHK hastalarının 14834 adet geninin mRNA düzeyleri analiz edildi (Tablo 19).

**Tablo-19 Hastaların CNV sonuçları**

Gen	Lokasyon	Etki	Frekans	Kanser Geni	Gen	Lokasyon	Etki	Frekans	Kanser Geni
<i>VHL</i>	3p25.3	DEL	2.6%	Evet	PFN3	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır
BNIP1	5q35.1	AMP	7.5%	Hayır	LOC1019093	5q35.1	AMP	7.5%	Hayır
NKX2-5	5q35.1	AMP	7.5%	Hayır	CANX	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
DBN1	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	CLTB	5q35.2	AMP	7.3%	Hayır
DUSP1	5q35.1	AMP	7.5%	Hayır	DRD1	5q35.2	AMP	7.3%	Hayır
F12	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	FLT4	5q35.3	AMP	7.3%	Evet
FGFR4	5q35.2	AMP	7.5%	Evet	GRM6	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
GRK6	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	HNRNPAB	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
HK3	5q35.2	AMP	7.5%	Hayır	HNRNPH1	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
SLC34A1	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	HRH2	5q35.2	AMP	7.3%	Hayır
STC2	5q35.2	AMP	7.5%	Hayır	LTC4S	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
PDLIM7	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	MGAT1	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
RGS14	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	MSX2	5q35.2	AMP	7.3%	Hayır
LMAN2	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	MAPK9	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
B4GALT7	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	PROP1	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
ZNF346	5q35.2	AMP	7.5%	Hayır	SNCB	5q35.2	AMP	7.3%	Hayır
PRELID1	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	ZNF354A	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
DDX41	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	ATP6V0E1	5q35.1	AMP	7.3%	Hayır
UIMC1	5q35.2	AMP	7.5%	Hayır	ADAMTS2	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
RAB24	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	MAML1	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
NEURL1B	5q35.1	AMP	7.5%	Hayır	GFPT2	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
FAM193B	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	RACK1	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
TMED9	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	CPLX2	5q35.2	AMP	7.3%	Hayır
ERGIC1	5q35.1	AMP	7.5%	Hayır	BTNL3	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
NSD1	5q35.3	AMP	7.5%	Evet	MGAT4B	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır
BTNL8	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	RNF44	5q35.2	AMP	7.3%	Hayır
DOK3	5q35.3	AMP	7.5%	Hayır	TBC1D9B	5q35.3	AMP	7.3%	Hayır

AMP= Amplifikasyon

DEL= Delesyon

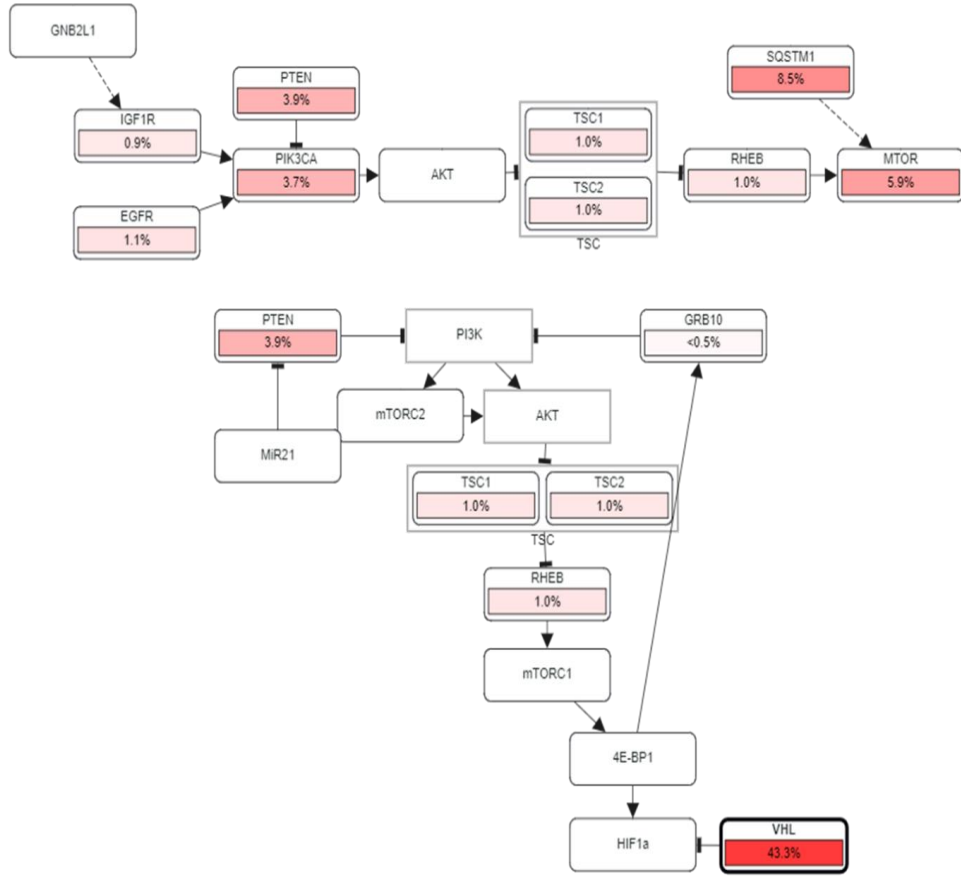
Veriler ışığında *VHL* geninde delesyona dayalı ifade azalması genel literatür bulguları ile paralellik göstermektedir.

Çalışma kapsamında araştırılan diğer bi parametre ise BHTRHK hastalarındaki füzyon gen durumlarının analiz edilmesi oldu. Bu bağlamda yapılan analizde 1813 hastada 487 füzyon geni incelenmiştir. *VHL* geni listede %0,7 frekansla 3. sırada yer aldığı görüldü (Tablo 20).

**Tablo-20 Hastaların füzyon analiz sonuçları**

Gen	Füzyon	Frekans	Kanser Geni	Gen	Füzyon	Frekans	Kanser Geni
TFE3	9	1.7%	Evet	A2M	1	0.2%	Hayır
SFPQ	6	1.2%	Evet	PLIN2	1	0.2%	Hayır
TERT	3	0.7%	Evet	ANPEP	1	0.2%	Hayır
<i>VHL</i>	3	0.7%	Evet	APC	1	0.2%	Evet
ST7	3	0.7%	Hayır	AIRE	1	0.2%	Hayır
NLRP1	3	0.7%	Hayır	AQP4	1	0.2%	Hayır
ZBTB20	4	0.7%	Evet	ABCC6	1	0.2%	Hayır
CLPTM1L	3	0.7%	Hayır	ARF4	1	0.2%	Hayır
VMP1	3	0.7%	Hayır	ARG2	1	0.2%	Hayır
EGLN3	3	0.7%	Hayır	ASPH	1	0.2%	Hayır
SMAD3	2	0.5%	Evet	ATOX1	1	0.2%	Hayır
MCC	2	0.5%	Hayır	BACH1	1	0.2%	Hayır
SLMAP	2	0.5%	Hayır	OSGIN2	1	0.2%	Hayır
TRIP12	2	0.5%	Hayır	CALD1	1	0.2%	Hayır
LRRC41	2	0.5%	Hayır	CBLB	1	0.2%	Evet
DHX33	2	0.5%	Hayır	MS4A3	1	0.2%	Hayır
FAM172A	2	0.5%	Hayır	CD72	1	0.2%	Hayır
SLC25A21	2	0.5%	Hayır	CDC25C	1	0.2%	Hayır
CD200R1	2	0.5%	Hayır	CFTR	1	0.2%	Hayır
SLC16A14	2	0.5%	Hayır	COL4A1	1	0.2%	Hayır
GLIS3	3	0.5%	Hayır	KLF6	1	0.2%	Evet
SLC9A9	2	0.5%	Hayır	CPM	1	0.2%	Hayır

BHTRHK hasta verilerinde yapılan in silico analiz sonuçları ve literatürdeki veriler ele alındığında *VHL* hastalığın gelişiminde en etkili genlerden biri olduğu görülmüştür. Elde edilen bulgular ışığında *VHL* geninin BHTRHK'da etkili olduğu moleküler yolağın analizi yapıldı (Şekil 27).



**Şekil-27 BHTRHK’da etkili yollar ve genler**

BHTRHK’da moleküler yolak analizi yapıldığında *VHL* HIF yolağında doğrudan *HIF1A* geni ile etkileşim halinde olduğu görüldü. *HIF1A* ve *VHL* birlikte moleküler yolak analizine dahil edildiğinde HIF yolağı dışında hücrel stres cevap oluşum yolağında *KAT5* geni ile etkileşim halinde olduğu görüldü (Tablo 28). İn-silico analizler doğrultusunda saptanan *HIF1A* geninin literatür bilgileri incelendiğinde *VHL* ve *HIF1A* üzerinde direkt ve dolaylı etkileri olduğu görüldü. BHTRHK kapsamında daha önce *HIF1A* geninin çalışılmamış olması *HIF1A*’i aday biyobelirteç konumuna getirmiştir.

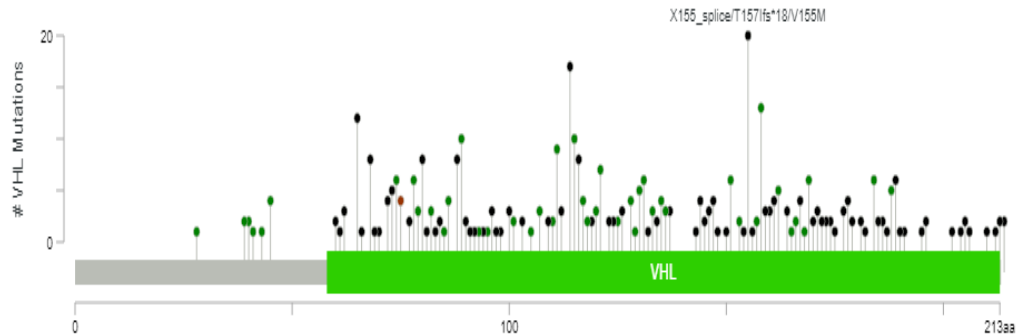
**Tablo-28 VHL, HIF1A ve KAT5 genlerinin görev aldığı moleküler yollar**

Yolak Kodu	Yolak Adı	Gen	p-değeri	Entities FDR	Bulunan reaksiyonlar	Toplam reaksiyonlar	Reaksiyonların oranı
R-HSA-1234176	Hipoksiye bağlı Faktör Alfa'nın oksijene bağlı prolin hidroksilasyonu	VHL; HIF1A	2,46	0,01	10	12	9,61E+11
R-HSA-1234174	Hipoksiye karşı hücrel yanıt	VHL; HIF1A	3,43	0,01	18	20	0,001602
R-HSA-2262752	Strese karşı hücrel yanıt	HIF1A; VHL; KAT5	0	0,02	24	227	0,018177
R-HSA-8953897	Dış uyaranlara hücrel yanıt	HIF1A; VHL; KAT5	0	0,02	24	258	0,02066
R-HSA-8951664	Neddylation	VHL; HIF1A	0	0,03	6	31	0,002482
R-HSA-168256	Immün Sistem	VHL; HIF1A	0,05	0,05	5	1597	0,127883
R-HSA-597592	Post-translasyonel protein modifikasyonlar	VHL; HIF1A	0,1	0,1	8	524	0,04196
R-HSA-392499	Protein metabolizması	VHL; HIF1A	0,19	0,19	8	890	0,071268
R-HSA-162582	Sinyal iletimi	HIF1A; KAT5	0,32	0,32	9	2303	0,184417

Özellikle 3 genin birlikte etki gösterdiği hücrel stres yanıtı ve dış uyaranlara karşı hücrel yanıt ile ilgili moleküler yolları kanser gelişiminde önemli olduğu yapılan çalışmalar sonucu tespit edilen yollar olarak görüldü (Tablo 28).

Çalışma kapsamında belirlenen VHL geni ve onunla ilişki içerisinde olan HIF1A ve KAT5 genleri sırasıyla BHTRHK'da etkili oldukları genetik değişiklikler açısından değerlendirilmiştir.

VHL geni için BHTRHK hastalarının verileri incelendiğinde analize dahil edilen tüm veri gruplarında mutasyon tespit edildi (Şekil 20).



**Şekil-20 VHL Geni BHTRHK'daki mutasyonlarının bölgesel gösterimi**



*VHL* geninin BHTRK'daki mutasyon listesi Tablo 29'da gösterilmektedir. Çalışma kapsamında 1813 hastada 605 adet değişim tespit edilmiştir.

**Tablo-29 *VHL* geninin BHTRHK'da ki en fazla görülen 50 mutasyon**

Protein Değişimi	HGVsg	Mutasyon Tipi	Varyant Tipi	Kopya	Kromozom	Allel Frekans	Mutasyon Sayısı
H115N	3:g.10188200C>A	Missense	SNP	-	3	0.82	57
L89H	3:g.10183797T>A	Missense	SNP	-	3	0.73	107
I151T	3:g.10188309T>C	Missense	SNP	shallowdel	3	-	48
D121Y	3:g.10188218G>T	Missense	SNP	shallowdel	3	-	64
S111R	3:g.10183864C>A	Missense	SNP	shallowdel	3	-	60
H115Y	3:g.10188200C>T	Missense	SNP	shallowdel	3	-	52
H115N	3:g.10188200C>A	Missense	SNP	shallowdel	3	-	804
S111N	3:g.10183863G>A	Missense	SNP	shallowdel	3	-	1
L89H	3:g.10183797T>A	Missense	SNP	deepdel	3	-	41
W88L	3:g.10183794G>T	Missense	SNP	shallowdel	3	-	53
S111R	3:g.10183864C>G	Missense	SNP	shallowdel	3	-	41
N78S	3:g.10183764A>G	Missense	SNP	shallowdel	3	-	1
L135F	3:g.10188262A>T	Missense	SNP	deepdel	3	-	55
S80R	3:g.10183771T>A	Missense	SNP	diploid	3	0.14	41
F76del	3:g.10183755_10183757del	Delesyon	DEL	-	3	-	50
F76del	3:g.10183755_10183757del	Delesyon	DEL	-	3	-	1
L169P	3:g.10191513T>C	Missense	SNP	shallowdel	3	-	54
C162R	3:g.10191491T>C	Missense	SNP	shallowdel	3	-	57
S65L	3:g.10183725C>T	Missense	SNP	deepdel	3	-	1
L158V	3:g.10191479C>G	Missense	SNP	deepdel	3	-	80
S65W	3:g.10183725C>G	Missense	SNP	shallowdel	3	-	48
V74G	3:g.10183752T>G	Missense	SNP	diploid	3	-	85
G114R	3:g.10183871G>C	Missense	SNP	deepdel	3	-	1

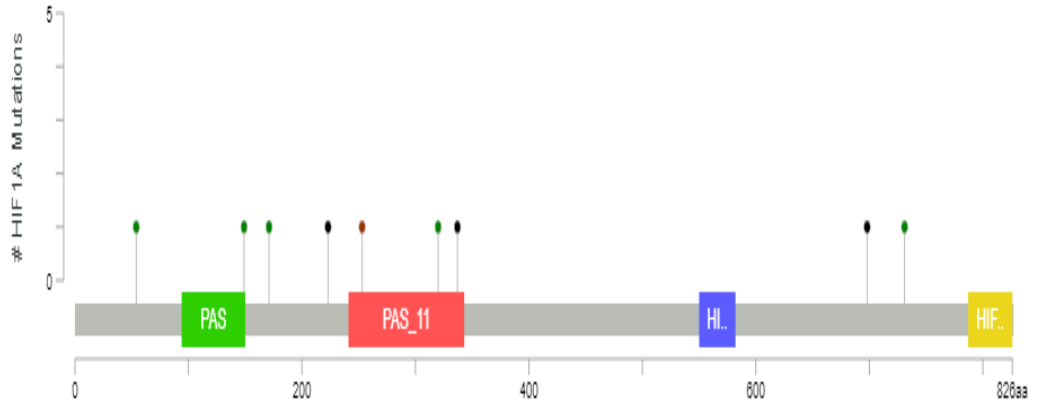
**Tablo-29'un devamı**

Protein Değişimi	HGVSG	Mutasyon Tipi	Varyant Tipi	Kopya	Kromozom	Allel Frekans	Mutasyon Sayısı
Y112D	3:g.10183865T>G	Missense	SNP	shallowdel	3	-	1
L158P	3:g.10191480T>C	Missense	SNP	shallowdel	3	-	62
C162F	3:g.10191492G>T	Missense	SNP	deepdel	3	-	37
L158Q	3:g.10191480T>A	Missense	SNP	deepdel	3	-	72
L158V	3:g.10191479C>G	Missense	SNP	deepdel	3	-	83
S65W	3:g.10183725C>G	Missense	SNP	shallowdel	3	-	48
V74G	3:g.10183752T>G	Missense	SNP	diploid	3	-	85
T105Pfs*25	3:g.10183840_10183844del	Delesyon	DEL	-	3	0.88	101
E189Kfs*13	3:g.10191571del	Delesyon	DEL	-	3	0.80	84
X114_splice	3:g.10188196A>T	Splice Bölge	SNP	-	3	0.52	159
X155_splice	3:g.10191457_10191476del	Splice Bölge	DEL	-	3	0.88	48
C77*	3:g.10183760_10183761insA	Nonsense	INS	-	3	0.47	85
X155 Splice	3:g.10191451_10191466del	Splice Bölge	DEL	-	3	0.91	85
P138Afs*6	3:g.10188267_10188268insG	Çerçeve Kayması	INS	-	3	0.78	85
Q73Pfs*59	3:g.10183745_10183746insC	Çerçeve Kayması	INS	-	3	0.78	60
L153Afs*20	3:g.10188310_10188311del	Delesyon	DEL	-	3	0.55	72
R177Dfs*25	3:g.10191536del	Delesyon	DEL	-	3	0.82	68
N78Ifs*54	3:g.10183763_10183764insT	Çerçeve Kayması	INS	-	3	0.86	122
Y98*	3:g.10183825C>G	Nonsense	SNP	-	3	0.18	60
C77*	3:g.10183762C>A	Nonsense	SNP	-	3	0.79	94
R120*	3:g.10188215A>T	Nonsense	SNP	-	3	0.70	88
P81Afs*50	3:g.10183769_10183770del	Delesyon	DEL	-	3	-	67
P81Afs*50	3:g.10183769_10183770del	Delesyon	DEL	-	3	-	66
L169Qfs*33	3:g.10191513del	Delesyon	DEL	-	3	-	42
E173*	3:g.10191522_10191523insA	Çerçeve Kayması	INS	-	3	0.31	32

**Tablo-29'un devamı**

Protein Değişimi	HGVsg	Mutasyon Tipi	Varyant Tipi	Kopya	Kromozom	Allel Frekans	Mutasyon Sayısı
X112_splice	3:g.10183865_10183887del	Splice Bölge	DEL	-	3	-	24
F91Sfs*68	3:g.10183801del	Delesyon	DEL	-	3	0.49	36

HIFA1 geni için BHTRHK hastalarının verileri incelendiğinde analize dahil edilen tüm veri gruplarında mutasyon tespit edildi (Şekil 21).



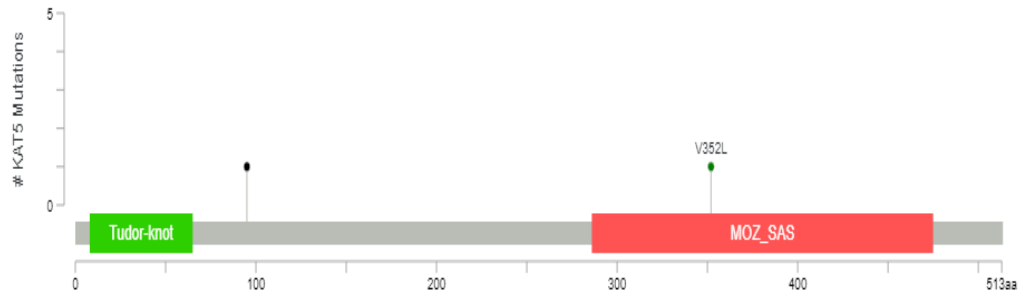
**Şekil-21 HIF1A geninin BHTRHK'daki mutasyonlarının bölgesel gösterimi**

BHTRHK hastalarında *HIF1A* genin mutasyon listesi Tablo 30'da gösterilmektedir. Çalışma kapsamında değerlendirilen vakalarda 16 farklı mutasyon tespit edilmiştir.

**Tablo-30 BHTRHK'daki *HIF1A* geninin mutasyon listesi**

Protein Değişimi	HGVSg	Mutasyon Tipi	Varyant Tipi	Kopya	Kromozom	Allel Frekans	Mutasyon Sayısı
C224Lfs*2	14:g.62194267_62194268insT	Çerçeve Kayması	INS	-	14	0.74	159
A731E	14:g.62211521C>A	Missense	SNP	-	14	0.88	51
S253_Y254dup	14:g.62194355_62194356insTTCTTA	Çerçeve Kayması	INS	-	14	0.96	101
M171I	14:g.62193479G>T	Missense	SNP	-	14	-	51
T149R	14:g.62188530C>G	Missense	SNP	-	14	-	52
C337*	14:g.62200986T>A	Nonsense	SNP	diploid	14	-	74
X698_splice	14:g.62211422G>C	Splice Bölge	SNP	diploid	14	-	70
L54I	14:g.62187224C>A	Missense	SNP	shallowdel	14	-	66
C337*	14:g.62200986T>A	Nonsense	SNP	diploid	14	0.30	72
X698_splice	14:g.62211422G>C	Splice Bölge	SNP	diploid	14	0.13	66
L54I	14:g.62187224C>A	Missense	SNP	shallowdel	14	0.14	65
Q320L	14:g.62200934A>T	Missense	SNP	diploid	14	0.19	56
C337*	14:g.62200986T>A	Nonsense	SNP	diploid	14	-	78
X698_splice	14:g.62211422G>C	Splice Bölge	SNP	diploid	14	-	67
L54I	14:g.62187224C>A	Missense	SNP	shallowdel	14	-	67

*KAT5* geni için BHTRHK hastalarının verileri incelendiğinde analize dahil edilen tüm veri gruplarında mutasyon tespit edilmiştir (Şekil 22).



**Şekil-22 *KAT5* Geninin BHTRHK'daki mutasyonlarının bölgesel gösterimi**

*KAT5* genin BHTRK'daki mutasyon listesi Tablo 31'de gösterilmektedir. Çalışma kapsamında 1813 hastada 2 adet değişim tespit edilmiştir.

**Tablo-31 KAT5 geninin BHTRHK'daki değişim listesi**

Protein Değişimi	HGVSg	Mutasyon Tipi	Varyant Tipi	Kopya	Kromozom	Allel Frekans	Mutasyon Sayısı
V352L	11:g.65484261G>T	Missense	SNP	diploid	11	0.04	57
X95_splice	11:g.65480531T>G	Splice Bölge	SNP	diploid	11		28

3 genin de BHTRHK'da etkili olduğu tespit edilen değişimleri mevcuttur. Bir sonraki yapılan analizde BHTRHK vakalarında 3 gendeki mutasyonların birlikte görülme durumları değerlendirildi (Tablo 32).

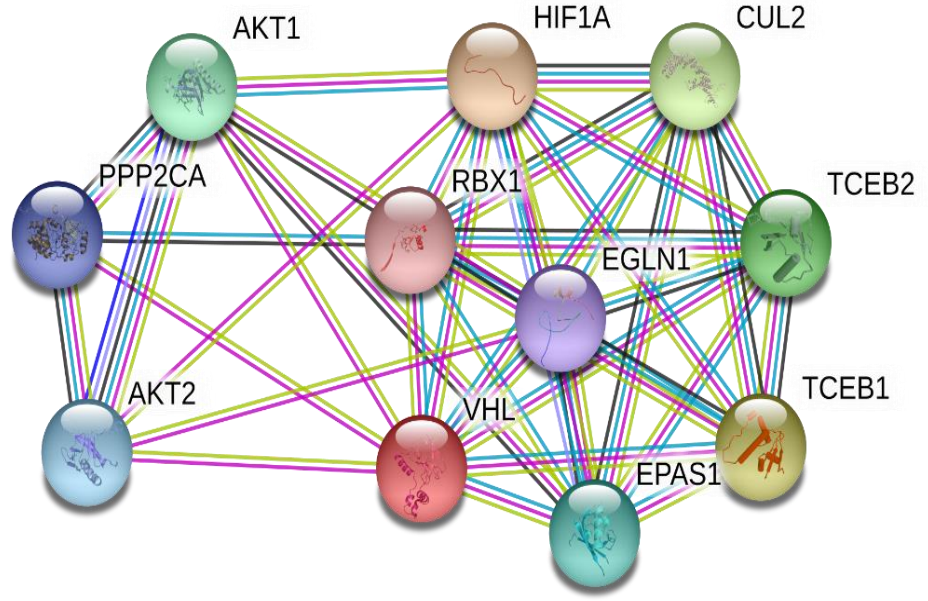
**Tablo-32 VHL, HIF1A ve KAT5'e ait mutasyonların birlikte görülme olasılıklarının analizi**

A	B	Sadece A Mutasyonu	Sadece B Mutasyonu	Her iki Mutasyon	Log2 Odds Ratio	p-değeri	q-değeri	Eğilim
VHL	HIF1A	781	6	12	1.007	0.119	0.356	Eş-oluşum
VHL	KAT5	790	1	3	1.585	0.313	0.470	Eş-oluşum
HIF1A	KAT5	18	4	0	<-3	0.955	0.955	Karşılıklı İlişki

Elde edilen sonuçlar ışığında; *VHL* ve *HIF1A* genlerindeki mutasyonların birlikte görüldüğü hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ( $p=0,119$ ). *VHL* ve *KAT5* mutasyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0,313$ ). *HIF1A* ve *KAT5* mutasyonlarının birlikte görülme durumları incelendiğinde ise, BHTRHK'da bu iki genin mutasyonları hastalar arasında birlikte görülmedi ( $p=0,955$ ).

Elde ettiğimiz bulgulara göre; mutasyon bakımından *VHL* BHTRHK'da etkili bir gen olarak görev alırken; *HIF1A* ve *KAT5* mutasyonlarının sıklıkları ve sayıları oldukça düşüktür.

String ve KEGG veri tabanları kullanılarak genlerin protein yapılarının ve moleküler yollar üzerindeki etkileşimlerinin tespiti yapılmıştır (Şekil 23). *KAT5* geninin protein ifadesi mevcut veriler ışığında *VHL* ve *HIF1A* ile ilişkilendirilmemiştir.



**Şekil-23 VHL ve HIF1A genlerinin protein yolak analizi (<https://string-db.org/>)**

Tablo-33’de *VHL* ve *HIF1A* proteinlerinin eşleştiği moleküler yollar gösterilmektedir.

**Tablo-33 KEGG programı kullanılarak yapılmış protein etkileşim tablosu**

Yolak Kodu	Yolak açıklaması	Analiz Edilen Gen Sayısı	Arka Plandaki Gen Sayısı	Yanlış Bulgu Oram	Etkileşim Halindeki Proteinler
GO:0061418	hipoksiye yanıt olarak RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyonun düzenlenmesi	8	32	3.10e-17	CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0071456	hipoksiye hücreyel yanıt	9	139	2.25e-15	AKT1,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0009628	abiyotik uyarana yanıt	10	1052	2.91e-10	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0043687	Post-translasyonel protein modifikasyonlar	7	365	3.12e-08	CUL2,EPAS1,HIF1A,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0006464	hücreyel protein modifikasyonu süreci	11	2999	1.22e-07	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0070887	kimyasal uyarana hücreyel yanıt	10	2672	1.71e-06	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:2000112	hücreyel makromolekül biosentetik işleminin düzenlenmesi	11	4050	2.21e-06	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0042221	kimyasal uyarana yanıt	11	4153	2.68e-06	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0010468	gen ekspresyonunun düzenlenmesi	11	4533	5.71e-06	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0070647	küçük protein konjugasyonu veya uzaklaştırılması ile protein modifikasyonu	7	945	8.50e-06	AKT1,CUL2,HIF1A,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0006355	transkripsiyonun düzenlenmesi, kalıp DNA ile	10	3661	2.28e-05	AKT1,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0006357	transkripsiyonun RNA polimeraz II ile düzenlenmesi	9	2633	2.48e-05	AKT1,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL

**Tablo-33'ün devamı**

Yolak Kodu	Yolak açıklaması	Analiz Edilen Gen Sayısı	Arka Plandaki Gen Sayısı	Yanlış Bulgu Oranı	Etkileşim Halindeki Proteinler
GO:0051252	RNA metabolik sürecinin düzenlenmesi	10	3890	3.29e-05	AKT1,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0051171	azot bileşiği metabolik sürecinin düzenlenmesi	11	5827	5.69e-05	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0051173	azot bileşiği metabolik sürecinin pozitif regülasyonu	9	2946	5.69e-05	AKT1,AKT2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,VHL
GO:0080090	birincil metabolik sürecin düzenlenmesi	11	5982	7.21e-05	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0031325	hücrel metabolik sürecin pozitif düzenlenmesi	9	3060	7.36e-05	AKT1,AKT2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,VHL
GO:0010604	makromolekül metabolik sürecinin pozitif regülasyonu	9	3081	7.62e-05	AKT1,AKT2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,VHL
GO:0051716	uyarana hücrel cevap	11	6212	9.70e-05	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
GO:0010557	makromolekül biyosentetik işleminin pozitif düzenlenmesi	7	1758	0.00026	AKT1,AKT2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,TCEB1,VHL
GO:0031328	hücrel biyosentetik işlemin pozitif düzenlenmesi	7	1846	0.00034	AKT1,AKT2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,TCEB1,VHL
GO:0045893	transkripsiyonun pozitif regülasyonu, kalıp DNA ile	6	1435	0.00085	AKT1,EGLN1,EPAS1,HIF1A,TCEB1,VHL



**Tablo-33'ün devamı**

Yolak Kodu	Yolak açıklaması	Analiz Edilen Gen Sayısı	Arka Plandaki Gen Sayısı	Yanlış Bulgu Oranı	Etkileşim Halindeki Proteinler
GO:0051254	RNA metabolik sürecinin pozitif regülasyonu	6	1596	0.0013	AKT1,EGLN1,EPAS1,HIF1A,TCEB1,VHL
GO:0009057	makromolekül katabolik süreci	5	970	0.0014	AKT1,CUL2,PPP2CA,RBX1,TCEB1
GO:0010035	inorganik maddeye yanıt	4	491	0.0015	AKT1,EGLN1,HIF1A,PPP2CA
GO:1902532	hücre içi sinyal iletiminin negatif regülasyonu	4	514	0.0016	AKT1,HIF1A,PPP2CA,VHL
GO:0045944	RNA polimeraz II ile transkripsiyonun pozitif düzenlenmesi	5	1104	0.0022	AKT1,EGLN1,EPAS1,HIF1A,TCEB1
GO:0009968	sinyal iletiminin negatif düzenlenmesi	5	1160	0.0026	AKT1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,VHL
GO:0030163	protein katabolik süreci	4	615	0.0027	AKT1,CUL2,RBX1,TCEB1
GO:0006508	proteoliz	5	1203	0.0029	CUL2,HIF1A,RBX1,TCEB1,VHL
GO:0043066	apoptotik sürecin negatif düzenlenmesi	4	859	0.0068	AKT1,AKT2,HIF1A,VHL
GO:0042127	hücre popülasyonunun çoğalmasının düzenlenmesi	5	1594	0.0075	AKT1,AKT2,CUL2,HIF1A,VHL
GO:0010941	hücre ölümünün düzenlenmesi	5	1638	0.0080	AKT1,AKT2,EGLN1,HIF1A,VHL
GO:0048519	biyolojik sürecin negatif düzenlenmesi	8	4953	0.0082	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,HIF1A,PPP2CA,RBX1,VHL
GO:0048523	hücreysel sürecin negatif düzenlenmesi	7	4454	0.0200	AKT1,AKT2,CUL2,HIF1A,PPP2CA,RBX1,VHL
GO:0050790	katalitik aktivitenin düzenlenmesi	5	2249	0.0227	AKT1,AKT2,EGLN1,HIF1A,PPP2CA

**Tablo-33'ün devamı**

Yolak Kodu	Yolak açıklaması	Analiz Edilen Gen Sayısı	Arka Plandaki Gen Sayısı	Yanlış Bulgu Oranı	Etkileşim Halindeki Proteinler
GO:0040008	büyümenin düzenlenmesi	3	663	0.0232	AKT1,HIF1A, PPP2CA
GO:0043085	katalitik aktivitenin pozitif düzenlenmesi	4	1381	0.0240	AKT1,AKT2, HIF1A,PPP2C A
GO:0051128	hücre sel bileşen organizasyonunun düzenlenmesi	5	2306	0.0248	AKT1,AKT2, HIF1A,PPP2C A,RBX1
GO:0007165	sinyal iletimi	7	4738	0.0268	AKT1,AKT2, CUL2,EPAS1, HIF1A,PPP2C A,RBX1
GO:0034645	hücre sel makromolekül biyosentetik süreci	6	3518	0.0284	AKT1,AKT2, EPAS1,HIF1A ,TCEB1,TCEB 2
GO:0050793	gelişim sürecinin düzenlenmesi	5	2416	0.0289	AKT1,EGLN1 ,HIF1A,PPP2C A,VHL
GO:0048583	uyarana yanıtın düzenlenmesi	6	3882	0.0414	AKT1,AKT2, HIF1A,PPP2C A,RBX1,VHL
GO:0045595	hücre farklılaşmasının düzenlenmesi	4	1695	0.0417	AKT1,HIF1A, PPP2CA,VHL
GO:0045597	hücre farklılaşmasının pozitif düzenlenmesi	3	908	0.0446	AKT1,HIF1A, VHL

Elde edilen nicel sonuçlar nezdinde işlevsel olarak *VHL* ve *HIF1A* proteinleri en çok hipoksik yanıtta görev almaktadırlar. Bu proteinlerin genel kanser ile olan etkileşimleri analiz edildiğinde renal karsinom ile en yüksek etkileşimde oldukları hesaplanmıştır ( FDR= 5.89e-22 ) (Tablo 34).

**Tablo-34 VHL ve HIF1A protein yapılarının birlikte etkilediği moleküler yollar**

Yolak Kodu	Yolak açıklaması	Gözlenen Gen Sayısı	Arka Plandaki Gen Sayısı	Yanlış Bulgu Oranı	Etkileşim Halindeki Proteinler
hsa05211	Renal Hücreli Karsinom	10	68	5.89e-22	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
hsa04066	HIF-1 Sinyal Yolağı	9	98	8.16e-18	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,HIF1A,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL
hsa05200	Kanser Gelişim Yolları	10	515	6.14e-14	AKT1,AKT2,CUL2,EGLN1,EPAS1,HIF1A,RBX1,TCEB1,TCEB2,VHL

VHL ve HIF1A proteinlerinin etkileşimde olduğu diğer proteinler ile arasında homoloji modellemesi yapıldı. Model dizi analizine dayalı basit özdeşlik matrisi kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; VHL ve HIF1A arasında diziye dayalı bir benzerlik bulunmamaktadır (homoloji skoru=0). Ancak, deneysel olarak proteinleri arası etkileşim skoru 0,999 ile yüksek ilişki içerisinde oldukları analiz edildi (Tablo 35).

**Tablo-35 VHL ve HIF1A proteinlerinin homoloji skorlaması**

Protein 1	Protein 2	Homoloji	Birlikte Ekspresyon	Deneysel Olarak Belirlenmiş Etkileşim	Veritabanı Değeri	Otomatik Veri Tabanı Değeri	Kombin Skor
HIF1A	VHL	0	0	0.999	0.900	0.836	0.999
CUL2	VHL	0	0	0.912	0.900	0.911	0.999
HIF1A	EGLN1	0	0	0.998	0.900	0.827	0.999
TCEB1	VHL	0	0	0.916	0.900	0.926	0.999
HIF1A	TCEB2	0	0	0.962	0.900	0.514	0.998
TCEB2	VHL	0	0	0.875	0.900	0.906	0.998
TCEB1	HIF1A	0	0	0.974	0.900	0.514	0.998
AKT1	VHL	0	0	0.993	0	0.671	0.997
EPAS1	VHL	0	0	0.809	0.900	0.752	0.994
PPP2CA	VHL	0	0	0.993	0	0.043	0.993
AKT1	HIF1A	0	0	0.362	0.900	0.827	0.988
VHL	RBX1	0	0	0.470	0.900	0.700	0.982
CUL2	HIF1A	0	0.062	0.409	0.900	0.496	0.968
HIF1A	RBX1	0	0	0.342	0.900	0.306	0.950
HIF1A	EPAS1	0.903	0	0.126	0.900	0.817	0.916
HIF1A	AKT2	0	0	0.267	0	0.367	0.516

Ek olarak *HIF1A* geni *EPAS1* ile 0,903 skor ile homoloji gösterdiği analiz edildi. Deneysel etkileşim skorları 0,126 olarak tespit edildi.

cBioportal, reactome ve string veri bankalarından BHTRHK hastalarına ait elde edilen veriler doğrultusunda; saptanan *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5* genleri GEO veri bankasında BHTRHK hastaları farklı klinik parametreler ile analiz edilmiştir. Analiz kapsamında 11 farklı çalışma hesaplamalara dahil edildi (Tablo 36). Çalışmaya dahil edilen toplam örneklem sayısı 4223'tür (farklı kanser grupları ve kontrol örnekleri de bu grup içerisinde bulunmaktadır). Bu grup içerisinde 1326 örnek BHTRHK hastasıdır. *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5* değerlerinin diğer kanser türleri içerisindeki ifade düzeylerinin analizi yapılmak amacıyla karma bir grup ile çalışılmıştır. Örneklerin analiz işlemleri GSEA 4.0.3 üzerinde yapılmıştır. 11 farklı çalışma kendi içinde farklı klinik parametreler ihtiva etmektedir (Tablo 37). Her bir klinik parametrede *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5* gen ifade farklılıkları karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

**Tablo-36 GEO veri bankasındaki analizi yapılan 11 çalışmanın özellikleri**

Çalışma Tarihi	Başlık	Organizma	Çalışma Tipi	Yüklenme Tarihi	Son Güncellenme Tarihi	Ülke	Platform	GEO Kodu	Toplam Örnek Sayısı	Renal Örnek Sayısı	BHTRK Örnek Sayısı	Parametreler
Public on Mar 20, 2012	SNP and Expression data from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)	Homo Sapiens	Expression profiling by array Genome variation profiling by SNP array	Feb 28, 2012	Mar 13, 2018	USA	GPL15308/ GPL15315	GSE36139	1864	34	34	-
Public on May 16, 2015	caArray_golub-00327: Sanger cell line Affymetrix gene expression project	Cell line	Expression profiling by array	May 15, 2015	Jan 17, 2017	USA	GPL3921	GSE68950	788	4	4	N/C
Public on Jul 19, 2001	Renal Cell Carcinoma Differential Expression	Homo Sapiens	Expression profiling by array	Jul 19, 2001	Dec 26, 2017	Germany	GLP9/GLP10	GSE3	342	160	160	N/C
Public on Aug 08, 2017	Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) samples	Homo Sapiens	Expression profiling by array	Oct 05, 2015	Jan 08, 2019	Singapore	GLP570	GSE73731	265	265	265	gender/stage/grade
Public on Jul 24, 2012	Integrative genome-wide expression profiling identifies three distinct molecular subgroups of renal cell carcinoma with different patient outcome	Homo Sapiens/ cell lines	Expression profiling by array Genome variation profiling by SNP array	Jan 19, 2010	Nov 27, 2018	Switzerland	GLP3921	GSE19949	147	147	147	grade/stage/sample type/Organ site/gender/
Public on Jun 03, 2013	Integrative genome-wide gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma in Czech Republic	Homo sapiens	Expression profiling by array	Aug 28, 2012	Aug 13, 2018	France	GPL10558	GSE40435	202	101	101	N/C
Public on Jan 03, 2014	Gene array analysis of clear cell renal cell carcinoma tissue versus matched normal kidney tissue	Homo sapiens	Expression profiling by array	Jan 02, 2014	Mar 25, 2019	USA	GLP570	GSE53757	144	144	144	N/C /STAGE
Public on May 25, 2015	Sunitinib treatment exacerbates intratumoral heterogeneity in metastatic renal cancer	Homo sapiens	Expression profiling by array	Feb 04, 2015	Aug 13, 2018	United Kingdom	GPL10558	GSE65615	138	138	138	N/C/Sunitinib treatment/
Public on Jan 10, 2014	Smoking and Obesity Related Molecular Alterations in Clear Cell Renal Cell Carcinoma	Homo sapiens	Expression profiling by array	May 07, 2013	Mar 25, 2019	USA	GPL570	GSE46699	130	130	130	N/C/smoking/obez/Duplicate/BATCH
Public on Jan 05, 2010	Somatic Mutation Screen of Clear Cell RCC II	Homo sapiens	Expression profiling by array	Aug 26, 2009	Mar 21, 2012	USA	GPL9101	GSE17818	115	115	115	N/C
Public on Oct 16, 2018	Integrative Epigenetic and Gene Expression Analysis of Renal Tumor Progression to Metastasis	Homo sapiens	Methylation profiling by genome tiling array Expression profiling by array	Oct 19, 2017	Mar 22, 2019	USA	GPL10558/1353 4	GSE105288	88	88	88	Metastatik/nonmetastatik

**Tablo-37 GEO veri bankasındaki çalışmaların analiz sonuçları**

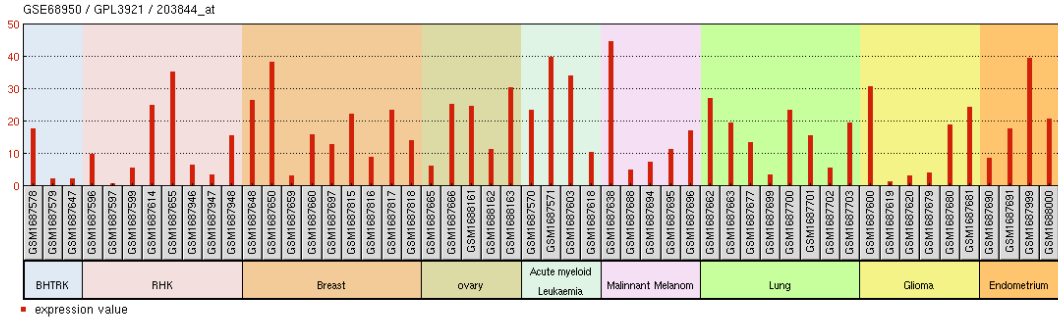
Çalışma No	Gen	P.Value	F	T	B	Log FC	Fold Regulation	Çalışmadaki Hasta Sayısı	Parametre
GSE36139	VHL	0,00	9,98	-	-	-	-	1864	BHTRHK ile renal hücreli karsinom, meme kanseri, ovaryum kanseri, akut miyeloid lösemi, malign melanom, akciğer kanseri, gliom, endometriyum ve karaciğer kanseri karşılaştırılmıştır.
	HIF1A	0,00	4,16	-	-	-	-		
	KAT5	0,00	4,94	-	-	-	-		
GSE46950	VHL	0,26	1,31	-	-	-	-	788	BHTRHK ile renal hücreli karsinom, meme kanseri, ovaryum kanseri, akut miyeloid lösemi, malign melanom, akciğer kanseri, gliom ve endometriyum karşılaştırılmıştır.
	HIF1A	0,00	3,78	-	-	-	-		
	KAT5	0,80	0,56	-	-	-	-		
GSE3	VHL	0,04	-	-1,71	-4,30	0,51	-1,96	362	BHTRHK ile normal böbrek dokusu örnekleri karşılaştırılmıştır.
	HIF1A	-	-	-	-	-	-		
	KAT5	-	-	-	-	-	-		
GSE73731	VHL	0,02	-	2,43	-3,26	0,63	-1,59	265	BHTRHK hastalarında cinsiyete dayalı farklılık araştırılmıştır.
	HIF1A	0,84	-	0,20	-5,95	0,19	-5,32		
	KAT5	0,65	-	0,45	-5,87	0,28	-3,57		
GSE19949	VHL	0,29	-	-1,08	-5,73	-0,70	1,44	147	Primer BHTRHK ile metastatik BHTRHK karşılaştırılmıştır.
	HIF1A	0,32	-	1,00	-5,80	0,22	-4,53		
	KAT5	0,64	-	-0,48	-6,18	-0,14	7,34		
GSE19949	VHL	0,33	-	-0,98	-6,03	-0,64	1,57	147	Primer BHTRHK ile papiller renal karsinom karşılaştırılmıştır.
	HIF1A	0,01	-	2,55	-3,47	0,54	-1,84		
	KAT5	0,10	-	-1,68	-5,14	-0,34	2,91		
GSE19949	VHL	0,27	1,36	-	-	-	-	147	BHTRHK'nın Grade 1, 2 ve 3 hasta grupları arası karşılaştırma yapılmıştır.
	HIF1A	0,93	0,07	-	-	-	-		
	KAT5	0,42	0,89	-	-	-	-		
GSE40435	VHL	0,00	5,55	-	-	-	-	202	BHTRHK'nın Grade 1, 2, 3 ve 4 hasta grupları arası karşılaştırma yapılmıştır.
	HIF1A	0,04	2,89	-	-	-	-		
	KAT5	0,76	0,40	-	-	-	-		
GSE53757	VHL	0,08	1,88	-	-	-	-	144	BHTRHK evrelere göre kontrol gruplarıyla birlikte karşılaştırılmıştır.
	HIF1A	0,00	4,04	-	-	-	-		
	KAT5	0,09	1,81	-	-	-	-		
GSE65615	VHL	0,03	-	2,25	-3,84	0,31	-3,22	138	BHTRHK hastaları içerisinde Subitüip Tedavisine pozitif / negatif cevap veren hastalar karşılaştırılmıştır.
	HIF1A	0,05	-	1,99	-4,32	0,37	-2,67		
	KAT5	0,14	-	-1,50	-5,10	-0,25	3,97		
GSE46699	VHL	0,00	-	3,15	-2,25	0,17	-5,88	130	BHTRHK hastaları içerisinde obez olanlar ile sigara kullanan hastaların karşılaştırılması.
	HIF1A	0,32	-	-1,01	-6,19	-0,29	3,40		
	KAT5	0,03	-	2,27	-4,26	0,14	-7,24		
GSE46699	VHL	0,29	-	-1,08	-4,67	-0,14	7,30	130	BHTRHK hastaları içerisinde obez ve sigara kullanan hastalar ile sadece sigara kullanan hastaların karşılaştırılması.
	HIF1A	0,07	-	1,86	-4,09	0,64	-1,56		
	KAT5	0,15	-	-1,48	-4,41	-0,11	9,17		
GSE46699	VHL	0,00	-	-3,12	-2,44	-0,25	4,01	130	BHTRHK hastaları içerisinde obez ve sigara kullanan hastalar ile sadece obez olan hastaların karşılaştırılması.
	HIF1A	0,11	-	-1,63	-5,40	-0,32	3,17		
	KAT5	0,57	-	0,57	-6,53	0,04	-28,15		
GSE17818	VHL	-	-	-	-	-	-	115	BHTRHK hastaları ile normal bireyler karşılaştırılmıştır.
	HIF1A	0,05	-	-1,95	-5,14	-0,35	2,84		
	KAT5	0,24	-	-1,19	-6,30	-0,12	8,51		
GSE105288	VHL	0,01	-	2,65	-2,82	0,32	-3,13	88	BHTRHK ile metastatik BHTRHK grupları karşılaştırılmıştır.
	HIF1A	0,08	-	1,82	-4,25	0,27	-3,68		
	KAT5	0,01	-	2,98	-2,19	0,20	-5,11		
GSE105288	VHL	0,01	-	-2,65	-2,82	0,32	-3,13	88	Metastatik BHTRHK ve normal grupları karşılaştırılmıştır.
	HIF1A	0,05	-	-1,82	-4,25	-0,27	3,68		
	KAT5	0,01	-	-2,98	-2,19	-0,20	5,11		



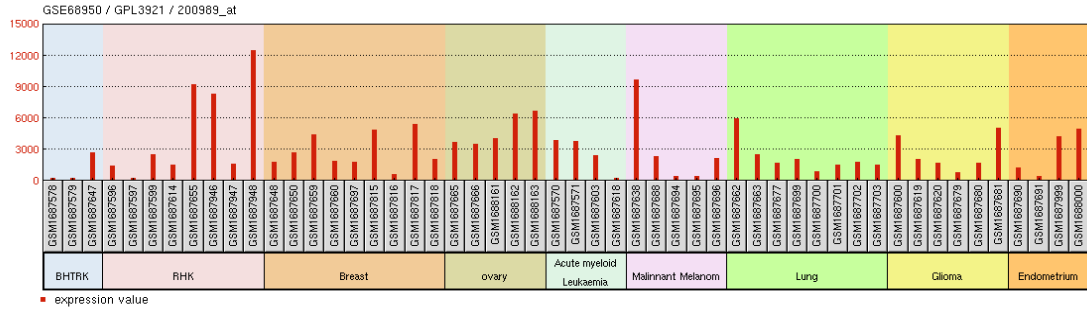
Yapılan anova analizleri sonucu *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5*  $p < 0.05$  olduğundan bu üç genin ifade düzeyi BHTRHK’da diğer kanser türlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (*VHL*,  $p = 0,0001$ ; *HIF1A*,  $p = 0,0001$ ; *KAT5*  $p = 0,0001$ ).

GSE68950 kodlu çalışma kapsamında 788 hücre hattı, analiz edilmiştir. 788 hücre hattı BHTRHK, RHK, meme kanseri, ovaryum kanseri, akut miyeloid lösemi, malign melanom, akciğer kanseri, gliom ve endometriyum olmak üzere 9 ayrı gruba ayrılıp karşılaştırılmıştır. *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5*’in BHTRHK’da ve diğer kanser türlerindeki durumları karşılaştırılmıştır (Şekil 25). Aşağıda verilen grafikler toplam hücre hattı sayısının 1/10’u örneklem alınarak çizilmiştir. İstatistiksel analizler tüm hücre hatlarının dahil edilerek yapılmıştır.

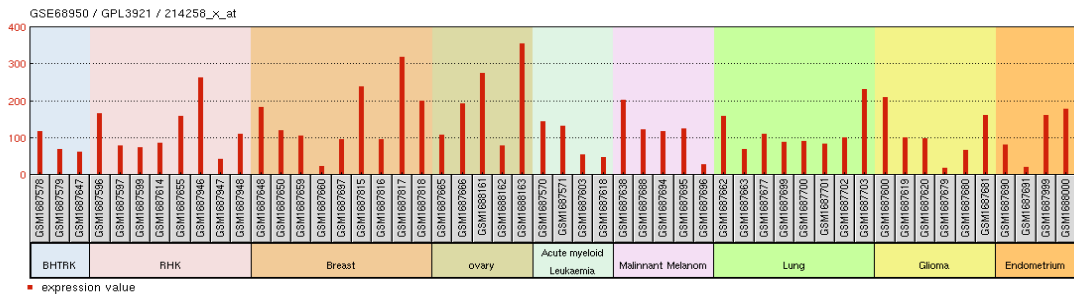
### A) *VHL*



### B) *HIF1A*



### C) *KAT5*

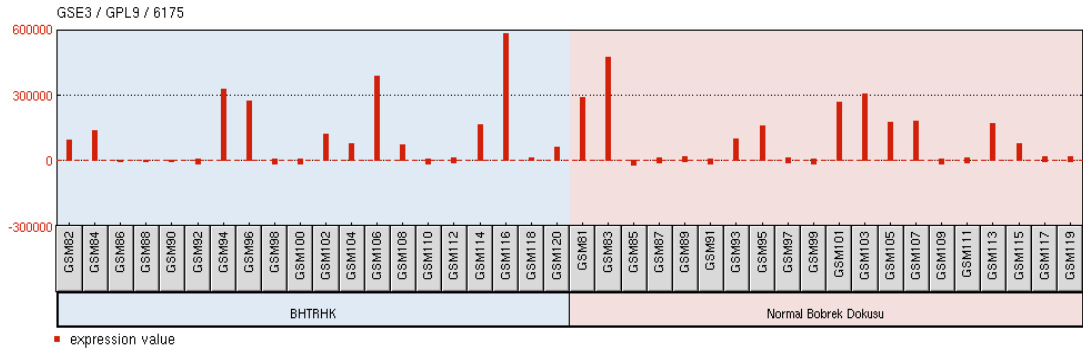




## Şekil-25 GSE68950 kodlu çalışmada A) *VHL* B) *HIF1A* ve C) *KAT5* genlerinin ifade değerleri

Yapılan anova analizleri sonucu *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5* için; *VHL*;  $p= 0.26$ , *HIF1A*;  $p= 0.001$ , *KAT5*;  $p= 0.80$  olarak hesaplandı. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark sadece *HIF1A* genin ifadesinde hesaplandı. Bu durum, hücre hatlarında yapılan gen ifadesi analizlerinin gerçek hasta tümör dokusundan farklılık gösterebileceğini nicel olarak ifade etmiştir.

GSE3 kodlu çalışma kapsamında 362 hasta analiz edilmiştir. 362 hastanın BHTRHK tümör dokusu ile normal böbrek doku örnekleri karşılaştırıldı. Çalışma verileri içerisinde sadece *VHL* gen ifade verilerine ulaşılabildiği için yalnızca *VHL* gen ifade durumu analiz edildi (Şekil 26). Aşağıda verilen grafikler toplam hasta sayısının 1/5'i örneklem alınarak çizildi. İstatistiksel analizler tüm hastalar dahil edilerek yapıldı.

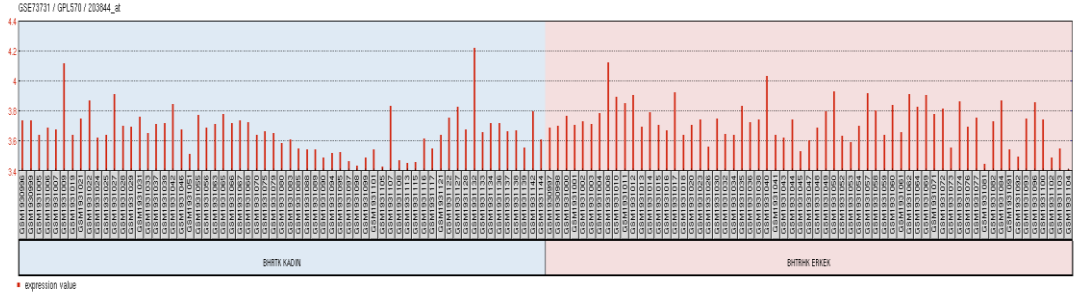


## Şekil-26 GSE3 kodlu *VHL* geninin ifade değerleri

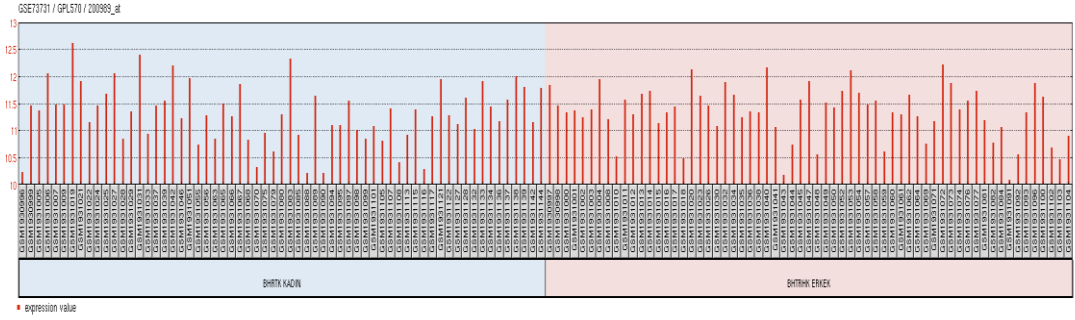
Yapılan t-testi analizleri sonucu *VHL* geninin ifade düzeyindeki farklılık;  $p=0.04$  olarak hesaplandı. BHTRHK hastalarında *VHL* geninin ifadesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde -1,96 kat ifade azalması tespit edildi.

GSE73731 kodlu çalışma kapsamında 265 hasta analiz edildi. BHTRHK hastalarında cinsiyete dayalı fark olup olmadığı karşılaştırılarak gen ifade farklılıkları hesaplanmıştır (Şekil 27). Aşağıda verilen grafikler de toplam hasta sayısının yarısı örneklem alınarak çizilmiştir. İstatistiksel analizler tüm hastalar dahil edilerek yapıldı.

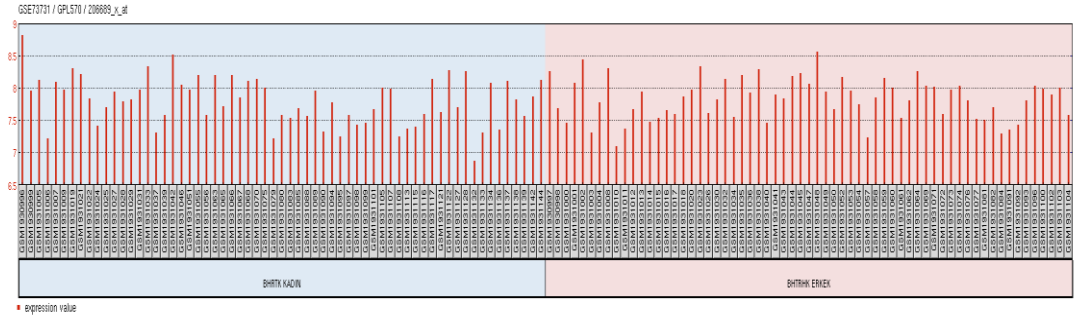
### A) *VHL*



### B) *HIF1A*



### C) *KAT5*



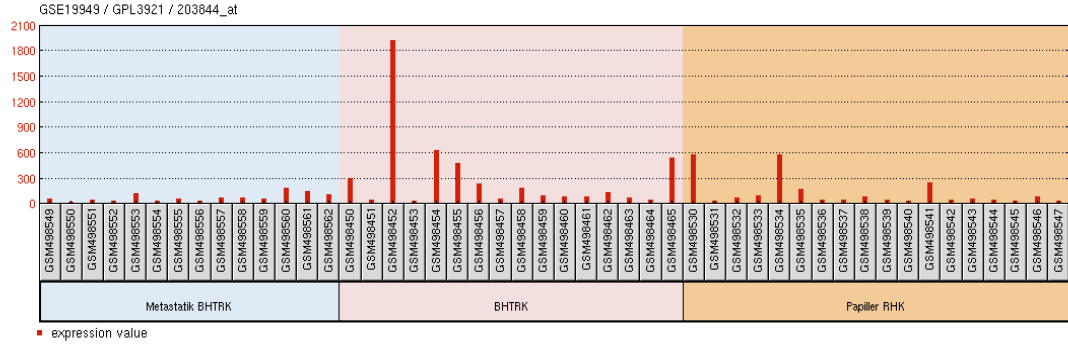
**Şekil-27 GSE73731 kodlu çalışmada A) *VHL* B) *HIF1A* ve C) *KAT5* genlerinin ifade değerleri**

Yapılan t-testi analizleri sonucu *VHL*;  $p=0.02$ , *HIF1A*;  $p=0.84$ , *KAT5*;  $p=0.65$  olarak hesaplanmıştır. Gen ifade seviyeleri değerlendirildiğinde *VHL* kadınlarda erkeklere göre istatistiksel olarak -1,59 kat daha az seviyede ifade edilmektedir.

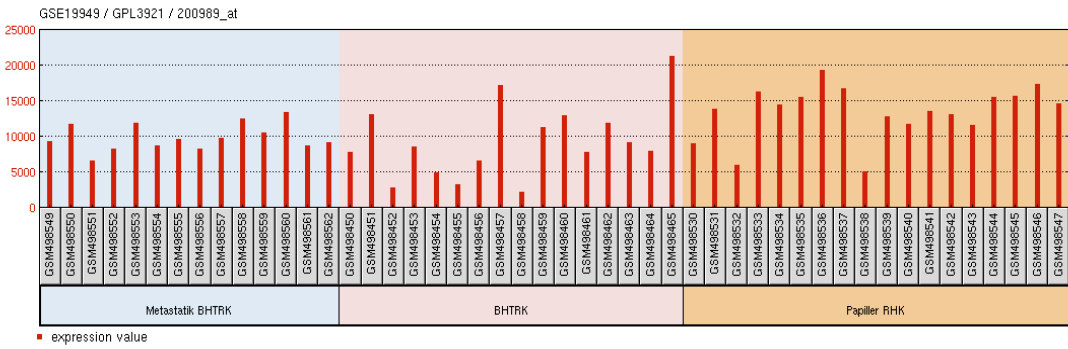
GSE19949 kodlu çalışma kapsamında 147 hasta analiz edilmiştir. 147 hastada Primer BHTRHK ile metastatik BHTRHK ve Papiller RHK karşılaştırılmıştır (Şekil 28). Bu örnekte yapılan bir diğer karşılaştırma ise, BHTRHK hastaları arasında 1. ve 2. derece hasta grupları arasındaki *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5*'in gen ifade değerleri karşılaştırılmıştır (Şekil 29). Aşağıda verilen grafiklerde toplam hasta sayısının yarısı

örneklem alınarak çizilmiştir. İstatistiksel analizler tüm hastalar dahil edilerek yapılmıştır.

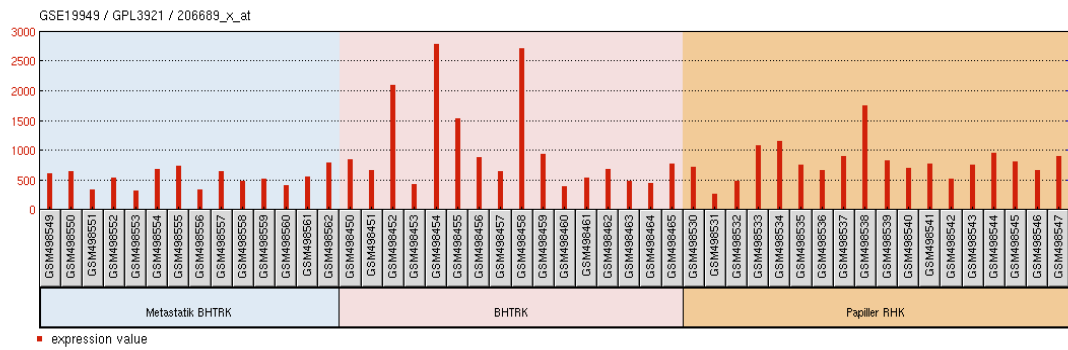
### A) *VHL*



### B) *HIF1A*



### C) *KAT5*



Şekil-28 GSE19949 kodlu çalışmada A) *VHL* B) *HIF1A* ve C) *KAT5* genlerinin ifade değerleri

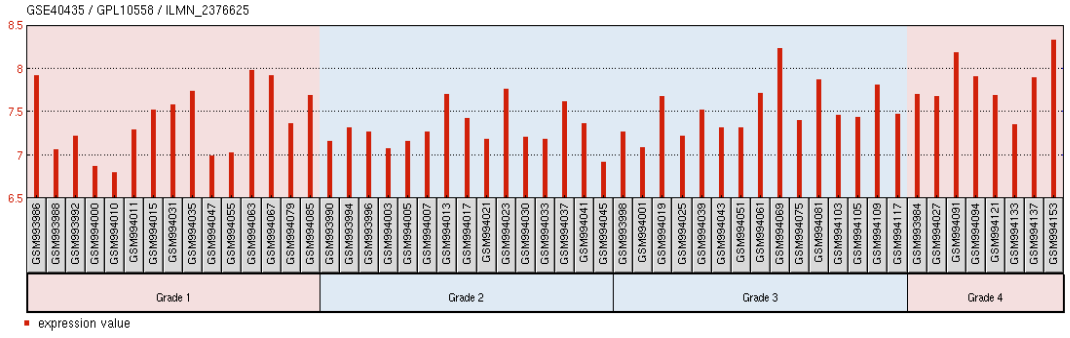


Bu durum sonucunda *HIF1A* gen ifadesi BHTRHK'da Papiller RHK'aya göre -1,84 kat daha azdır.

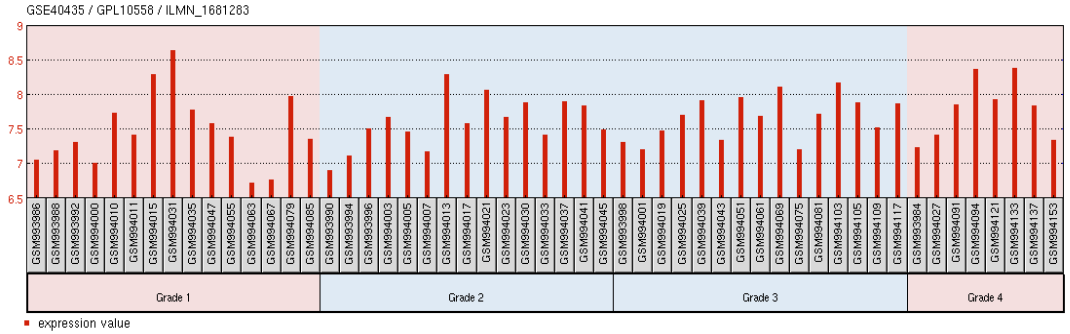
BHTRHK içerisinde hastalar evrelerine göre üç gruba ayrıldığında aralarında yapılan anova analizi sonucu *VHL*;  $p= 0.27$ , *HIF1A*;  $p= 0.93$ , *KAT5*;  $p= 0.42$  'dir.  $p<0.05$  değeri 3 genin ifade farklılıkları için istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Bu durum sonucunda BHTRHK 'daki evreler arasında bu üç gen için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

GSE40435 kodlu çalışma kapsamında 202 hasta analiz edilmiştir. 202 hasta, hastalık evrelerine dayalı fark olup olmadığı karşılaştırılmıştır. BHTRHK'da 1-4 evreye sahip hastalar arasındaki gen ifade farklılıkları hesaplanmıştır (Şekil 30). Aşağıda verilen grafiklerde toplam hasta sayısının %45'i örneklem alınarak çizilmiştir. İstatistiksel analizler tüm hastalar dahil edilerek yapılmıştır.

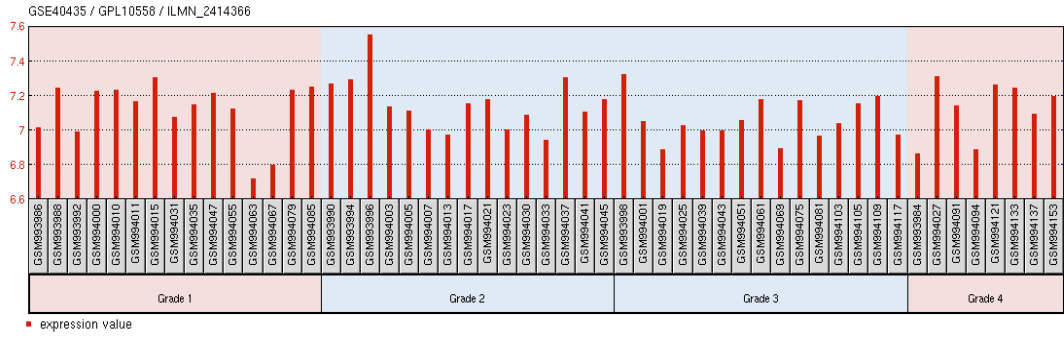
#### A) *VHL*



#### B) *HIF1A*



### C) *KAT5*

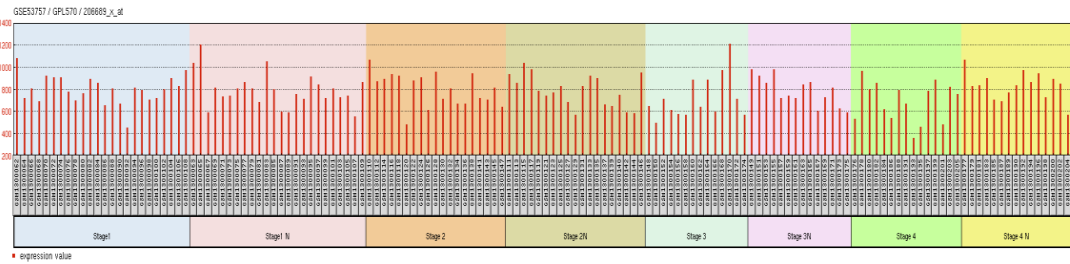


Şekil-30 GSE40435 kodlu çalışmada A) *VHL* B) *HIF1A* ve C) *KAT5* genlerinin ifade değerleri

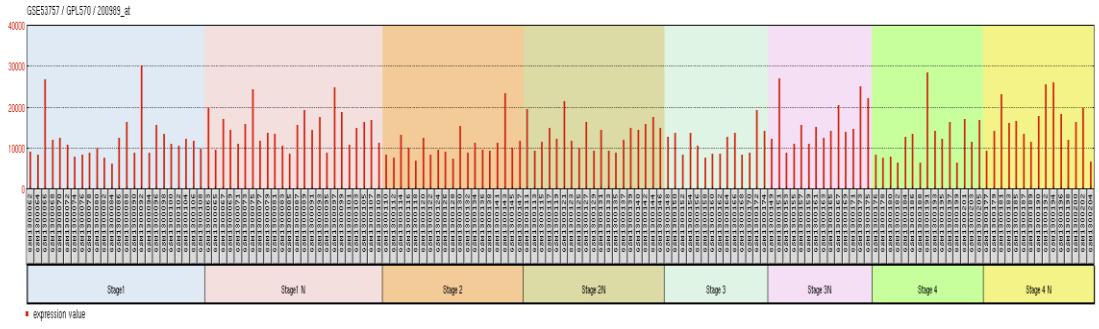
Yapılan anova analizleri sonucu, *VHL*;  $p= 0.00$ , *HIF1A*;  $p= 0.04$ , *KAT5*;  $p= 0.76$  olarak hesaplanmıştır.  $p<0.05$  değeri *VHL* ve *HIF1A* geninde anlamlı bulunmuştur. Gen ifade seviyeleri bakımından *VHL* ve *HIF1A* hastalığın evreleri arasında anlamlı bir fark göstermektedir. Ancak bu çalışmada verilerin logFC değerleri paylaşılmadığı için gen ifadelerinin her derecedeki değişimi hesaplanamamaktadır.

GSE53757 kodlu çalışma kapsamında 144 hastanın tümör ve normal dokusu analiz edilmiştir. 104 hasta, hastalık evrelerine dayalı fark olup olmadığı karşılaştırılmıştır. BHTRHK'da 1-4 evreleri arasında hastalar arasındaki gen ifade farklılıkları hesaplanmıştır (Şekil-31).

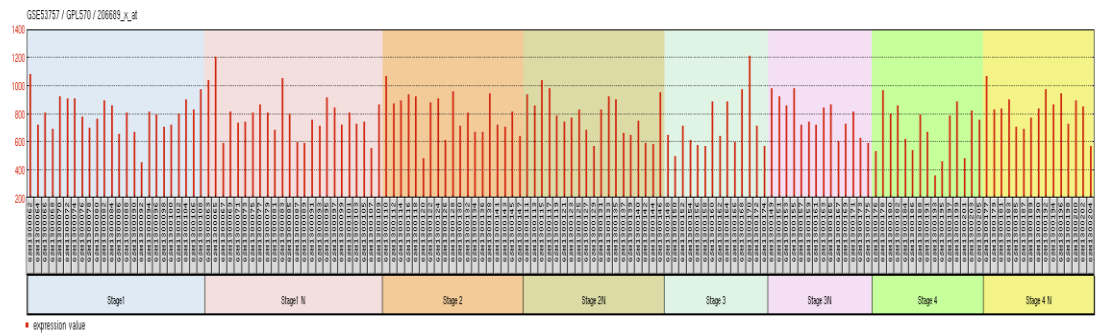
### A) *VHL*



## B) *HIF1A*



## C) *KAT5*

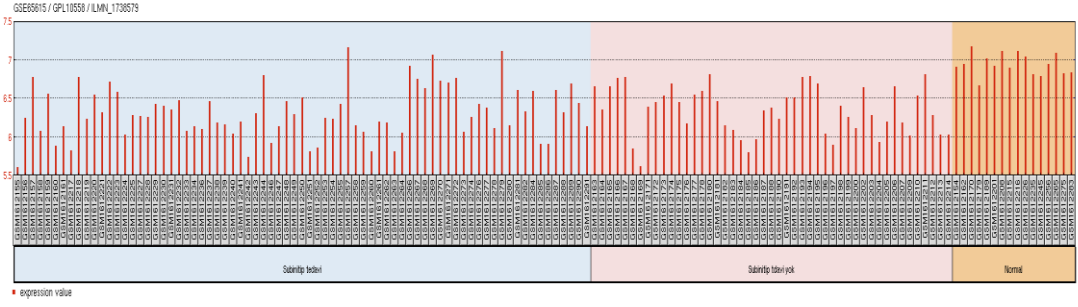


**Şekil-31 GSE53757 kodlu çalışmada A) *VHL* B) *HIF1A* ve C) *KAT5* genlerinin ifade değerleri**

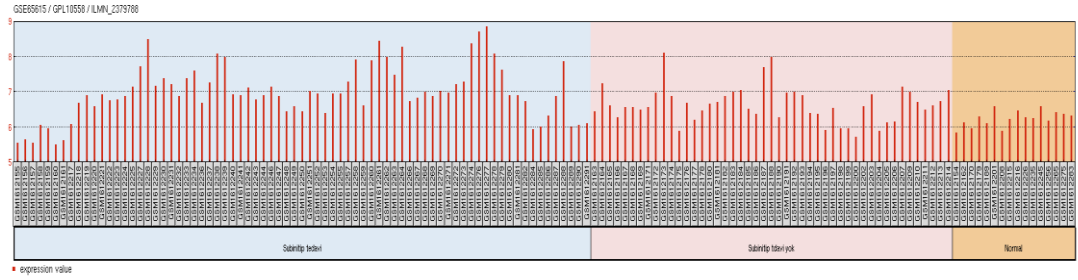
Yapılan anova analizleri sonucu *VHL*;  $p= 0.08$ , *HIF1A*;  $p= 0.00$ , *KAT5*;  $p= 0.09$  olarak hesaplandı. Gen ifadesi bakımından *HIF1A* hastalığın evreleri arasında anlamlı bir fark göstermektedir. Ancak bu çalışmada verilerin logFC değerleri paylaşılmadığı için gen ifadelerinin evrelere göre gen ifade kat sayı değişimi hesaplanamamaktadır.

GSE65615 kodlu çalışma kapsamında 138 hasta analiz edilmiştir. 138 hastada normal böbrek dokusu, BHTRHK'da Sunitinib tedavisinde olumlu cevap veren / vermeyen hastalar arasındaki fark karşılaştırılmıştır (Şekil 32).

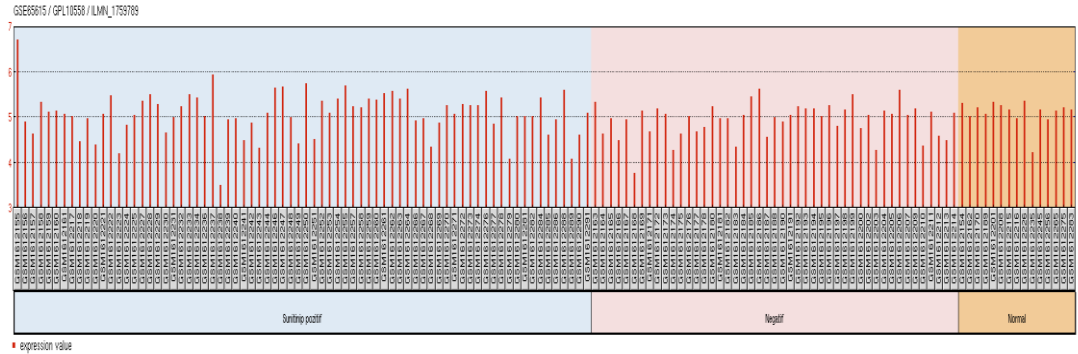
### A) *VHL*



### B) *HIF1A*



### C) *KAT5*



**Şekil-32 GSE65615 kodlu çalışmada A) *VHL* B) *HIF1A* ve C) *KAT5* genlerinin ifade değerleri**

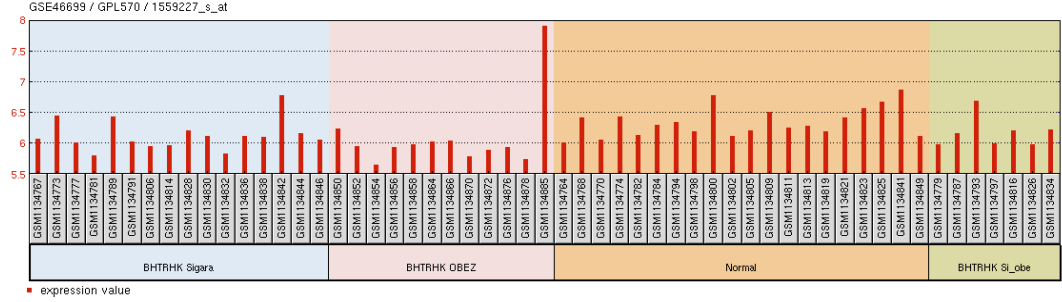
Yapılan t-testi analizleri sonucu Sunitinib'e yanıt veren ve vermeyen hasta grupları arasında *VHL*;  $p= 0.03$ , *HIF1A*;  $p= 0.05$ , *KAT5*;  $p= 0.14$  olarak hesaplanmıştır. Gen ifadesi bakımından *VHL* geni için tedaviye yanıt verenler vermeyenlere göre -3.22 kat az seviyede ifade edilmektedir. *HIF1A* geni için ise, bu kat -2.67 olarak hesaplanmıştır. Sunitinib tedavisine yanıt veren hasta gruplarında *HIF1A* ve *VHL* gen ifadesi yanıt vermeyen gruba göre daha düşüktür.

GSE46699 kodlu çalışma kapsamında 130 hasta analiz edilmiştir. 130 hasta BHTRHK içerisinde obez, sigara tüketen ve hem sigara tüketen hem de obez olan grup

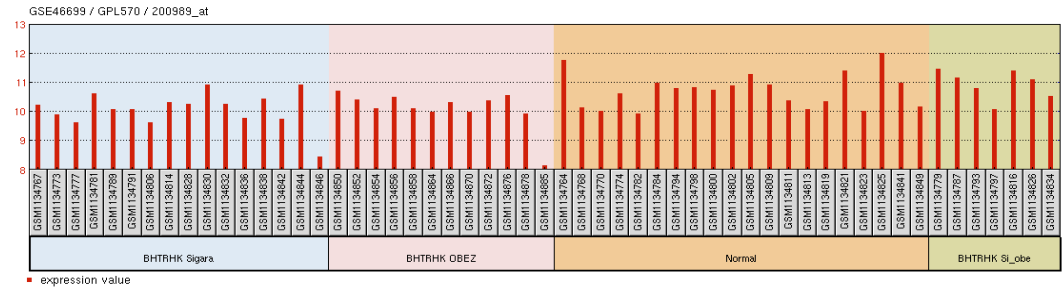


olarak üçe ayrılmıştır (Şekil 33). Aşağıda verilen grafikler de toplam hasta sayısının yarısı örneklem alınarak çizilmiştir. İstatistiksel analizler tüm hastalar dahil edilerek yapılmıştır.

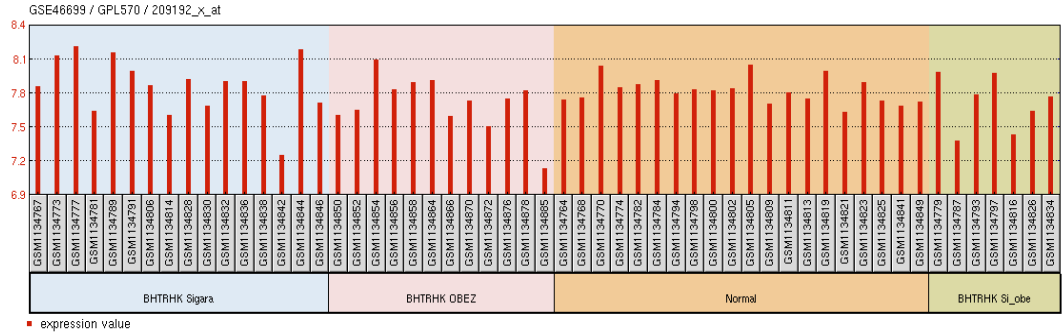
### A) *VHL*



### B) *HIF1A*



### C) *KAT5*



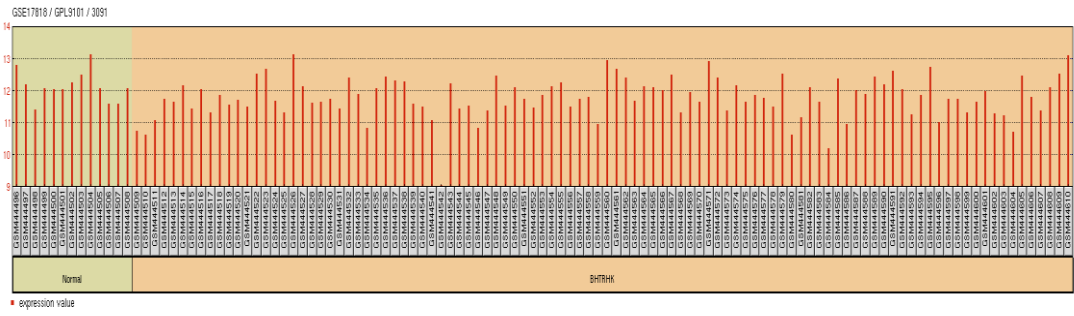
Şekil-33 GSE46699 kodlu çalışmada A) *VHL* B) *HIF1A* ve C) *KAT5* genlerinin ifade değerleri

Yapılan t-testi analizleri sonucunda; obez olan ile sigara tüketen BHTRHK hasta grupları arasında *VHL*;  $p=0.00$ , *HIF1A*;  $p=0.32$ , *KAT5*;  $p=0.03$  olarak hesaplanmıştır.  $p<0.05$  *VHL* ve *KAT5* geninde anlamlı bulunmuştur. Gen ifade bakımından *VHL* geni için sigara tüketen hasta grubu obez grubuna göre -5.88 kat daha

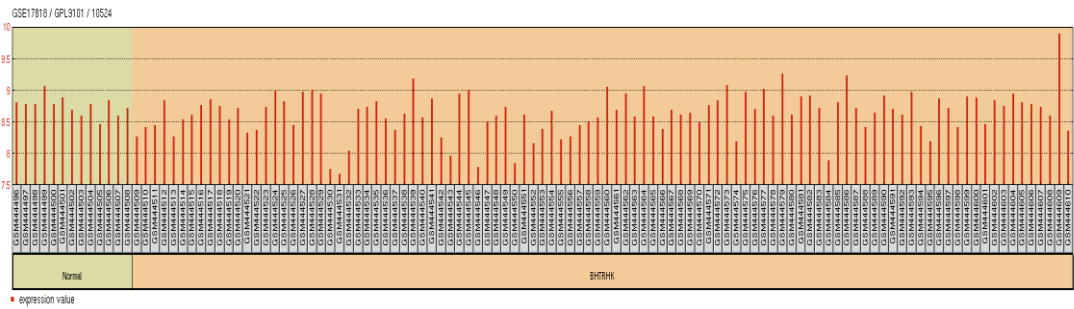
az seviyede ifade edilmektedir. *KAT5* geni için ise, bu kat 3.40 olarak hesaplanmıştır. Sigara tüketen hastalarda *VHL* ifadesi obez hastalara göre düşerken *KAT5* seviyesi artmıştır. Obez ve sigara tüketen hasta grubu ile yalnızca sigara tüketen grup karşılaştırması yapıldığında *VHL*;  $p= 0.29$ , *HIF1A*;  $p= 0.07$ , *KAT5*;  $p= 0.15$  olarak hesaplanmıştır.  $p<0.05$  koşulu bu karşılaştırmada sağlanamamıştır. Obez ve sigara tüketen hasta grubu ile yalnızca obez grup karşılaştırması yapıldığında *VHL*;  $p= 0.00$ , *HIF1A*;  $p= 0.11$ , *KAT5*;  $p= 0.57$  olarak hesaplanmıştır.  $p<0.05$  koşulu sadece *VHL* geninde tespit edilmiştir. Yalnızca obez hastalarda obez ve sigara tüketen hasta grubuna göre *VHL* seviyesi 4.01 kat artmaktadır.

GSE17818 kodlu çalışma kapsamında 115 hasta analiz edilmiştir. BHTRHK hastaları ile normal böbrek dokusu arasında *HIF1A* ve *KAT5* gen ifade seviyeleri bakımından karşılaştırılması yapıldı (Şekil 34).

#### A) *HIF1A*



#### B) *KAT5*



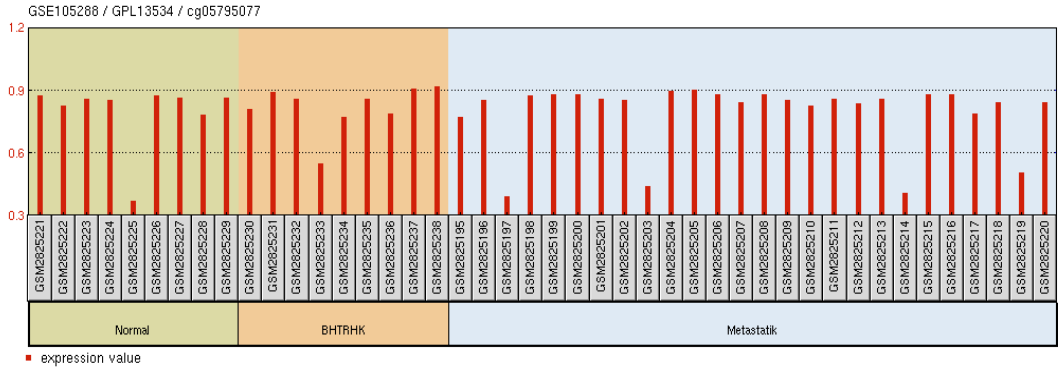
**Şekil-34 GSE17818 kodlu çalışmada A) *HIF1A* ve B) *KAT5* genlerinin ifade değerleri**

Yapılan t-testi analizleri sonucu BHTRHK hastaları ile normal böbrek doku örnekleri arasında *HIF1A*;  $p= 0.05$ , *KAT5*;  $p= 0.24$  olarak hesaplanmıştır.  $p<0.05$

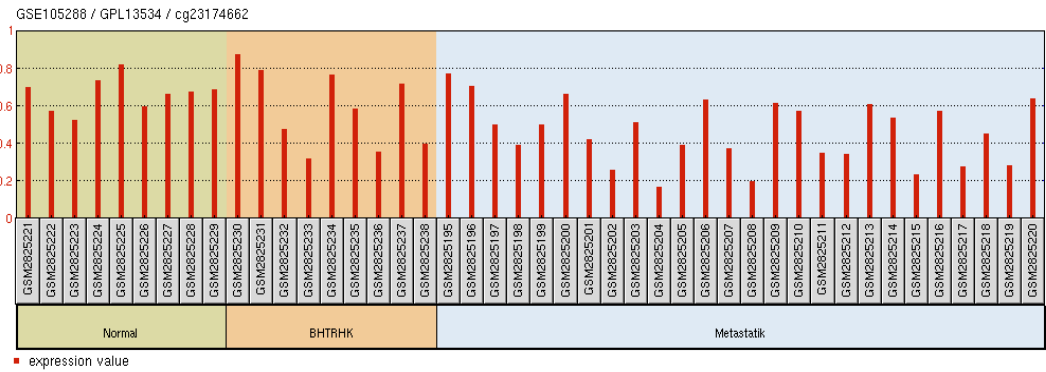
koşulu *HIF1A* geninde istatistiksel olarak anlamlı bulundu. BHTRHK hastalarında normal böbrek dokusuna göre *HIF1A* seviyesi 2.84 kat artış göstermektedir. Çalışma kapsamında *VHL* geni ile ilgili veri verilmemesi nedeniyle *VHL* genine ait gen ifade değişiklikleri hesaplanamamıştır.

GSE105288 kodlu çalışma kapsamında 88 hasta analiz edilmiştir. BHTRHK hastaları, metastatik BHTRHK hastaları ve normal böbrek dokusu arasında fark olup olmadığı karşılaştırılmıştır (Şekil 35). Aşağıda verilen grafikler de toplam hasta sayısının yarısı örneklem alınarak çizilmiştir. İstatistiksel analizler tüm hastalar dahil edilerek yapılmıştır.

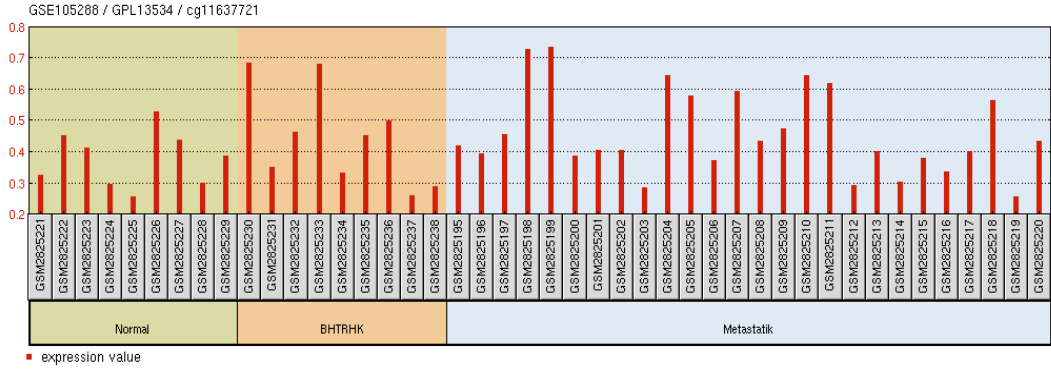
### A) *VHL*



### B) *HIF1A*



### C) *KAT5*



**Şekil-35 GSE105288 kodlu çalışmada A) *VHL* B) *HIF1A* ve C) *KAT5* genlerinin ifade değerleri**

Yapılan t-testi analizleri sonucunda; primer ile metastatik BHTRHK hastaları arasında *VHL*;  $p= 0.01$ , *HIF1A*;  $p= 0.08$ , *KAT5*;  $p= 0.01$  olarak hesaplanmıştır.  $p<0.05$  koşulu *VHL* ve *KAT5* genlerinde sağlanmaktadır. *VHL* gen ifadesi için BHTRHK grubu metastatik BHTRHK grubuna göre -3.13 kat azalma göstermektedir. *KAT5* gen ifadesi için ise metastatik gruba göre 5.11 kat artışı göstermektedir. Metastatik BHTRHK hastaları ile normal böbrek doku örnekleri arasında *VHL*;  $p= 0.01$ , *HIF1A*;  $p= 0.05$ , *KAT5*;  $p= 0.01$  olarak hesaplanmıştır.  $p<0.05$  koşulu tüm genlerde anlamlı bulunmuştur. Metastatik BHTRHK hastalarında normal böbrek dokusuna göre *VHL* geninde -3,13 kat azalma görülmektedir. *HIF1A* seviyesi 3,68 kat artış göstermektedir. *KAT5* seviyesi ise 5.11 kat artmıştır. GSE19949 nolu çalışma sonucunda primer ve metastatik BHTRHK hasta grupları arasında *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5* gen ifadesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ancak, GSE105288 nolu çalışmada primer ile metastatik BHTRHK hastaları arasında bu genlerin ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

#### 4.2. *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5* genlerini hedef alan miRNA'ların tespit edilmesi

**Tablo-38 *VHL* genini hedef alan miRNA'lar**

miRNA	UTR Bölgesindeki Bağlanma Yeri	Eşleşme Alanı	Eşleşme Skor Yüzdesi
miR-223	146-152	7mer-m8	91
hsa-miR-211-5p	631-638	8mer	98
hsa-miR-204-5p	631-638	8mer	98
hsa-miR-5590-3p	1657-1664	8mer	96
hsa-miR-142-5p	1657-1664	8mer	96
hsa-miR-340-5p	1658-1665	8mer	96
hsa-miR-21-5p	1689-1695	7mer-m8	91
hsa-miR-590-5p	1689-1695	7mer-m8	91
hsa-miR-101-3p.1	3506-3512	7mer-m8	95
hsa-miR-181a-5p	3585-3592	8mer	95
hsa-miR-181b-5p	3585-3592	8mer	95
hsa-miR-181c-5p	3585-3592	8mer	95
hsa-miR-181d-5p	3585-3592	8mer	95
hsa-miR-4262	3585-3592	8mer	91
hsa-miR-374c-5p	3589-3596	8mer	89
hsa-miR-655-3p	3589-3596	8mer	88
hsa-miR-29c-3p	3684-3690	7mer-m8	97
hsa-miR-29a-3p	3684-3690	7mer-m8	97
hsa-miR-29b-3p	3684-3690	7mer-m8	97
hsa-miR-329-3p	3710-3716	7mer-m8	98
hsa-miR-362-3p	3710-3716	7mer-m8	97

**Tablo-39 HIF1A genini hedef alan miRNA'lar**

miRNA	UTR Bölgesindeki Bağlanma Yeri	Eşleşme Alanı	Eşleşme Skor Yüzdesi	miRNA	UTR Bölgesindeki Bağlanma Yeri	Eşleşme Alanı	Eşleşme Skor Yüzdesi
miR-138	632-638	7mer-1A	91	hsa-miR-448	813-819	7mer-m8	87
hsa-miR-199b-5p	177-183	7mer-m8	91	hsa-miR-219a-2-3p	861-867	7mer-1A	75
hsa-miR-151a-3p	201-207	7mer-m8	91	hsa-miR-494-3p	881-887	7mer-m8	82
hsa-miR-186-5p	322-328	7mer-1A	59	hsa-miR-20a-5p	1104-1110	7mer-m8	96
hsa-miR-6807-3p	385-391	7mer-1A	90	hsa-miR-20b-5p	1104-1110	7mer-m8	96
hsa-miR-217	385-391	7mer-1A	88	hsa-miR-106b-5p	1104-1110	7mer-m8	95
hsa-miR-18b-5p	409-415	7mer-m8	99	hsa-miR-106a-5p	1104-1110	7mer-m8	95
hsa-miR-18a-5p	409-415	7mer-m8	99	hsa-miR-17-5p	1104-1110	7mer-m8	95
hsa-miR-4735-3p	409-415	7mer-m8	99	hsa-miR-93-5p	1104-1110	7mer-m8	95
hsa-miR-488-3p	506-512	7mer-m8	93	hsa-miR-526b-3p	1104-1110	7mer-m8	94
hsa-miR-433-3p	512-518	7mer-m8	83	hsa-miR-519d-3p	1104-1110	7mer-m8	94
hsa-miR-330-3p	576-582	7mer-m8	61	hsa-miR-155-5p	1166-1172	7mer-m8	90
hsa-miR-19b-3p	606-612	7mer-1A	84	hsa-miR-542-3p	1190-1196	7mer-1A	87
hsa-miR-19a-3p	606-612	7mer-1A	84	hsa-miR-493-5p	1225-1231	7mer-1A	73
hsa-miR-340-5p	663-669	7mer-1A	51	hsa-miR-142-3p.2	1267-1274	8mer	95
hsa-miR-376a-3p	701-707	7mer-1A	76	hsa-miR-582-5p	1273-1279	7mer-m8	89
hsa-miR-376b-3p	701-707	7mer-1A	75	hsa-miR-495-3p	1284-1290	7mer-1A	63
hsa-miR-135b-5p	789-795	7mer-m8	94	hsa-miR-5688	1284-1290	7mer-1A	62
hsa-miR-135a-5p	789-795	7mer-m8	93	hsa-miR-194-5p	1286-1292	7mer-1A	87

**Tablo-40 KAT5 genini hedef alan miRNA'lar**

miRNA	UTR Bölgesindeki Bağlanma Yeri	Eşleşme Alanı	Eşleşme Skor Yüzdesi
miR-22	249-255	7mer-m8	94
hsa-miR-137	400-406	7mer-1A	80

BHCHK'da yapılan in-silico biyoinformatik analizler sonucu belirlediğimiz *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5* gen ifadeler hastalara ait klinik parametreler ile karşılaştırıldığında gen ifadelerinin farklı seviyelerde olduğu tespit edildi. Gen ifadelerinde düzenleyici görev yapan miRNA'lar karsinogenez sürecinde etkin görevler üstlenmektedirler. Bu bilgiler ışığında; belirlenen aday genlerin baz dizileri TargetScan Human ve miRTargetLink Human veri tabanlarında analiz edilerek belirlediğimiz aday genleri hedef alan ve gen ifadesinde etkili olan miRNA'lar tespit edildi (Tablo 38-40). Yapılan analizde eşleşme skoru yüksek olan miRNA'lar hedef alınmıştır. *VHL* geninde miR-223, *HIF1A* geninde miR-138 ve *KAT5* geni için miR-22 seçildi.

Global veri bankalarından elde edilen tüm ön bulgular bu çalışma kapsamında 100 BHTRK hastasında değerlendirilerek validasyonu gerçekleştirildi.

### 4.3. Klinik Validasyon Çalışması

Tez çalışması dahilinde histo patolojik analizler ile BHTRHK tanısı alan yüz adet hastanın parafinize edilmiş tümör ve normal doku bloklarına ait örnekler kullanıldı. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş dağılımı 34 – 88 arasında olup ortalaması  $60 \pm 1.17$  'dir. Hastalara ait tüm klinik parametreler Tablo 41'de verildi.

**Tablo-41 Hastalara ait klinik ve histopatolojik özellikler**

Hasta Yaşı	Ortalaması 60 ( $\pm 1,17$ )	En Düşük- Yüksek Değer 34 - 88
<b>Cinsiyet</b>	<b>Sayı</b>	<b>Yüzde (%)</b>
Kadın	41	41
Erkek	59	59
<b>Fuhrman Grade</b>		
1	10	10
2	34	34
3	47	47
4	9	9
<b>Patolojik Tümör Evresi</b>		
pT1a	23	29,9
pT1b	22	28,6
pT2	18	23,4
pT3a	4	18,2
<b>Büyüme Paterni</b>		
Alveoler	90	90
Papiller	2	2
Solid	5	5
Multikistik	2	2
Multioküler	1	1
<b>Renal Kapsül İnvazyonu</b>		
Pozitif	46	46,9
Negatif	52	53,1
<b>Perirenal Yağ Doku İnvazyonu</b>		
Pozitif	15	15,3
Negatif	83	84,7

**Tablo-41'in devamı**

<b>Renal Ven İnvazyonu</b>		
Pozitif	7	7,4
Negatif	87	92,6
<b>Tümör Dışı Böbrek</b>		
Pozitif	7	7,1
Negatif	74	74,7
Kalsifikasyon	1	1
Tübüler Atrofi	3	3
Renal Kist	11	11,1
Papiller Adenom	1	1
Fibrozis	1	1
Kronik Enflamasyon	1	1
<b>CK7</b>		
Pozitif	4	7,4
Negatif	50	92,6
<b>Vimentin</b>		
Pozitif	83	98,8
Negatif	1	1,2
<b>EMA</b>		
Pozitif	71	95,9
Negatif	3	4,1
<b>CD10</b>		
Pozitif	70	95,9
Negatif	3	4,1
<b>RCC</b>		
Pozitif	27	84,4
Negatif	5	15,6
<b>LMWCK</b>		
Pozitif	41	54,7
Negatif	34	45,3
<b>CK19</b>		
Pozitif	17	65,4
Negatif	9	34,6
<b>Masson Trikrom</b>		
Pozitif	10	40
Negatif	15	60
<b>PAS</b>		
Pozitif	8	30,8
Negatif	18	69,2
<b>Kongo Red</b>		
Pozitif	76	76
Negatif	24	24



**Tablo-41'in devamı**

<b>PASIM</b>		
Pozitif	1	4,5
Negatif	21	95,5
<b>Cerrahi İşlem</b>		
Sağ Nefrektomi	11	11,5
Sağ Parsiyel Nefrektomi	6	6,3
Sağ Radikal Nefrektomi	40	41,7
Sol Parsiyel Nefrektomi	9	9,4
Parsiyel Nefrektomi	5	5,2
Sol Nefrektomi	14	14,6
Radikal Nefrektomi	2	2,1
Laporoskopik Sağ Radikal Nefrektomi	4	4,2
Nefrektomi	3	3,1
Laoroskobik Sol Nefrektomi	1	1
Sol Radikal Nefrektomi	1	1

BHTRHK gelişiminden sorumlu olduğu bilinen *VHL* geni ve biyoinformatik analizler ile tanıda aday olarak belirlenen *HIF1A* ve *KAT5* genleri Real time PCR metodu ile kullanılarak mRNA düzeyindeki ifadeleri 100 hastada analiz edildi. Yapılan  $2^{-\Delta\Delta CT}$  analizinde GAPDH housekeeping gen olarak kullanıldı. Analiz sonucunda 100 hastada *VHL* geninin ifadesi -0,39 kat ( $p=0,4419$ ) azalma gösterirken *HIF1A* 1,23 kat ( $p=0,0402$ ), *KAT5* ise 1,88 kat ( $p=0,001$ ) artış göstermektedir (Tablo 42). Elde edilen nicel veriler ile sıcaklık haritalaması analizi yapıldı (Şekil 36).

**Tablo-42 VHL, HIF1A ve KAT5 gen ifadelerinin Delta CT analiz değerleri**

Hasta No	GAPDH	VHL	HIF1A	KAT5	$\Delta$ CT VHL	$\Delta$ CT HIF1A	$\Delta$ CT KAT5	Ortalama $\Delta$ CT VHL	Ortalama $\Delta$ CT HIF1A	Ortalama $\Delta$ CT KAT5	$2^{\Delta\Delta$ CT VHL	$2^{\Delta\Delta$ CT HIF1A	$2^{\Delta\Delta$ CT KAT5	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT VHL)	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT HIF1A)	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT KAT5)
1 T	34,10	35,00	23,92	28,88	0,90	-10,18	-5,21	-2,99	-9,58	-7,19	7,93	765,39	146,34	2,99	9,58	7,19
1 N	33,67	35,00	25,45	29,94	1,33	-8,22	-3,74	-2,56	-7,62	-5,72						
2 T	33,14	35,00	28,84	30,03	1,86	-4,30	-3,11	-2,03	-3,70	-5,09	4,09	13,03	34,03	2,03	3,70	5,09
2 N	32,62	35,00	25,21	28,99	2,38	-7,42	-3,64	-1,51	-6,82	-5,62						
3 T	29,20	35,00	23,93	25,72	5,80	-5,27	-3,48	1,91	-4,67	-5,46	0,27	25,46	44,00	-1,91	4,67	5,46
3 N	34,19	35,00	26,59	29,46	0,81	-7,60	-4,72	-3,08	-7,00	-6,70						
4 T	32,62	35,00	28,18	31,55	2,38	-4,45	-1,07	-1,51	-3,85	-3,05	2,86	14,40	8,30	1,51	3,85	3,05
4 N	33,26	35,00	26,64	29,40	1,74	-6,62	-3,86	-2,15	-6,02	-5,84						
5 T	30,15	35,00	26,19	25,85	4,85	-3,96	-4,30	0,96	-3,36	-6,28	0,51	10,29	77,74	-0,96	3,36	6,28
5 N	36,61	35,00	26,76	28,87	-1,61	-9,85	-7,74	-5,50	-9,25	-9,72						
6 T	32,71	35,00	35,76	25,51	2,29	3,05	-7,19	-1,60	3,65	-9,17	3,03	0,08	577,40	1,60	-3,65	9,17
6 N	33,71	35,00	25,68	28,48	1,29	-8,03	-5,23	-2,60	-7,43	-7,21						
7 T	36,76	35,00	28,80	28,89	-1,76	-7,96	-7,86	-5,65	-7,36	-9,84	50,17	164,16	918,91	5,65	7,36	9,84
7 N	35,00	35,00	29,33	30,54	0,00	-5,67	-4,46	-3,89	-5,07	-6,44						
8 T	35,91	35,00	27,80	27,68	-0,91	-8,11	-8,22	-4,80	-7,51	-10,20	27,83	181,95	1179,13	4,80	7,51	10,20
8 N	35,00	35,00	28,71	31,80	0,00	-6,29	-3,20	-3,89	-5,69	-5,18						
9 T	32,88	35,00	27,18	32,66	2,12	-5,70	-0,22	-1,77	-5,10	-2,20	3,41	34,39	4,58	1,77	5,10	2,20
9 N	30,88	35,00	35,59	39,00	4,12	4,71	8,12	0,23	5,31	6,14						
10 T	35,98	35,00	24,65	28,49	-0,98	-11,33	-7,50	-4,87	-10,73	-9,48	29,29	1700,56	712,71	4,87	10,73	9,48
10 N	32,50	35,00	30,78	33,88	2,50	-1,72	1,39	-1,39	-1,12	-0,59						

**Tablo-42'nin devamı**

Hasta No	<i>GAPDH</i>	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	$\Delta CT$ <i>VHL</i>	$\Delta CT$ <i>HIF1A</i>	$\Delta CT$ <i>KAT5</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>VHL</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>HIF1A</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>KAT5</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i>	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i> )
11 T	31,46	35	26,98	29,98	3,54	-4,48	-1,48	-0,35	-3,88	-3,46	1,28	14,74	11,04	0,35	3,88	3,46
11 N	30,66	36,33	32,52	37,07	5,67	1,85	6,41	1,78	2,45	4,43						
12 T	28,46	35	25,9	26,96	6,54	-2,57	-1,5	2,65	-1,97	-3,48	0,16	3,9	11,14	-2,65	1,97	3,48
12 N	32,91	35	32,42	35,69	2,09	-0,48	2,78	-1,8	0,12	0,8						
13 T	27,39	36,99	25,83	28,12	9,6	-1,56	0,72	5,71	-0,96	-1,26	0,02	1,95	2,39	-5,71	0,96	1,26
13 N	28,41	35	36,38	39	6,59	7,98	10,59	2,7	8,58	8,61						
14 T	29,07	35	25,89	28,49	5,93	-3,19	-0,58	2,04	-2,59	-2,56	0,24	6,02	5,91	-2,04	2,59	2,56
14 N	26,87	35	24,29	28,62	8,13	-2,57	1,75	4,24	-1,97	-0,23						
15 T	34	35	29,86	30,84	1	-4,14	-3,16	-2,89	-3,54	-5,14	7,43	11,66	35,22	2,89	3,54	5,14
15 N	30,98	35	30,71	32,62	4,02	-0,27	1,64	0,13	0,33	-0,34						
16 T	28,12	35,83	28,98	29,43	7,7	0,86	1,31	3,81	1,46	-0,67	0,07	0,36	1,59	-3,81	-1,46	0,67
16 N	29,78	35,56	35,67	37,15	5,78	5,89	7,37	1,89	6,49	5,39						
17 T	28,84	35	30,98	31,37	6,16	2,14	2,52	2,27	2,74	0,54	0,21	0,15	0,69	-2,27	-2,74	-0,54
17 N	28,82	34,65	33,92	33,91	5,82	5,1	5,08	1,93	5,7	3,1						
18 T	26,69	34,75	29,41	29,69	8,06	2,72	3,01	4,17	3,32	1,03	0,06	0,1	0,49	-4,17	-3,32	-1,03
18 N	26,94	35,27	30,1	29,83	8,33	3,16	2,9	4,44	3,76	0,92						
19 T	30,41	35	28,41	30,99	4,59	-2	0,58	0,7	-1,4	-1,4	0,61	2,64	2,64	-0,7	1,4	1,4
19 N	29,16	35	27,57	28,74	5,84	-1,59	-0,42	1,95	-0,99	-2,4						
20 T	27,7	35	28,82	28,69	7,3	1,12	0,99	3,41	1,72	-0,99	0,09	0,3	1,99	-3,41	-1,72	0,99
20 N	31,93	37,09	35,93	36,61	5,17	4	4,68	1,28	4,6	2,7						

**Tablo-42'nin devamı**

Hasta No	<i>GAPDH</i>	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	$\Delta$ CT <i>VHL</i>	$\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	$\Delta$ CT <i>KAT5</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>VHL</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>KAT5</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>VHL</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>KAT5</i>	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>VHL</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>HIF1A</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>KAT5</i> )
21 T	36,93	35	34,81	31,52	-1,93	-2,12	-5,41	-5,82	-1,52	-7,39	56,46	2,87	167,21	5,82	1,52	7,39
21 N	36,84	35	34,97	30,62	-1,84	-1,87	-6,22	-5,73	-1,27	-8,2						
22 T	31,97	35,36	27,84	30,73	3,39	-4,13	-1,24	-0,5	-3,53	-3,22	1,42	11,57	9,35	0,5	3,53	3,22
22 N	35,67	35	37,13	37,24	-0,67	1,47	1,58	-4,56	2,07	-0,4						
23 T	27,81	35	27,32	29,34	7,19	-0,49	1,53	3,3	0,11	-0,45	0,1	0,92	1,36	-3,3	-0,11	0,45
23 N	31,61	35,42	31,51	35,4	3,81	-0,1	3,78	-0,08	0,5	1,8						
24 T	27,83	35	24,9	27,23	7,17	-2,93	-0,6	3,28	-2,33	-2,58	0,1	5,03	5,97	-3,28	2,33	2,58
24 N	30,23	35	30,5	32,81	4,77	0,27	2,58	0,88	0,87	0,6						
25 T	35,26	35	31,87	29,43	-0,26	-3,4	-5,84	-4,15	-2,8	-7,82	17,81	6,95	225,54	4,15	2,8	7,82
25 N	36,18	35	34,89	31,23	-1,18	-1,29	-4,95	-5,07	-0,69	-6,93						
26 T	26,49	35	29,16	26,61	8,51	2,67	0,12	4,62	3,27	-1,86	0,04	0,1	3,62	-4,62	-3,27	1,86
26 N	34,96	35	39	37,1	0,04	4,04	2,13	-3,85	4,64	0,15						
27 T	26,92	35	25,83	28,45	8,08	-1,09	1,52	4,19	-0,49	-0,46	0,05	1,4	1,37	-4,19	0,49	0,46
27 N	29,69	36,72	39	39	7,03	9,31	9,31	3,14	9,91	7,33						
28 T	25,73	35,66	26,41	28,25	9,93	0,67	2,52	6,04	1,27	0,54	0,02	0,41	0,69	-6,04	-1,27	-0,54
28 N	26,64	34,94	30,21	32,8	8,3	3,57	6,16	4,41	4,17	4,18						
29 T	30,12	35	25,34	27,62	4,88	-4,78	-2,5	0,99	-4,18	-4,48	0,5	18,17	22,3	-0,99	4,18	4,48
29 N	28,72	36,37	23,96	28,71	7,65	-4,76	-0,01	3,76	-4,16	-1,99						
30 T	32,35	35	28,63	31,44	2,65	-3,72	-0,91	-1,24	-3,12	-2,89	2,35	8,69	7,41	1,24	3,12	2,89
30 N	36,92	35	32,37	39	-1,92	-4,55	2,08	-5,81	-3,95	0,1						

**Tablo-42'nin devamı**

Hasta No	<i>GAPDH</i>	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	$\Delta$ CT <i>VHL</i>	$\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	$\Delta$ CT <i>KAT5</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>VHL</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>KAT5</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>VHL</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>KAT5</i>	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>VHL</i> )	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>HIF1A</i> )	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>KAT5</i> )
31 T	27,93	34,62	25,27	28,3	6,68	-2,67	0,37	2,79	-2,07	-1,61	0,14	4,19	3,05	-2,79	2,07	1,61
31 N	27,1	35	23,35	27,27	7,9	-3,75	0,16	4,01	-3,15	-1,82						
32 T	25,43	35	23,88	25,6	9,57	-1,55	0,17	5,68	-0,95	-1,81	0,02	1,94	3,51	-5,68	0,95	1,81
32 N	23,36	37,01	27,58	30,93	13,66	4,22	7,57	9,77	4,82	5,59						
33 T	31,62	35,08	24,47	29,42	3,46	-7,16	-2,2	-0,43	-6,56	-4,18	1,35	94,14	18,15	0,43	6,56	4,18
33 N	27,01	35	27,94	33,69	7,99	0,93	6,67	4,1	1,53	4,69						
34 T	36,91	35	29,65	34,06	-1,91	-7,26	-2,85	-5,8	-6,66	-4,83	55,79	101,19	28,53	5,8	6,66	4,83
34 N	36,49	35	35,69	39	-1,49	-0,8	2,51	-5,38	-0,2	0,53						
35 T	27,7	38,77	27,36	27,82	11,07	-0,33	0,12	7,18	0,27	-1,86	0,01	0,83	3,63	-7,18	-0,27	1,86
35 N	28,08	34,27	35,92	35,96	6,19	7,84	7,88	2,3	8,44	5,9						
36 T	28,44	36,35	24,54	26,63	7,91	-3,9	-1,8	4,02	-3,3	-3,78	0,06	9,83	13,78	-4,02	3,3	3,78
36 N	32,21	35	27,66	30,49	2,79	-4,55	-1,72	-1,1	-3,95	-3,7						
37 T	34,45	35,22	29,95	30,96	0,78	-4,5	-3,48	-3,11	-3,9	-5,46	8,66	14,92	44,12	3,11	3,9	5,46
37 N	33,34	38,85	35,61	34,9	5,51	2,27	1,56	1,62	2,87	-0,42						
38 T	26,61	33,54	25,37	26,65	6,93	-1,23	0,04	3,04	-0,63	-1,94	0,12	1,55	3,84	-3,04	0,63	1,94
38 N	26,22	35,2	28,76	30,26	8,98	2,54	4,03	5,09	3,14	2,05						
39 T	33,52	34,5	28,22	29,47	0,98	-5,29	-4,05	-2,91	-4,69	-6,03	7,51	25,89	65,12	2,91	4,69	6,03
39 N	33,08	35,17	31,03	32,75	2,09	-2,06	-0,34	-1,8	-1,46	-2,32						
40 T	27,65	35,57	26,63	26,58	7,91	-1,03	-1,07	4,02	-0,43	-3,05	0,06	1,34	8,29	-4,02	0,43	3,05
40 N	34,93	34,91	34,77	39	-0,02	-0,16	4,07	-3,91	0,44	2,09						

**Tablo-42'nin devamı**

Hasta No	<i>GAPDH</i>	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	$\Delta$ CT <i>VHL</i>	$\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	$\Delta$ CT <i>KAT5</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>VHL</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>KAT5</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>VHL</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>KAT5</i>	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>VHL</i> )	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>HIF1A</i> )	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>KAT5</i> )
41 T	27,67	34,56	25,75	27,32	6,89	-1,93	-0,36	3	-1,33	-2,34	0,13	2,51	5,05	-3	1,33	2,34
41 N	30,55	35,16	37,17	39	4,61	6,62	8,45	0,72	7,22	6,47						
42 T	31,15	35	24,97	26,55	3,85	-6,19	-4,6	-0,04	-5,59	-6,58	1,03	48,05	95,81	0,04	5,59	6,58
42 N	28,78	35	29,06	31,85	6,22	0,28	3,07	2,33	0,88	1,09						
43 T	29,36	35	24,79	29	5,64	-4,57	-0,36	1,75	-3,97	-2,34	0,3	15,66	5,05	-1,75	3,97	2,34
43 N	29,74	35	25,56	28,89	5,26	-4,17	-0,85	1,37	-3,57	-2,83						
44 T	25,61	35,32	25,38	26,82	9,71	-0,23	1,21	5,82	0,37	-0,77	0,02	0,77	1,7	-5,82	-0,37	0,77
44 N	27,45	35,96	29,65	30,95	8,52	2,2	3,51	4,63	2,8	1,53						
45 T	27	37,16	26,72	27,88	10,16	-0,28	0,88	6,27	0,32	-1,1	0,01	0,8	2,14	-6,27	-0,32	1,1
45 N	28,26	30,95	34,13	39	2,69	5,87	10,74	-1,2	6,47	8,76						
46 T	27,02	34,25	25,95	27,6	7,23	-1,07	0,58	3,34	-0,47	-1,4	0,1	1,39	2,64	-3,34	0,47	1,4
46 N	26,97	33,29	29,61	31,51	6,32	2,65	4,54	2,43	3,25	2,56						
47 T	32,03	32,64	28,52	28,86	0,61	-3,51	-3,16	-3,28	-2,91	-5,14	9,68	7,51	35,36	3,28	2,91	5,14
47 N	32,83	38,11	28,73	30,33	5,28	-4,1	-2,5	1,39	-3,5	-4,48						
48 T	27,51	34,23	27,57	27,63	6,73	0,06	0,12	2,84	0,66	-1,86	0,14	0,63	3,63	-2,84	-0,66	1,86
48 N	29,31	33,86	26,4	28,38	4,55	-2,91	-0,93	0,66	-2,31	-2,91						
49 T	27,76	35,98	25,52	27,71	8,22	-2,24	-0,06	4,33	-1,64	-2,04	0,05	3,12	4,1	-4,33	1,64	2,04
49 N	27,57	35	27,8	29,63	7,43	0,23	2,06	3,54	0,83	0,08						
50 T	35,13	35	29,65	31,83	-0,13	-5,48	-3,3	-4,02	-4,88	-5,28	16,2	29,35	38,91	4,02	4,88	5,28
50 N	34,56	35	30,26	32,58	0,44	-4,3	-1,98	-3,45	-3,7	-3,96						

**Tablo-42'nin devamı**

Hasta No	<i>GAPDH</i>	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	$\Delta CT$ <i>VHL</i>	$\Delta CT$ <i>HIF1A</i>	$\Delta CT$ <i>KAT5</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>VHL</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>HIF1A</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>KAT5</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i>	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i> )
51 T	29,43	35	26,55	26,99	5,57	-2,88	-2,45	1,68	-2,28	-4,43	0,31	4,86	21,49	-1,68	2,28	4,43
51 N	29,07	35	33,03	35,31	5,93	3,97	6,25	2,04	4,57	4,27						
52 T	30,18	35	26,64	27,32	4,82	-3,54	-2,86	0,93	-2,94	-4,84	0,52	7,65	28,6	-0,93	2,94	4,84
52 N	31,7	35	30,06	31,02	3,3	-1,63	-0,67	-0,59	-1,03	-2,65						
53 T	29,14	35	26,43	27,79	5,86	-2,71	-1,35	1,97	-2,11	-3,33	0,26	4,33	10,04	-1,97	2,11	3,33
53 N	30,83	36,76	29,03	30,57	5,93	-1,79	-0,26	2,04	-1,19	-2,24						
54 T	37,04	35	31,57	31,98	-2,04	-5,46	-5,06	-5,93	-4,86	-7,04	60,94	29,14	131,98	5,93	4,86	7,04
54 N	33,68	35	31,55	32,95	1,32	-2,12	-0,73	-2,57	-1,52	-2,71						
55 T	32,47	35	29,08	30,55	2,53	-3,39	-1,92	-1,36	-2,79	-3,9	2,57	6,92	14,97	1,36	2,79	3,9
55 N	33,68	35	28,25	29,5	1,32	-5,43	-4,18	-2,57	-4,83	-6,16						
56 T	28,55	35	26,54	28,25	6,45	-2,01	-0,3	2,56	-1,41	-2,28	0,17	2,65	4,87	-2,56	1,41	2,28
56 N	26,86	36,93	27,89	29,52	10,06	1,03	2,65	6,17	1,63	0,67						
57 T	28,74	36,97	26,83	30,8	8,23	-1,91	2,06	4,34	-1,31	0,08	0,05	2,48	0,94	-4,34	1,31	-0,08
57 N	27,54	35	36,97	37,21	7,46	9,43	9,67	3,57	10,03	7,69						
58 T	31,4	35	26,22	27,88	3,6	-5,18	-3,52	-0,29	-4,58	-5,5	1,22	23,89	45,14	0,29	4,58	5,5
58 N	27,75	35	26,13	28,39	7,25	-1,62	0,64	3,36	-1,02	-1,34						
59 T	28,23	35,01	29,6	32,67	6,78	1,37	4,44	2,89	1,97	2,46	0,14	0,26	0,18	-2,89	-1,97	-2,46
59 N	29,73	38,53	27,57	32,06	8,8	-2,17	2,33	4,91	-1,57	0,35						
60 T	25,41	37	27,15	30,88	11,59	1,73	5,47	7,7	2,33	3,49	0	0,2	0,09	-7,7	-2,33	-3,49
60 N	26,53	35	39	39	8,47	12,47	12,47	4,58	13,07	10,49						

**Tablo-42'nin devamı**

Hasta No	<i>GAPDH</i>	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	$\Delta CT$ <i>VHL</i>	$\Delta CT$ <i>HIF1A</i>	$\Delta CT$ <i>KAT5</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>VHL</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>HIF1A</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>KAT5</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i>	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i> )
61 T	24,47	35,42	26,98	32,24	10,95	2,51	7,77	7,06	3,11	5,79	0,01	0,12	0,02	-7,06	-3,11	-5,79
61 N	27,54	35	37,07	39	7,46	9,52	11,46	3,57	10,12	9,48						
62 T	36,12	35	29,58	35,65	-1,12	-6,55	-0,48	-5,01	-5,95	-2,46	32,32	61,7	5,48	5,01	5,95	2,46
62 N	31,81	35	26,6	27,93	3,19	-5,21	-3,88	-0,7	-4,61	-5,86						
63 T	34,31	35	27,21	31,71	0,69	-7,11	-2,61	-3,2	-6,51	-4,59	9,21	91,06	24,04	3,2	6,51	4,59
63 N	35,63	35	29,13	33,93	-0,63	-6,5	-1,7	-4,52	-5,9	-3,68						
64 T	34,94	35	26,62	33,8	0,06	-8,32	-1,14	-3,83	-7,72	-3,12	14,22	211,53	8,69	3,83	7,72	3,12
64 N	31,66	35,79	25,69	30,8	4,14	-5,97	-0,86	0,25	-5,37	-2,84						
65 T	26,98	34,67	24,23	29,94	7,69	-2,75	2,96	3,8	-2,15	0,98	0,07	4,43	0,51	-3,8	2,15	-0,98
65 N	27,88	35,7	25,59	30,22	7,81	-2,3	2,34	3,92	-1,7	0,36						
66 T	26,88	34,48	26,24	29,56	7,6	-0,64	2,68	3,71	-0,04	0,7	0,08	1,03	0,61	-3,71	0,04	-0,7
66 N	27,83	35,98	26,23	29,33	8,16	-1,6	1,5	4,27	-1	-0,48						
67 T	33,41	35	30,29	34,94	1,59	-3,12	1,52	-2,3	-2,52	-0,46	4,94	5,74	1,37	2,3	2,52	0,46
67 N	30,54	35	32,38	36,91	4,46	1,84	6,37	0,57	2,44	4,39						
68 T	26,63	35	33,09	36,24	8,37	6,46	9,61	4,48	7,06	7,63	0,04	0,01	0,01	-4,48	-7,06	-7,63
68 N	30,22	35	24,34	30,43	4,78	-5,89	0,21	0,89	-5,29	-1,77						
69 T	31,53	36,97	32	33,23	5,44	0,47	1,7	1,55	1,07	-0,28	0,34	0,47	1,21	-1,55	-1,07	0,28
69 N	34,44	35	26,59	29,57	0,56	-7,86	-4,87	-3,33	-7,26	-6,85						
70 T	36,93	35	39	39	-1,93	2,07	2,07	-5,82	2,67	0,09	56,43	0,16	0,94	5,82	-2,67	-0,09
70 N	35	35	34,62	37,18	0	-0,38	2,18	-3,89	0,22	0,2						



**Tablo-42'nin devamı**

Hasta No	<i>GAPDH</i>	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	$\Delta$ CT <i>VHL</i>	$\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	$\Delta$ CT <i>KAT5</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>VHL</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>KAT5</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>VHL</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>KAT5</i>	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>VHL</i> )	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>HIF1A</i> )	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>KAT5</i> )
71 T	32,07	35	37,03	33	2,93	4,96	0,93	-0,96	5,56	-1,05	1,95	0,02	2,07	0,96	-5,56	1,05
71 N	32,42	35	25,96	28,86	2,58	-6,46	-3,56	-1,31	-5,86	-5,54						
72 T	32,85	36,58	37,1	32	3,73	4,25	-0,85	-0,16	4,85	-2,83	1,12	0,03	7,09	0,16	-4,85	2,83
72 N	36,25	35	25	28,67	-1,25	-11,25	-7,58	-5,14	-10,65	-9,56						
73 T	30,6	35	39	39	4,4	8,4	8,4	0,51	9	6,42	0,7	0	0,01	-0,51	-9	-6,42
73 N	27,83	37	39	39	9,17	11,17	11,17	5,28	11,77	9,19						
74 T	33,57	35	35,34	39	1,43	1,77	5,43	-2,46	2,37	3,45	5,51	0,19	0,09	2,46	-2,37	-3,45
74 N	35,67	35	36,17	39	-0,67	0,5	3,33	-4,56	1,1	1,35						
75 T	28,56	36,37	26,5	28,68	7,82	-2,06	0,12	3,93	-1,46	-1,86	0,07	2,74	3,62	-3,93	1,46	1,86
75 N	29,06	35	35,88	37,22	5,94	6,82	8,16	2,05	7,42	6,18						
76 T	34,94	35	28,59	30,44	0,06	-6,35	-4,49	-3,83	-5,75	-6,47	14,18	53,75	88,85	3,83	5,75	6,47
76 N	33,26	35	26,76	30,76	1,74	-6,51	-2,51	-2,15	-5,91	-4,49						
77 T	35,03	35	29,15	32,42	-0,03	-5,88	-2,61	-3,92	-5,28	-4,59	15,11	38,8	24,01	3,92	5,28	4,59
77 N	35,69	35	36,58	39	-0,69	0,88	3,31	-4,58	1,48	1,33						
78 T	33,77	36,42	25,8	28,84	2,65	-7,97	-4,93	-1,24	-7,37	-6,91	2,37	165,96	120,21	1,24	7,37	6,91
78 N	34,08	35	27,95	29,78	0,92	-6,13	-4,3	-2,97	-5,53	-6,28						
79 T	33,78	35	36,76	39	1,22	2,98	5,22	-2,67	3,58	3,24	6,38	0,08	0,11	2,67	-3,58	-3,24
79 N	35,92	35	30,16	32,75	-0,92	-5,77	-3,18	-4,81	-5,17	-5,16						
80 T	35,09	35	32,83	36,57	-0,09	-2,27	1,47	-3,98	-1,67	-0,51	15,81	3,17	1,42	3,98	1,67	0,51
80 N	36,28	35	34,71	39	-1,28	-1,57	2,72	-5,17	-0,97	0,74						

**Tablo-42'nin devamı**

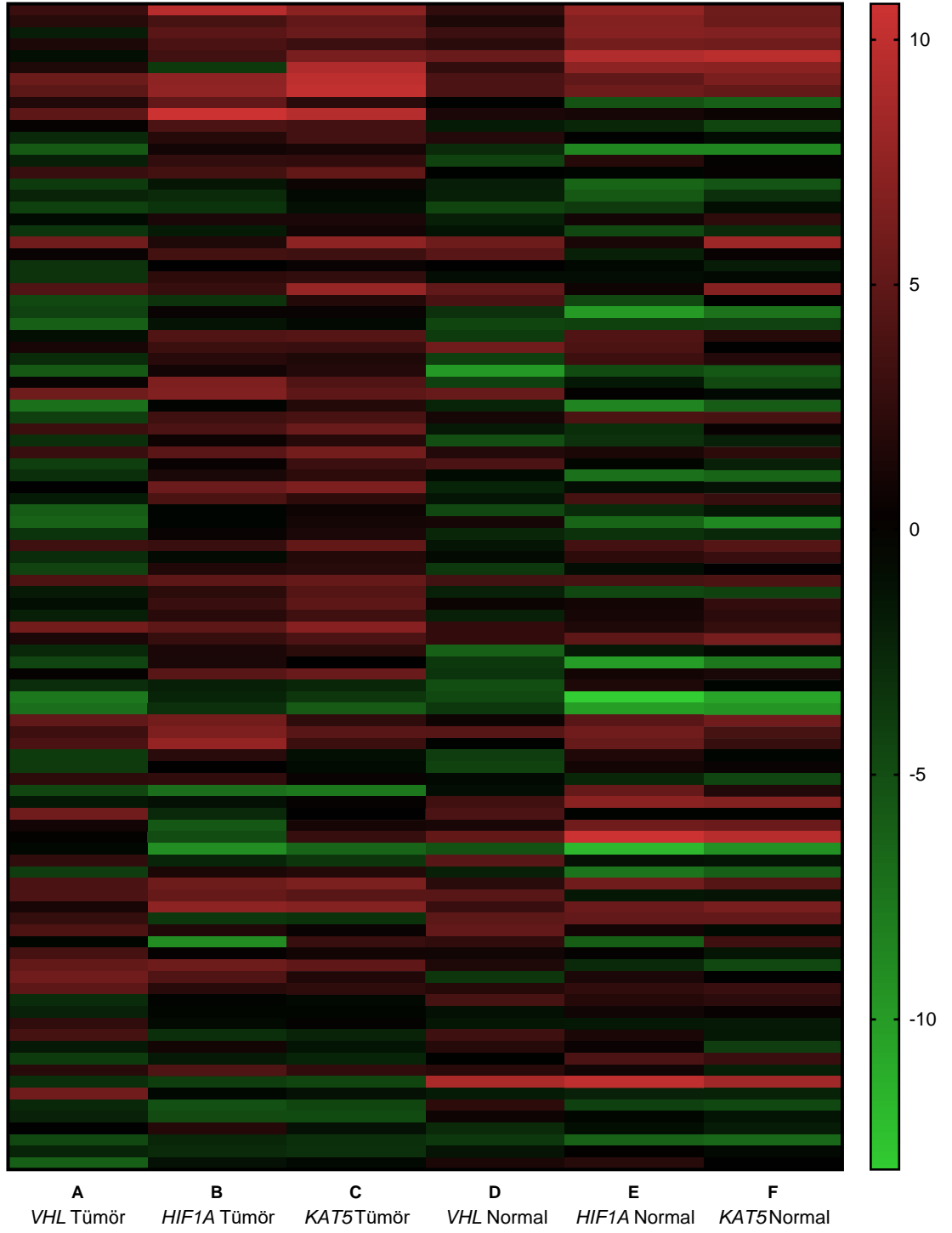
Hasta No	<i>GAPDH</i>	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	$\Delta CT$ <i>VHL</i>	$\Delta CT$ <i>HIF1A</i>	$\Delta CT$ <i>KAT5</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>VHL</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>HIF1A</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>KAT5</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i>	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i> )
81 T	30,69	35	39	29,77	4,31	8,31	-0,91	0,42	8,91	-2,89	0,75	0	7,42	-0,42	-8,91	2,89
81 N	33,59	35	39	32,23	1,41	5,41	-1,36	-2,48	6,01	-3,34						
82 T	34,68	35	33,77	35,63	0,32	-0,91	0,95	-3,57	-0,31	-1,03	11,87	1,24	2,04	3,57	0,31	1,03
82 N	32,02	35	31,19	35,42	2,98	-0,82	3,41	-0,91	-0,22	1,43						
83 T	36,3	35	29,99	33,36	-1,3	-6,32	-2,94	-5,19	-5,72	-4,92	36,59	52,53	30,34	5,19	5,72	4,92
83 N	32,64	35	34,7	39,14	2,36	2,06	6,51	-1,53	2,66	4,53						
84 T	36,94	35	32,16	37,26	-1,94	-4,78	0,32	-5,83	-4,18	-1,66	57,04	18,15	3,16	5,83	4,18	1,66
84 N	29,66	37,02	27,66	31,71	7,37	-2	2,05	3,48	-1,4	0,07						
85 T	36	35	33,35	35,53	-1	-2,65	-0,47	-4,89	-2,05	-2,45	29,69	4,15	5,46	4,89	2,05	2,45
85 N	33,01	35	29,85	32,08	1,99	-3,16	-0,93	-1,9	-2,56	-2,91						
86 T	28,28	35	27,96	30,86	6,72	-0,32	2,58	2,83	0,28	0,6	0,14	0,82	0,66	-2,83	-0,28	-0,6
86 N	34,8	35	32,31	34,53	0,2	-2,48	-0,26	-3,69	-1,88	-2,24						
87 T	28,97	35	28,79	31,38	6,03	-0,18	2,41	2,14	0,42	0,43	0,23	0,75	0,74	-2,14	-0,42	-0,43
87 N	30,07	35	28,56	31,67	4,93	-1,51	1,6	1,04	-0,91	-0,38						
88 T	33,57	35	33,64	35,33	1,43	0,07	1,75	-2,46	0,67	-0,23	5,51	0,63	1,17	2,46	-0,67	0,23
88 N	29,71	35	30,61	33,33	5,29	0,91	3,63	1,4	1,51	1,65						
89 T	34,73	35	37,11	39	0,27	2,37	4,27	-3,62	2,97	2,29	12,31	0,13	0,2	3,62	-2,97	-2,29
89 N	34,36	35	32,34	37,83	0,64	-2,02	3,47	-3,25	-1,42	1,49						
90 T	29,53	35	27,92	32,81	5,47	-1,61	3,28	1,58	-1,01	1,3	0,33	2,01	0,41	-1,58	1,01	-1,3
90 N	33,09	35	31,94	39	1,91	-1,15	5,91	-1,98	-0,55	3,93						

**Tablo-42'nin devamı**

Hasta No	<i>GAPDH</i>	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	$\Delta CT$ <i>VHL</i>	$\Delta CT$ <i>HIF1A</i>	$\Delta CT$ <i>KAT5</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>VHL</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>HIF1A</i>	Ortalama $\Delta\Delta CT$ <i>KAT5</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i>	$2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i>	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i> )	$\log_2$ ( $2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i> )
91 T	27,31	35	28,32	31,63	7,69	1,01	4,32	3,8	1,61	2,34	0,07	0,33	0,2	-3,8	-1,61	-2,34
91 N	30,93	35	26,41	29,91	4,07	-4,52	-1,02	0,18	-3,92	-3						
92 T	33,19	35	28,5	32,65	1,81	-4,69	-0,54	-2,08	-4,09	-2,52	4,23	16,98	5,73	2,08	4,09	2,52
92 N	33,19	35	31,67	37,15	1,81	-1,52	3,96	-2,08	-0,92	1,98						
93 T	28,62	35,49	31,94	35	6,87	3,32	6,38	2,98	3,92	4,4	0,13	0,07	0,05	-2,98	-3,92	-4,4
93 N	40	35	29,44	33,57	-5	-10,56	-6,43	-8,89	-9,96	-8,41						
94 T	36,93	35	36,78	40	-1,93	-0,14	3,07	-5,82	0,46	1,09	56,46	0,73	0,47	5,82	-0,46	-1,09
94 N	29,39	35	30,95	33,57	5,61	1,57	4,19	1,72	2,17	2,21						
95 T	28,61	35	33,1	35	6,39	4,5	6,39	2,5	5,1	4,41	0,18	0,03	0,05	-2,5	-5,1	-4,41
95 N	33,45	35	36,94	40	1,55	3,49	6,55	-2,34	4,09	4,57						
96 T	28,95	35	33,1	35,73	6,05	4,14	6,77	2,16	4,74	4,79	0,22	0,04	0,04	-2,16	-4,74	-4,79
96 N	31,81	35	31,6	35,09	3,19	-0,21	3,28	-0,7	0,39	1,3						
97 T	31,18	35	28,66	34,26	3,82	-2,52	3,07	-0,07	-1,92	1,09	1,05	3,79	0,47	0,07	1,92	-1,09
97 N	30,46	37,06	30,76	34,24	6,6	0,3	3,78	2,71	0,9	1,8						
98 T	27,45	35,91	29,3	32,38	8,46	1,86	4,94	4,57	2,46	2,96	0,04	0,18	0,13	-4,57	-2,46	-2,96
98 N	27,52	35	33,22	36,15	7,48	5,7	8,64	3,59	6,3	6,66						
99 T	28,77	35	30,86	33,83	6,23	2,08	5,05	2,34	2,68	3,07	0,2	0,16	0,12	-2,34	-2,68	-3,07
99 N	28,78	34,01	28,02	31,37	5,23	-0,77	2,59	1,34	-0,17	0,61						
100 T	29,05	38,99	29,53	31,59	9,94	0,48	2,54	6,05	1,08	0,56	0,02	0,47	0,68	-6,05	-1,08	-0,56
100 N	32,55	35	29,94	34,49	2,45	-2,61	1,94	-1,44	-2,01	-0,04						

**Tablo-42'nin devamı**

Hasta No	<i>GAPDH</i>	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	Ortalama Kontrol $\Delta$ CT <i>VHL</i>	Ortalama Kontrol $\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	Ortalama Kontrol $\Delta$ CT <i>KAT5</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>VHL</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>KAT5</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>VHL</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>HIF1A</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>KAT5</i>	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT <i>VHL</i> )	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT <i>HIF1A</i> )	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT <i>KAT5</i> )
Ortalama Değerler	31,17	35,26	29,95	32,2	3,89	-0,6	1,98	0,2	-0,62	-0,95	7,62	40,48	50,2	-0,39	1,23	1,88

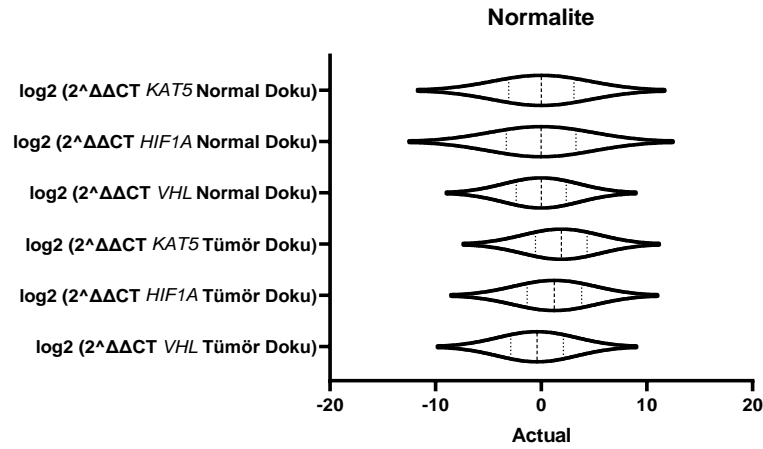


Şekil-36 *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5* Genlerinin tümör ve normal dokudaki ifade düzeylerinin sıcaklık haritalaması görüntüsü

Bu artış ve azalışların istatistiksel analizi yapıldığında öncelikle her bir genin tümör ve normal doku örneklerinin  $\log_2 (2^{-\Delta\Delta CT})$  değerleri normalite testine tabi tutulmuştur. Normalite testi sonucunda  $p > 0,05$  değeri sadece *VHL* Tümör dokusunda sağlanmamıştır. Bu nedenle *VHL* tümör doku verisinin kullanıldığı tüm analizler parametrik olmayan testler ile yapıldı (Tablo 43) (Şekil 37).

**Tablo-43  $\log_2 (2^{-\Delta\Delta CT})$  değerlerinin normalite testi**

Normalite Testi		
Test Edilen Parametreler	p Value	Yapılan Test
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i> Tümör Doku)	0,0045	Shapiro-Wilk testi
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT}$ <i>VHL</i> Normal Doku)	0,2008	Shapiro-Wilk testi
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i> Tümör Doku)	0,8711	Shapiro-Wilk testi
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT}$ <i>HIF1A</i> Normal Doku)	0,4325	Shapiro-Wilk testi
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i> Tümör Doku)	0,7517	Shapiro-Wilk testi
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT}$ <i>KAT5</i> Normal Doku)	0,4902	Shapiro-Wilk testi

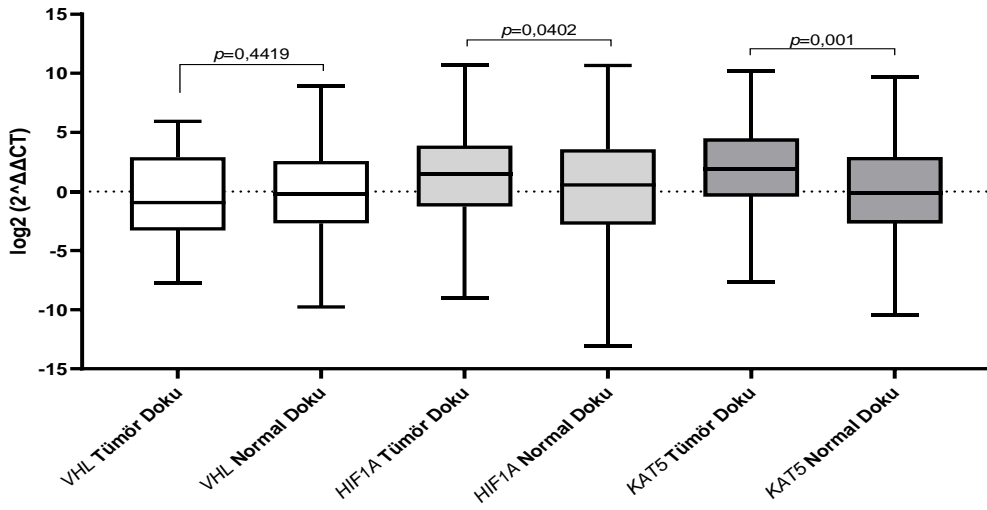


**Şekil-37 *VHL*, *HIF1A* ve *KAT5* gen ifadelerinin  $\log_2 (2^{\Delta\Delta CT})$  değerlerinin normalite dağılım grafiği**

Tümör dokular gen bazında normal doku değerleri ile karşılaştırıldığında *VHL*;  $p=0,4419$ , *HIF1A*;  $p=0,0402$ , *KAT5*;  $p=0,001$  olarak analiz edilmiştir.  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyinde *VHL* geni için istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmez iken *HIF1A* ve *KAT5* genleri için tümör ve normal doku arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (Tablo 44) (Şekil 38).

**Tablo-44  $\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$  değerlerinin t-testi sonuçları**

Test Edilen Parametreler		p Value	Yapılan Test
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT} VHL$ Tümör Doku)	$\log_2(2^{\Delta\Delta CT} VHL$ Normal Doku)	0,4419	Mann Whitney Testi
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT} HIF1A$ Tümör Doku)	$\log_2(2^{\Delta\Delta CT} HIF1A$ Normal Doku)	0,0402	T-Testi
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT} KAT5$ Tümör Doku)	$\log_2(2^{\Delta\Delta CT} KAT5$ Normal Doku)	0,001	T-Testi

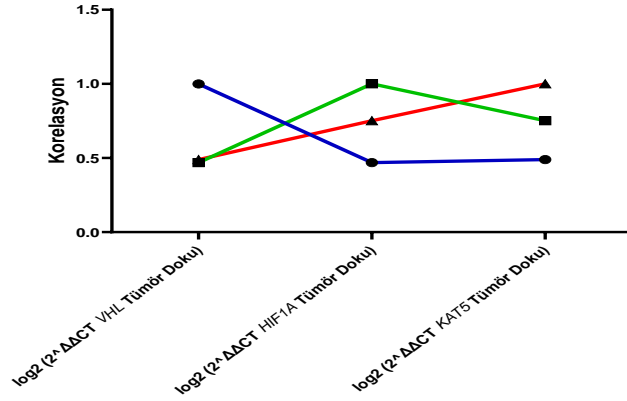


**Şekil-38 VHL, HIF1A, KAT5 gen ifadesinin tümör ve normal dokuda karşılaştırma grafiği.**

Tümör dokuda gen ifade düzeyindeki değişimlerin genler arasındaki ilişkisinin istatistiksel olarak analiz etmek için korelasyon testi uygulanmıştır (Tablo 45). Yapılan analiz sonucunda VHL geninin HIF1A geni ile arasında istatistiksel olarak anlamlı doğrusal bir fark olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.0001$ , Spearman  $r: 0.515$ ). VHL geni ile KAT5 geni arasında da doğrusal korelasyon belirlenmiştir ( $p < 0.0001$ , Spearman  $r: 0.486$ ). HIF1A ve KAT5 geni arasındaki korelasyon incelendiğinde ise, VHL geni ile aralarındaki ilişkiden daha yüksek bir ilişki tespit edilmiştir ( $p < 0.0001$ , Pearson  $r: 0.777$ ). Yapılan tüm korelasyon analizleri sonucunda üç gen arasında %95 güven aralığında istatistiksel olarak anlamlı doğrusal bir korelasyon tespit edildi (Tablo 45) (Şekil 39).

**Tablo-45 VHL, HIF1A ve KAT5 genlerinin arasındaki korelasyon testi sonuçları**

		log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> VHL Tümör Doku)	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> HIF1A Tümör Doku)	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> KAT5 Tümör Doku)
Korelasyon R	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> VHL Tümör Doku)	1	0,515013399	0,486568115
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> HIF1A Tümör Doku)	0,515013399	1	0,777632562
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> KAT5 Tümör Doku)	0,486568115	0,777632562	1
P Value	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> VHL Tümör Doku)	0	2,6078E-08	1,87756E-07
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> HIF1A Tümör Doku)	2,6078E-08	0	0
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> KAT5 Tümör Doku)	1,87756E-07	0	0
Güven Aralığı	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> VHL Tümör Doku)	1,000 to 1,000	0,3520 to 0,6477	0,3183 to 0,6251
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> HIF1A Tümör Doku)	0,3520 to 0,6477	1,000 to 1,000	0,6845 to 0,8458
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> KAT5 Tümör Doku)	0,3183 to 0,6251	0,6845 to 0,8458	1,000 to 1,000



**Şekil-39 VHL, HIF1A ve KAT5 genlerinin arasındaki korelasyon grafiği. (Mavi Çizgi: VHL, Yeşil Çizgi: HIF1A ve Kırmızı Çizgi: KAT5)**

Hastalara ait tümör ve normal doku örneklerinde BHTRHK gelişiminde aday biyobelirteç olarak değerlendirdiğimiz genleri hedef alan miR-223, miR-138 ve miR-22 için ifade düzeyleri delta CT metodu ile analiz edilmiştir (Tablo 46). Elde edilen nicel veriler ile sıcaklık haritalaması analizi yapıldı (Şekil 40).



**Tablo-46 miR-223, miR-138 ve miR-22'in Delta CT analizi**

Hasta No	<i>RNU48</i>	<i>miR-22</i>	<i>miR-138</i>	<i>miR-223</i>	$\Delta$ CT <i>miR-22</i>	$\Delta$ CT <i>miR-138</i>	$\Delta$ CT <i>miR-223</i>	Ortalama $\Delta\Delta$ CT <i>miR-22</i>	Ortalama $\Delta\Delta$ CT <i>miR-138</i>	Ortalama $\Delta\Delta$ CT <i>miR-223</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-22</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-138</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-223</i>	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-22</i> )	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-138</i> )	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-223</i> )
1 T	17,22	19,35	18,16	16,42	2,13	0,93	-0,80	1,16	-0,70	-2,73	0,45	1,62	6,65	-1,16	0,70	2,73
1 N	17,88	26,70	25,14	21,27	8,82	7,26	3,39	7,85	5,63	1,46						
2 T	22,07	27,96	30,62	16,44	5,89	8,55	-5,64	4,92	6,92	-7,57	0,03	0,01	189,50	-4,92	-6,92	7,57
2 N	21,46	29,18	29,25	21,10	7,72	7,79	-0,36	6,75	6,16	-2,29						
3 T	20,65	34,96	32,99	18,98	14,31	12,35	-1,67	13,34	10,72	-3,60	0,00	0,00	12,13	-13,34	-10,72	3,60
3 N	20,85	28,23	27,09	20,73	7,38	6,25	-0,12	6,41	4,62	-2,05						
4 T	19,74	27,51	32,74	20,75	7,77	13,00	1,01	6,80	11,37	-0,92	0,01	0,00	1,90	-6,80	-11,37	0,92
4 N	22,39	28,85	28,11	21,13	6,46	5,73	-1,26	5,49	4,10	-3,19						
5 T	20,96	29,97	33,21	22,42	9,01	12,25	1,46	8,04	10,62	-0,47	0,00	0,00	1,38	-8,04	-10,62	0,47
5 N	19,95	28,99	27,95	20,98	9,04	8,00	1,03	8,07	6,37	-0,90						
6 T	20,44	27,28	29,18	20,19	6,83	8,74	-0,25	5,86	7,11	-2,18	0,02	0,01	4,54	-5,86	-7,11	2,18
6 N	19,98	29,28	26,06	20,95	9,30	6,08	0,97	8,33	4,45	-0,96						
7 T	20,38	28,31	32,81	20,37	7,93	12,43	-0,01	6,96	10,80	-1,94	0,01	0,00	3,84	-6,96	-10,80	1,94
7 N	20,71	29,31	26,27	21,27	8,60	5,56	0,56	7,63	3,93	-1,37						
8 T	20,71	29,20	32,67	21,23	8,49	11,96	0,52	7,52	10,33	-1,41	0,01	0,00	2,66	-7,52	-10,33	1,41
8 N	22,44	30,76	26,38	20,91	8,32	3,94	-1,53	7,35	2,31	-3,46						
9 T	22,51	23,80	29,27	22,69	1,29	6,76	0,17	0,32	5,13	-1,76	0,80	0,03	3,38	-0,32	-5,13	1,76
9 N	24,23	24,30	24,86	33,29	0,06	0,63	9,05	-0,91	-1,00	7,12						
10 T	20,08	24,00	28,00	22,94	3,92	7,92	2,86	2,95	6,29	0,93	0,13	0,01	0,52	-2,95	-6,29	-0,93
10 N	21,96	25,15	27,77	31,69	3,19	5,81	9,73	2,22	4,18	7,80						

**Tablo-46'nin devamı**

Hasta No	RNU48	miR-22	miR-138	miR-223	$\Delta$ CT miR-22	$\Delta$ CT miR-138	$\Delta$ CT miR-223	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-22	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-138	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-223	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-22	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-138	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-223	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT miR-22)	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT miR-138)	log <sub>2</sub> ( $2^{\Delta\Delta$ CT miR-223)
11 T	23,19	26	30,69	24,01	2,81	7,5	0,83	1,84	5,87	-1,1	0,28	0,02	2,15	-1,84	-5,87	1,1
11 N	22,19	24,29	26,96	24,96	2,1	4,76	2,76	1,13	3,13	0,83						
12 T	22,8	24,35	25,33	23,71	1,55	2,53	0,91	0,58	0,9	-1,02	0,67	0,53	2,03	-0,58	-0,9	1,02
12 N	28,79	24,94	26,02	30,67	-3,85	-2,77	1,88	-4,82	-4,4	-0,05						
13 T	22,98	25,38	28,3	23,49	2,41	5,32	0,51	1,44	3,69	-1,42	0,37	0,08	2,68	-1,44	-3,69	1,42
13 N	24,87	27,34	25,98	29,53	2,47	1,11	4,66	1,5	-0,52	2,73						
14 T	24,01	24,72	29,61	24,72	0,71	5,6	0,71	-0,26	3,97	-1,22	1,2	0,06	2,33	0,26	-3,97	1,22
14 N	22,9	26,04	27,8	26,87	3,14	4,9	3,97	2,17	3,27	2,04						
15 T	24,79	25,95	27,67	26	1,16	2,88	1,21	0,19	1,25	-0,72	0,88	0,42	1,65	-0,19	-1,25	0,72
15 N	24,7	25,02	27,25	26,02	0,32	2,56	1,33	-0,65	0,93	-0,6						
16 T	28,03	26,33	28,16	28,41	-1,7	0,14	0,38	-2,67	-1,49	-1,55	6,35	2,81	2,92	2,67	1,49	1,55
16 N	23,64	23,97	26,58	24,94	0,33	2,94	1,31	-0,64	1,31	-0,62						
17 T	22,4	24,83	27,14	21,73	2,43	4,75	-0,67	1,46	3,12	-2,6	0,36	0,12	6,05	-1,46	-3,12	2,6
17 N	25,68	25,96	25,05	21,16	0,28	-0,63	-4,52	-0,69	-2,26	-6,45						
18 T	21,97	23,05	25,86	20,4	1,08	3,89	-1,57	0,11	2,26	-3,5	0,92	0,21	11,29	-0,11	-2,26	3,5
18 N	27,69	24,53	26,39	20,99	-3,16	-1,3	-6,7	-4,13	-2,93	-8,63						
19 T	20,56	22,87	25,67	21,2	2,31	5,1	0,63	1,34	3,47	-1,3	0,4	0,09	2,46	-1,34	-3,47	1,3
19 N	24,46	26,63	22,79	21,32	2,17	-1,67	-3,14	1,2	-3,3	-5,07						
20 T	21,26	24,37	25,92	21,45	3,12	4,67	0,19	2,15	3,04	-1,74	0,23	0,12	3,34	-2,15	-3,04	1,74
20 N	23,23	24,13	23,93	21,63	0,9	0,71	-1,6	-0,07	-0,92	-3,53						

**Tablo-46'nin devamı**

Hasta No	RNU48	miR-22	miR-138	miR-223	$\Delta$ CT miR-22	$\Delta$ CT miR-138	$\Delta$ CT miR-223	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-22	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-138	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-223	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-22	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-138	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-223	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-22)	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-138)	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-223)
21 T	22,92	27,49	30,89	22,64	4,58	7,98	-0,28	3,61	6,35	-2,21	0,08	0,01	4,61	-3,61	-6,35	2,21
21 N	23,87	26,78	25,95	26,54	2,91	2,08	2,67	1,94	0,45	0,74						
22 T	23,74	28,76	31,88	22,42	5,02	8,15	-1,31	4,05	6,52	-3,24	0,06	0,01	9,47	-4,05	-6,52	3,24
22 N	29,41	30,5	35,97	22,98	1,1	6,56	-6,42	0,13	4,93	-8,35						
23 T	21,79	25,98	27,96	23,12	4,2	6,17	1,33	3,23	4,54	-0,6	0,11	0,04	1,51	-3,23	-4,54	0,6
23 N	25,93	27,56	25,47	24,8	1,63	-0,46	-1,14	0,66	-2,09	-3,07						
24 T	22,28	26,96	27,09	22,53	4,68	4,81	0,25	3,71	3,18	-1,68	0,08	0,11	3,21	-3,71	-3,18	1,68
24 N	28,16	27,5	24,57	31,54	-0,66	-3,59	3,38	-1,63	-5,22	1,45						
25 T	22,23	26,17	23,67	24,95	3,94	1,44	2,71	2,97	-0,19	0,78	0,13	1,14	0,58	-2,97	0,19	-0,78
25 N	28,65	27,13	24,81	32,95	-1,52	-3,84	4,3	-2,49	-5,47	2,37						
26 T	24,23	27,13	25,23	22,78	2,9	1	-1,45	1,93	-0,63	-3,38	0,26	1,55	10,42	-1,93	0,63	3,38
26 N	32,99	28,34	25,77	33,18	-4,66	-7,22	0,19	-5,63	-8,85	-1,74						
27 T	21,58	24,32	30,46	24,29	2,74	8,89	2,71	1,77	7,26	0,78	0,29	0,01	0,58	-1,77	-7,26	-0,78
27 N	22,61	24,39	24,14	28,64	1,78	1,53	6,03	0,81	-0,1	4,1						
28 T	21,32	23,03	25,53	24,08	1,72	4,21	2,76	0,75	2,58	0,83	0,6	0,17	0,56	-0,75	-2,58	-0,83
28 N	21,7	22,95	25,1	24,46	1,25	3,4	2,76	0,28	1,77	0,83						
29 T	24,02	26,2	26,99	24,73	2,18	2,97	0,71	1,21	1,34	-1,22	0,43	0,4	2,33	-1,21	-1,34	1,22
29 N	23,8	26,87	26,97	23,66	3,07	3,17	-0,14	2,1	1,54	-2,07						
30 T	22,52	23,25	30,99	23,26	0,73	8,47	0,74	-0,24	6,84	-1,19	1,18	0,01	2,28	0,24	-6,84	1,19
30 N	19,94	23,52	24,77	22,38	3,59	4,83	2,45	2,62	3,2	0,52						

**Tablo-46'nin devamı**

Hasta No	RNU48	miR-22	miR-138	miR-223	$\Delta$ CT miR-22	$\Delta$ CT miR-138	$\Delta$ CT miR-223	Ortalama $\Delta$ CT miR-22	Ortalama $\Delta$ CT miR-138	Ortalama $\Delta$ CT miR-223	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-22	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-138	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-223	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT miR-22)	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT miR-138)	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT miR-223)
31 T	21,03	23,07	27,45	25,5	2,04	6,42	4,47	1,07	4,79	2,54	0,48	0,04	0,17	-1,07	-4,79	-2,54
31 N	20,26	23,98	26,16	32,75	3,71	5,89	12,49	2,74	4,26	10,56						
32 T	20,69	23,89	28,11	23,27	3,2	7,42	2,58	2,23	5,79	0,65	0,21	0,02	0,64	-2,23	-5,79	-0,65
32 N	22,96	23,96	25	28,98	1	2,04	6,02	0,03	0,41	4,09						
33 T	20,81	24,15	31,6	23,81	3,33	10,79	2,99	2,36	9,16	1,06	0,19	0	0,48	-2,36	-9,16	-1,06
33 N	24,02	23,02	23,68	28,51	-1	-0,34	4,49	-1,97	-1,97	2,56						
34 T	20,47	23,01	29,56	23,17	2,54	9,09	2,7	1,57	7,46	0,77	0,34	0,01	0,59	-1,57	-7,46	-0,77
34 N	25,37	23,99	26,83	26,48	-1,38	1,46	1,11	-2,35	-0,17	-0,82						
35 T	22,02	25,02	29,3	24,28	3,01	7,28	2,26	2,04	5,65	0,33	0,24	0,02	0,79	-2,04	-5,65	-0,33
35 N	21,5	22,97	26,37	23,95	1,47	4,87	2,44	0,5	3,24	0,51						
36 T	21,31	22,99	29,85	23,28	1,68	8,54	1,97	0,71	6,91	0,04	0,61	0,01	0,97	-0,71	-6,91	-0,04
36 N	21,8	22,96	24,13	28,74	1,16	2,33	6,95	0,19	0,7	5,02						
37 T	20,74	23,09	26,63	24,6	2,35	5,89	3,86	1,38	4,26	1,93	0,38	0,05	0,26	-1,38	-4,26	-1,93
37 N	28,28	25,73	29,15	33,67	-2,55	0,87	5,39	-3,52	-0,76	3,46						
38 T	20,55	25,67	28,32	24,42	5,12	7,77	3,88	4,15	6,14	1,95	0,06	0,01	0,26	-4,15	-6,14	-1,95
38 N	21,9	23,52	28,84	33,24	1,62	6,94	11,34	0,65	5,31	9,41						
39 T	20,47	24,68	26,74	21,43	4,21	6,27	0,96	3,24	4,64	-0,97	0,11	0,04	1,96	-3,24	-4,64	0,97
39 N	19,95	20,54	27,5	28,95	0,59	7,55	9	-0,38	5,92	7,07						
40 T	20,16	23,97	27,13	24,36	3,81	6,97	4,2	2,84	5,34	2,27	0,14	0,02	0,21	-2,84	-5,34	-2,27
40 N	24,53	24,9	25,68	32,56	0,37	1,15	8,03	-0,6	-0,48	6,1						

**Tablo-46'nin devamı**

Hasta No	RNU48	miR-22	miR-138	miR-223	$\Delta$ CT miR-22	$\Delta$ CT miR-138	$\Delta$ CT miR-223	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-22	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-138	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-223	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-22	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-138	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-223	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-22)	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-138)	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-223)
41 T	22,87	23,66	22,98	31,23	0,79	0,11	8,36	-0,18	-1,52	6,43	1,13	2,87	0,01	0,18	1,52	-6,43
41 N	22,37	21,57	22,49	24,16	-0,79	0,13	1,8	-1,76	-1,5	-0,13						
42 T	22,55	24,38	32	30,57	1,82	9,45	8,02	0,85	7,82	6,09	0,55	0	0,01	-0,85	-7,82	-6,09
42 N	19,33	22,39	24,98	24,53	3,05	5,64	5,2	2,08	4,01	3,27						
43 T	33,29	34,98	36,74	33,27	1,69	3,45	-0,01	0,72	1,82	-1,94	0,61	0,28	3,85	-0,72	-1,82	1,94
43 N	20,95	20,44	20,89	21,74	-0,51	-0,06	0,79	-1,48	-1,69	-1,14						
44 T	32,63	37,02	35,32	34,54	4,39	2,69	1,91	3,42	1,06	-0,02	0,09	0,48	1,01	-3,42	-1,06	0,02
44 N	30,18	31,12	32,37	30,99	0,94	2,19	0,81	-0,03	0,56	-1,12						
45 T	33,49	35,66	36,99	33,44	2,18	3,51	-0,05	1,21	1,88	-1,98	0,43	0,27	3,94	-1,21	-1,88	1,98
45 N	20,22	20,39	20,48	22,96	0,17	0,25	2,73	-0,8	-1,38	0,8						
46 T	21,53	23,84	27,79	27,96	2,31	6,26	6,42	1,34	4,63	4,49	0,4	0,04	0,04	-1,34	-4,63	-4,49
46 N	19,96	22,48	23,06	23,12	2,52	3,1	3,16	1,55	1,47	1,23						
47 T	20,14	24,11	25,59	20,87	3,97	5,45	0,73	3	3,82	-1,2	0,13	0,07	2,29	-3	-3,82	1,2
47 N	26,7	26,64	27,33	33,79	-0,06	0,63	7,08	-1,03	-1	5,15						
48 T	22,98	28,82	31,04	25,19	5,84	8,06	2,21	4,87	6,43	0,28	0,03	0,01	0,83	-4,87	-6,43	-0,28
48 N	24,84	29,54	28,04	29,68	4,7	3,2	4,84	3,73	1,57	2,91						
49 T	21,13	20,6	26,26	22,51	-0,53	5,13	1,38	-1,5	3,5	-0,55	2,84	0,09	1,47	1,5	-3,5	0,55
49 N	21,1	23,61	22,38	28,61	2,51	1,28	7,51	1,54	-0,35	5,58						
50 T	21,37	25,78	23,29	21,39	4,4	1,92	0,02	3,43	0,29	-1,91	0,09	0,82	3,75	-3,43	-0,29	1,91
50 N	20,34	23,96	24,2	23,02	3,63	3,86	2,68	2,66	2,23	0,75						

**Tablo-46'nın devamı**

Hasta No	RNU48	miR-22	miR-138	miR-223	$\Delta$ CT miR-22	$\Delta$ CT miR-138	$\Delta$ CT miR-223	Ortalama $\Delta$ CT miR-22	Ortalama $\Delta$ CT miR-138	Ortalama $\Delta$ CT miR-223	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-22	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-138	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-223	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT miR-22)	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT miR-138)	log2 ( $2^{\Delta\Delta$ CT miR-223)
51 T	22,56	23,19	35,2	33,36	0,63	12,64	10,8	-0,34	11,01	8,87	1,27	0	0	0,34	-11,01	-8,87
51 N	19,73	22,57	23,26	25,01	2,84	3,52	5,27	1,87	1,89	3,34						
52 T	35,01	33,58	35,15	35,13	-1,42	0,14	0,13	-2,39	-1,49	-1,8	5,25	2,8	3,49	2,39	1,49	1,8
52 N	24,65	17,88	21,4	20,68	-6,77	-3,25	-3,97	-7,74	-4,88	-5,9						
53 T	34,78	34,71	34,7	35,6	-0,07	-0,08	0,82	-1,04	-1,71	-1,11	2,06	3,26	2,17	1,04	1,71	1,11
53 N	37,08	36,94	35,97	32,04	-0,14	-1,11	-5,04	-1,11	-2,74	-6,97						
54 T	31,25	32,96	33,03	34,98	1,71	1,77	3,73	0,74	0,14	1,8	0,6	0,91	0,29	-0,74	-0,14	-1,8
54 N	31,66	31,62	33,16	34,17	-0,04	1,5	2,51	-1,01	-0,13	0,58						
55 T	19,3	19,46	27,73	22,36	0,16	8,43	3,06	-0,81	6,8	1,13	1,75	0,01	0,46	0,81	-6,8	-1,13
55 N	32,13	32,59	32,57	34,59	0,47	0,44	2,46	-0,5	-1,19	0,53						
56 T	22,08	18,99	26,12	21,13	-3,09	4,04	-0,95	-4,06	2,41	-2,88	16,65	0,19	7,38	4,06	-2,41	2,88
56 N	23,04	18,84	21,06	22,82	-4,2	-1,98	-0,22	-5,17	-3,61	-2,15						
57 T	23,19	19,19	29	24,19	-4	5,81	1	-4,97	4,18	-0,93	31,36	0,06	1,9	4,97	-4,18	0,93
57 N	33,87	36,12	36,49	35,34	2,25	2,62	1,47	1,28	0,99	-0,46						
58 T	21,26	18,69	28,03	22,84	-2,57	6,77	1,58	-3,54	5,14	-0,35	11,67	0,03	1,28	3,54	-5,14	0,35
58 N	21,95	18,52	20,49	23,73	-3,43	-1,47	1,78	-4,4	-3,1	-0,15						
59 T	32,97	31,52	35,95	32,67	-1,45	2,98	-0,31	-2,42	1,35	-2,24	5,36	0,39	4,71	2,42	-1,35	2,24
59 N	23,38	19,01	20,97	25,28	-4,36	-2,41	1,9	-5,33	-4,04	-0,03						
60 T	24,87	21,83	23,35	21,54	-3,04	-1,52	-3,34	-4,01	-3,15	-5,27	16,15	8,89	38,47	4,01	3,15	5,27
60 N	31,75	22,19	25,69	24,24	-9,56	-6,06	-7,51	-10,53	-7,69	-9,44						

**Tablo-46'nin devamı**

Hasta No	RNU48	miR-22	miR-138	miR-223	$\Delta$ CT miR-22	$\Delta$ CT miR-138	$\Delta$ CT miR-223	Ortalama $\Delta$ CT miR-22	Ortalama $\Delta$ CT miR-138	Ortalama $\Delta$ CT miR-223	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-22	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-138	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-223	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-22)	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-138)	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-223)
61 T	22,06	25,95	30,96	22,96	3,89	8,9	0,9	2,92	7,27	-1,03	0,13	0,01	2,04	-2,92	-7,27	1,03
61 N	22,06	26,35	24,86	23,98	4,29	2,8	1,92	3,32	1,17	-0,01						
62 T	28,21	27,77	28,27	24,99	-0,44	0,06	-3,22	-1,41	-1,57	-5,15	2,66	2,97	35,45	1,41	1,57	5,15
62 N	28,21	26,98	25,8	23,86	-1,23	-2,41	-4,35	-2,2	-4,04	-6,28						
63 T	22,41	23,23	32,9	25,01	0,82	10,49	2,6	-0,15	8,86	0,67	1,11	0	0,63	0,15	-8,86	-0,67
63 N	22,41	27,61	27,81	24,63	5,19	5,39	2,22	4,22	3,76	0,29						
64 T	29,11	28,91	34,99	28,94	-0,2	5,88	-0,17	-1,17	4,25	-2,1	2,26	0,05	4,3	1,17	-4,25	2,1
64 N	23,89	23,51	25,78	24,73	-0,38	1,89	0,84	-1,35	0,26	-1,09						
65 T	25,61	27,3	30,41	22,28	1,69	4,8	-3,33	0,72	3,17	-5,26	0,61	0,11	38,22	-0,72	-3,17	5,26
65 N	26,08	26,64	25,92	26,3	0,57	-0,16	0,22	-0,4	-1,79	-1,71						
66 T	31,89	28,35	29,98	24,96	-3,54	-1,91	-6,93	-4,51	-3,54	-8,86	22,8	11,64	464,88	4,51	3,54	8,86
66 N	31,98	30,99	29,26	28,42	-0,98	-2,72	-3,56	-1,95	-4,35	-5,49						
67 T	24,52	19,81	19,98	22,96	-4,71	-4,54	-1,56	-5,68	-6,17	-3,49	51,33	72,03	11,23	5,68	6,17	3,49
67 N	30,63	24,36	25,89	27,45	-6,27	-4,74	-3,18	-7,24	-6,37	-5,11						
68 T	23,81	20,46	28,07	23,07	-3,36	4,25	-0,74	-4,33	2,62	-2,67	20,09	0,16	6,37	4,33	-2,62	2,67
68 N	24,29	21,41	23,47	25,19	-2,89	-0,82	0,9	-3,86	-2,45	-1,03						
69 T	27,01	23,53	28,97	24,96	-3,48	1,96	-2,05	-4,45	0,33	-3,98	21,82	0,79	15,73	4,45	-0,33	3,98
69 N	28,92	21,82	25,47	28,88	-7,11	-3,46	-0,04	-8,08	-5,09	-1,97						
70 T	25	25,57	26,98	23,26	0,57	1,98	-1,74	-0,4	0,35	-3,67	1,32	0,78	12,77	0,4	-0,35	3,67
70 N	26,33	24,66	26,55	22,38	-1,67	0,22	-3,95	-2,64	-1,41	-5,88						

**Tablo-46'nin devamı**

Hasta No	RNU48	miR-22	miR-138	miR-223	$\Delta$ CT miR-22	$\Delta$ CT miR-138	$\Delta$ CT miR-223	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-22	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-138	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-223	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-22	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-138	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-223	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-22)	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-138)	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-223)
71 T	25,53	24,98	27,13	25,5	-0,55	1,6	-0,03	-1,52	-0,03	-1,96	2,87	1,02	3,9	1,52	0,03	1,96
71 N	24,89	23,99	25,89	32,75	-0,9	1	7,86	-1,87	-0,63	5,93						
72 T	21,08	25	29	23,94	3,92	7,92	2,86	2,95	6,29	0,93	0,13	0,01	0,52	-2,95	-6,29	-0,93
72 N	22,96	26,15	28,77	32,69	3,19	5,81	9,73	2,22	4,18	7,8						
73 T	24,19	27	31,69	25,01	2,81	7,5	0,83	1,84	5,87	-1,1	0,28	0,02	2,15	-1,84	-5,87	1,1
73 N	23,19	25,29	27,96	25,96	2,1	4,76	2,76	1,13	3,13	0,83						
74 T	23,8	25,35	26,33	24,71	1,55	2,53	0,91	0,58	0,9	-1,02	0,67	0,53	2,03	-0,58	-0,9	1,02
74 N	29,79	25,94	27,02	31,67	-3,85	-2,77	1,88	-4,82	-4,4	-0,05						
75 T	23,98	26,38	29,3	24,49	2,41	5,32	0,51	1,44	3,69	-1,42	0,37	0,08	2,68	-1,44	-3,69	1,42
75 N	25,87	28,34	26,98	30,53	2,47	1,11	4,66	1,5	-0,52	2,73						
76 T	25,01	25,72	30,61	25,72	0,71	5,6	0,71	-0,26	3,97	-1,22	1,2	0,06	2,33	0,26	-3,97	1,22
76 N	23,9	27,04	28,8	27,87	3,14	4,9	3,97	2,17	3,27	2,04						
77 T	25,79	26,95	28,67	27	1,16	2,88	1,21	0,19	1,25	-0,72	0,88	0,42	1,65	-0,19	-1,25	0,72
77 N	25,7	26,02	28,25	27,02	0,32	2,56	1,33	-0,65	0,93	-0,6						
78 T	29,03	27,33	29,16	29,41	-1,7	0,14	0,38	-2,67	-1,49	-1,55	6,35	2,81	2,92	2,67	1,49	1,55
78 N	24,64	24,97	27,58	25,94	0,33	2,94	1,31	-0,64	1,31	-0,62						
79 T	23,4	25,83	28,14	22,73	2,43	4,75	-0,67	1,46	3,12	-2,6	0,36	0,12	6,05	-1,46	-3,12	2,6
79 N	26,68	26,96	26,05	22,16	0,28	-0,63	-4,52	-0,69	-2,26	-6,45						
80 T	22,97	24,05	26,86	21,4	1,08	3,89	-1,57	0,11	2,26	-3,5	0,92	0,21	11,29	-0,11	-2,26	3,5
80 N	28,69	25,53	27,39	21,99	-3,16	-1,3	-6,7	-4,13	-2,93	-8,63						



**Tablo-46'nin devamı**

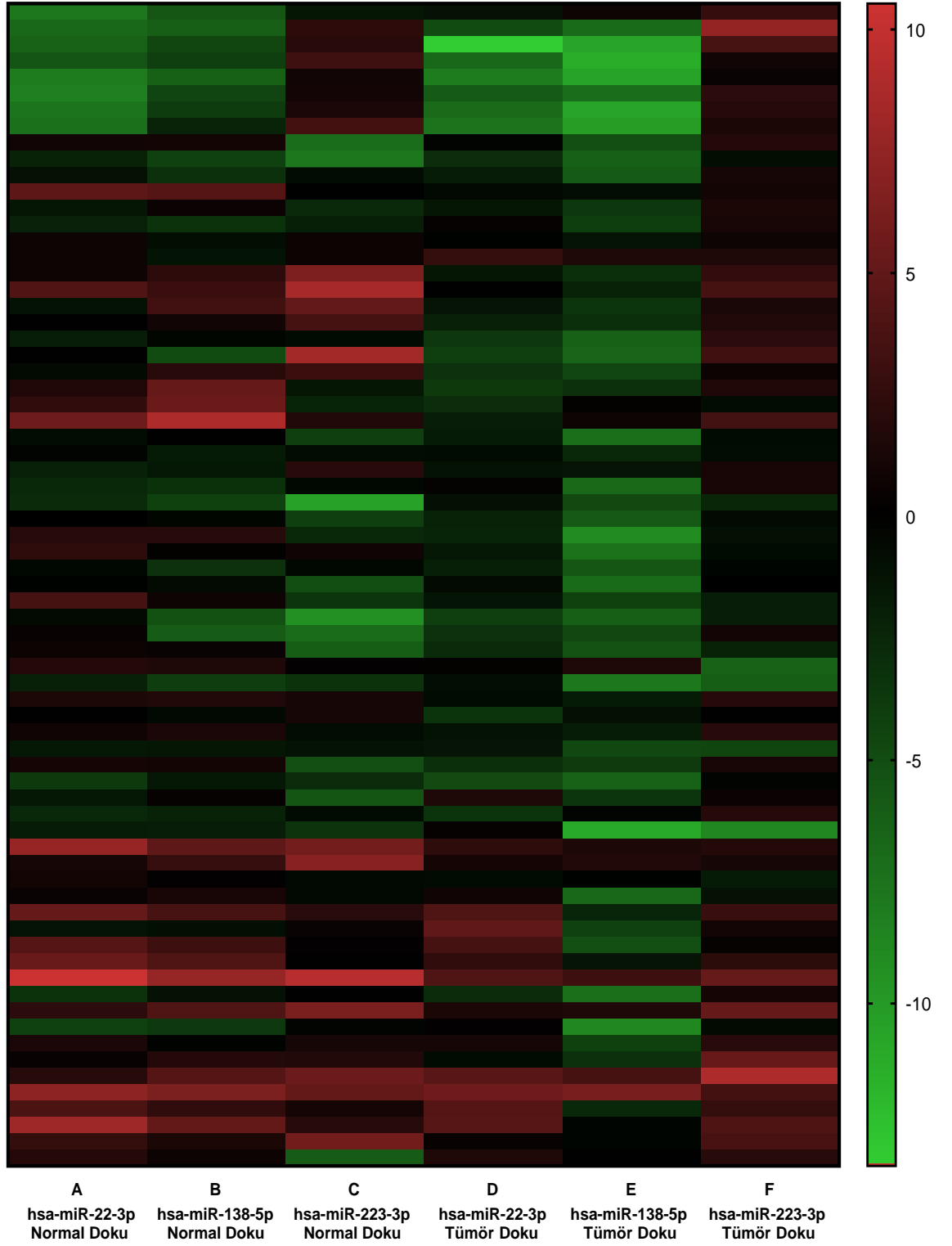
Hasta No	RNU48	miR-22	miR-138	miR-223	$\Delta$ CT miR-22	$\Delta$ CT miR-138	$\Delta$ CT miR-223	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-22	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-138	Ortalama $\Delta\Delta$ CT miR-223	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-22	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-138	$2^{\Delta\Delta$ CT miR-223	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-22)	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-138)	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT miR-223)																																																																																																																																																																																																																																																						
81 T	21,56	23,87	26,67	22,2	2,31	5,1	0,63	1,34	3,47	-1,3	0,4	0,09	2,46	-1,34	-3,47	1,3																																																																																																																																																																																																																																																						
81 N	25,46	27,63	23,79	22,32	2,17	-1,67	-3,14	1,2	-3,3	-5,07							82 T	22,26	25,37	26,92	22,45	3,12	4,67	0,19	2,15	3,04	-1,74	0,23	0,12	3,34	-2,15	-3,04	1,74	82 N	24,23	25,13	24,93	22,63	0,9	0,71	-1,6	-0,07	-0,92	-3,53	83 T	23,92	28,49	31,89	23,64	4,58	7,98	-0,28	3,61	6,35	-2,21	0,08	0,01	4,61	-3,61	-6,35	2,21	83 N	24,87	27,78	26,95	27,54	2,91	2,08	2,67	1,94	0,45	0,74	84 T	24,74	29,76	32,88	23,42	5,02	8,15	-1,31	4,05	6,52	-3,24	0,06	0,01	9,47	-4,05	-6,52	3,24	84 N	30,41	31,5	36,97	23,98	1,1	6,56	-6,42	0,13	4,93	-8,35	85 T	22,79	26,98	28,96	24,12	4,2	6,17	1,33	3,23	4,54	-0,6	0,11	0,04	1,51	-3,23	-4,54	0,6	85 N	26,93	28,56	26,47	25,8	1,63	-0,46	-1,14	0,66	-2,09	-3,07	86 T	23,28	27,96	28,09	23,53	4,68	4,81	0,25	3,71	3,18	-1,68	0,08	0,11	3,21	-3,71	-3,18	1,68	86 N	27,16	26,5	23,57	30,54	-0,66	-3,59	3,38	-1,63	-5,22	1,45	87 T	21,23	25,17	22,67	23,95	3,94	1,44	2,71	2,97	-0,19	0,78	0,13	1,14	0,58	-2,97	0,19	-0,78	87 N	27,65	26,13	23,81	31,95	-1,52	-3,84	4,3	-2,49	-5,47	2,37	88 T	23,23	26,13	24,23	21,78	2,9	1	-1,45	1,93	-0,63	-3,38	0,26	1,55	10,42	-1,93	0,63	3,38	88 N	31,99	27,34	24,77	32,18	-4,66	-7,22	0,19	-5,63	-8,85	-1,74	89 T	20,58	23,32	29,46	23,29	2,74	8,89	2,71	1,77	7,26	0,78	0,29	0,01	0,58	-1,77	-7,26	-0,78	89 N	21,61	23,39	23,14	27,64	1,78	1,53	6,03	0,81	-0,1	4,1	90 T	20,32	22,03	24,53	23,08	1,72	4,21	2,76	0,75	2,58	0,83	0,6	0,17	0,56	-0,75	-2,58	-0,83	90 N	20,7	21,95	24,1	23,46
82 T	22,26	25,37	26,92	22,45	3,12	4,67	0,19	2,15	3,04	-1,74	0,23	0,12	3,34	-2,15	-3,04	1,74																																																																																																																																																																																																																																																						
82 N	24,23	25,13	24,93	22,63	0,9	0,71	-1,6	-0,07	-0,92	-3,53							83 T	23,92	28,49	31,89	23,64	4,58	7,98	-0,28	3,61	6,35	-2,21	0,08	0,01	4,61	-3,61	-6,35	2,21	83 N	24,87	27,78	26,95	27,54	2,91	2,08	2,67	1,94	0,45	0,74	84 T	24,74	29,76	32,88	23,42	5,02	8,15	-1,31	4,05	6,52	-3,24	0,06	0,01	9,47	-4,05	-6,52	3,24	84 N	30,41	31,5	36,97	23,98	1,1	6,56	-6,42	0,13	4,93	-8,35	85 T	22,79	26,98	28,96	24,12	4,2	6,17	1,33	3,23	4,54	-0,6	0,11	0,04	1,51	-3,23	-4,54	0,6	85 N	26,93	28,56	26,47	25,8	1,63	-0,46	-1,14	0,66	-2,09	-3,07	86 T	23,28	27,96	28,09	23,53	4,68	4,81	0,25	3,71	3,18	-1,68	0,08	0,11	3,21	-3,71	-3,18	1,68	86 N	27,16	26,5	23,57	30,54	-0,66	-3,59	3,38	-1,63	-5,22	1,45	87 T	21,23	25,17	22,67	23,95	3,94	1,44	2,71	2,97	-0,19	0,78	0,13	1,14	0,58	-2,97	0,19	-0,78	87 N	27,65	26,13	23,81	31,95	-1,52	-3,84	4,3	-2,49	-5,47	2,37	88 T	23,23	26,13	24,23	21,78	2,9	1	-1,45	1,93	-0,63	-3,38	0,26	1,55	10,42	-1,93	0,63	3,38	88 N	31,99	27,34	24,77	32,18	-4,66	-7,22	0,19	-5,63	-8,85	-1,74	89 T	20,58	23,32	29,46	23,29	2,74	8,89	2,71	1,77	7,26	0,78	0,29	0,01	0,58	-1,77	-7,26	-0,78	89 N	21,61	23,39	23,14	27,64	1,78	1,53	6,03	0,81	-0,1	4,1	90 T	20,32	22,03	24,53	23,08	1,72	4,21	2,76	0,75	2,58	0,83	0,6	0,17	0,56	-0,75	-2,58	-0,83	90 N	20,7	21,95	24,1	23,46	1,25	3,4	2,76	0,28	1,77	0,83																						
83 T	23,92	28,49	31,89	23,64	4,58	7,98	-0,28	3,61	6,35	-2,21	0,08	0,01	4,61	-3,61	-6,35	2,21																																																																																																																																																																																																																																																						
83 N	24,87	27,78	26,95	27,54	2,91	2,08	2,67	1,94	0,45	0,74							84 T	24,74	29,76	32,88	23,42	5,02	8,15	-1,31	4,05	6,52	-3,24	0,06	0,01	9,47	-4,05	-6,52	3,24	84 N	30,41	31,5	36,97	23,98	1,1	6,56	-6,42	0,13	4,93	-8,35	85 T	22,79	26,98	28,96	24,12	4,2	6,17	1,33	3,23	4,54	-0,6	0,11	0,04	1,51	-3,23	-4,54	0,6	85 N	26,93	28,56	26,47	25,8	1,63	-0,46	-1,14	0,66	-2,09	-3,07	86 T	23,28	27,96	28,09	23,53	4,68	4,81	0,25	3,71	3,18	-1,68	0,08	0,11	3,21	-3,71	-3,18	1,68	86 N	27,16	26,5	23,57	30,54	-0,66	-3,59	3,38	-1,63	-5,22	1,45	87 T	21,23	25,17	22,67	23,95	3,94	1,44	2,71	2,97	-0,19	0,78	0,13	1,14	0,58	-2,97	0,19	-0,78	87 N	27,65	26,13	23,81	31,95	-1,52	-3,84	4,3	-2,49	-5,47	2,37	88 T	23,23	26,13	24,23	21,78	2,9	1	-1,45	1,93	-0,63	-3,38	0,26	1,55	10,42	-1,93	0,63	3,38	88 N	31,99	27,34	24,77	32,18	-4,66	-7,22	0,19	-5,63	-8,85	-1,74	89 T	20,58	23,32	29,46	23,29	2,74	8,89	2,71	1,77	7,26	0,78	0,29	0,01	0,58	-1,77	-7,26	-0,78	89 N	21,61	23,39	23,14	27,64	1,78	1,53	6,03	0,81	-0,1	4,1	90 T	20,32	22,03	24,53	23,08	1,72	4,21	2,76	0,75	2,58	0,83	0,6	0,17	0,56	-0,75	-2,58	-0,83	90 N	20,7	21,95	24,1	23,46	1,25	3,4	2,76	0,28	1,77	0,83																																																		
84 T	24,74	29,76	32,88	23,42	5,02	8,15	-1,31	4,05	6,52	-3,24	0,06	0,01	9,47	-4,05	-6,52	3,24																																																																																																																																																																																																																																																						
84 N	30,41	31,5	36,97	23,98	1,1	6,56	-6,42	0,13	4,93	-8,35							85 T	22,79	26,98	28,96	24,12	4,2	6,17	1,33	3,23	4,54	-0,6	0,11	0,04	1,51	-3,23	-4,54	0,6	85 N	26,93	28,56	26,47	25,8	1,63	-0,46	-1,14	0,66	-2,09	-3,07	86 T	23,28	27,96	28,09	23,53	4,68	4,81	0,25	3,71	3,18	-1,68	0,08	0,11	3,21	-3,71	-3,18	1,68	86 N	27,16	26,5	23,57	30,54	-0,66	-3,59	3,38	-1,63	-5,22	1,45	87 T	21,23	25,17	22,67	23,95	3,94	1,44	2,71	2,97	-0,19	0,78	0,13	1,14	0,58	-2,97	0,19	-0,78	87 N	27,65	26,13	23,81	31,95	-1,52	-3,84	4,3	-2,49	-5,47	2,37	88 T	23,23	26,13	24,23	21,78	2,9	1	-1,45	1,93	-0,63	-3,38	0,26	1,55	10,42	-1,93	0,63	3,38	88 N	31,99	27,34	24,77	32,18	-4,66	-7,22	0,19	-5,63	-8,85	-1,74	89 T	20,58	23,32	29,46	23,29	2,74	8,89	2,71	1,77	7,26	0,78	0,29	0,01	0,58	-1,77	-7,26	-0,78	89 N	21,61	23,39	23,14	27,64	1,78	1,53	6,03	0,81	-0,1	4,1	90 T	20,32	22,03	24,53	23,08	1,72	4,21	2,76	0,75	2,58	0,83	0,6	0,17	0,56	-0,75	-2,58	-0,83	90 N	20,7	21,95	24,1	23,46	1,25	3,4	2,76	0,28	1,77	0,83																																																																														
85 T	22,79	26,98	28,96	24,12	4,2	6,17	1,33	3,23	4,54	-0,6	0,11	0,04	1,51	-3,23	-4,54	0,6																																																																																																																																																																																																																																																						
85 N	26,93	28,56	26,47	25,8	1,63	-0,46	-1,14	0,66	-2,09	-3,07							86 T	23,28	27,96	28,09	23,53	4,68	4,81	0,25	3,71	3,18	-1,68	0,08	0,11	3,21	-3,71	-3,18	1,68	86 N	27,16	26,5	23,57	30,54	-0,66	-3,59	3,38	-1,63	-5,22	1,45	87 T	21,23	25,17	22,67	23,95	3,94	1,44	2,71	2,97	-0,19	0,78	0,13	1,14	0,58	-2,97	0,19	-0,78	87 N	27,65	26,13	23,81	31,95	-1,52	-3,84	4,3	-2,49	-5,47	2,37	88 T	23,23	26,13	24,23	21,78	2,9	1	-1,45	1,93	-0,63	-3,38	0,26	1,55	10,42	-1,93	0,63	3,38	88 N	31,99	27,34	24,77	32,18	-4,66	-7,22	0,19	-5,63	-8,85	-1,74	89 T	20,58	23,32	29,46	23,29	2,74	8,89	2,71	1,77	7,26	0,78	0,29	0,01	0,58	-1,77	-7,26	-0,78	89 N	21,61	23,39	23,14	27,64	1,78	1,53	6,03	0,81	-0,1	4,1	90 T	20,32	22,03	24,53	23,08	1,72	4,21	2,76	0,75	2,58	0,83	0,6	0,17	0,56	-0,75	-2,58	-0,83	90 N	20,7	21,95	24,1	23,46	1,25	3,4	2,76	0,28	1,77	0,83																																																																																																										
86 T	23,28	27,96	28,09	23,53	4,68	4,81	0,25	3,71	3,18	-1,68	0,08	0,11	3,21	-3,71	-3,18	1,68																																																																																																																																																																																																																																																						
86 N	27,16	26,5	23,57	30,54	-0,66	-3,59	3,38	-1,63	-5,22	1,45							87 T	21,23	25,17	22,67	23,95	3,94	1,44	2,71	2,97	-0,19	0,78	0,13	1,14	0,58	-2,97	0,19	-0,78	87 N	27,65	26,13	23,81	31,95	-1,52	-3,84	4,3	-2,49	-5,47	2,37	88 T	23,23	26,13	24,23	21,78	2,9	1	-1,45	1,93	-0,63	-3,38	0,26	1,55	10,42	-1,93	0,63	3,38	88 N	31,99	27,34	24,77	32,18	-4,66	-7,22	0,19	-5,63	-8,85	-1,74	89 T	20,58	23,32	29,46	23,29	2,74	8,89	2,71	1,77	7,26	0,78	0,29	0,01	0,58	-1,77	-7,26	-0,78	89 N	21,61	23,39	23,14	27,64	1,78	1,53	6,03	0,81	-0,1	4,1	90 T	20,32	22,03	24,53	23,08	1,72	4,21	2,76	0,75	2,58	0,83	0,6	0,17	0,56	-0,75	-2,58	-0,83	90 N	20,7	21,95	24,1	23,46	1,25	3,4	2,76	0,28	1,77	0,83																																																																																																																																						
87 T	21,23	25,17	22,67	23,95	3,94	1,44	2,71	2,97	-0,19	0,78	0,13	1,14	0,58	-2,97	0,19	-0,78																																																																																																																																																																																																																																																						
87 N	27,65	26,13	23,81	31,95	-1,52	-3,84	4,3	-2,49	-5,47	2,37							88 T	23,23	26,13	24,23	21,78	2,9	1	-1,45	1,93	-0,63	-3,38	0,26	1,55	10,42	-1,93	0,63	3,38	88 N	31,99	27,34	24,77	32,18	-4,66	-7,22	0,19	-5,63	-8,85	-1,74	89 T	20,58	23,32	29,46	23,29	2,74	8,89	2,71	1,77	7,26	0,78	0,29	0,01	0,58	-1,77	-7,26	-0,78	89 N	21,61	23,39	23,14	27,64	1,78	1,53	6,03	0,81	-0,1	4,1	90 T	20,32	22,03	24,53	23,08	1,72	4,21	2,76	0,75	2,58	0,83	0,6	0,17	0,56	-0,75	-2,58	-0,83	90 N	20,7	21,95	24,1	23,46	1,25	3,4	2,76	0,28	1,77	0,83																																																																																																																																																																		
88 T	23,23	26,13	24,23	21,78	2,9	1	-1,45	1,93	-0,63	-3,38	0,26	1,55	10,42	-1,93	0,63	3,38																																																																																																																																																																																																																																																						
88 N	31,99	27,34	24,77	32,18	-4,66	-7,22	0,19	-5,63	-8,85	-1,74							89 T	20,58	23,32	29,46	23,29	2,74	8,89	2,71	1,77	7,26	0,78	0,29	0,01	0,58	-1,77	-7,26	-0,78	89 N	21,61	23,39	23,14	27,64	1,78	1,53	6,03	0,81	-0,1	4,1	90 T	20,32	22,03	24,53	23,08	1,72	4,21	2,76	0,75	2,58	0,83	0,6	0,17	0,56	-0,75	-2,58	-0,83	90 N	20,7	21,95	24,1	23,46	1,25	3,4	2,76	0,28	1,77	0,83																																																																																																																																																																																														
89 T	20,58	23,32	29,46	23,29	2,74	8,89	2,71	1,77	7,26	0,78	0,29	0,01	0,58	-1,77	-7,26	-0,78																																																																																																																																																																																																																																																						
89 N	21,61	23,39	23,14	27,64	1,78	1,53	6,03	0,81	-0,1	4,1							90 T	20,32	22,03	24,53	23,08	1,72	4,21	2,76	0,75	2,58	0,83	0,6	0,17	0,56	-0,75	-2,58	-0,83	90 N	20,7	21,95	24,1	23,46	1,25	3,4	2,76	0,28	1,77	0,83																																																																																																																																																																																																																										
90 T	20,32	22,03	24,53	23,08	1,72	4,21	2,76	0,75	2,58	0,83	0,6	0,17	0,56	-0,75	-2,58	-0,83																																																																																																																																																																																																																																																						
90 N	20,7	21,95	24,1	23,46	1,25	3,4	2,76	0,28	1,77	0,83																																																																																																																																																																																																																																																												

**Tablo-46'nin devamı**

Hasta No	RNU48	miR-22	miR-138	miR-223	ΔCT miR-22	ΔCT miR-138	ΔCT miR-223	Ortalama ΔΔCT miR-22	Ortalama ΔΔCT miR-138	Ortalama ΔΔCT miR-223	2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-22	2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-138	2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-223	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-22)	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-138)	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-223)																																																																																																																																																																																																																																																						
91 T	23,02	25,2	25,99	23,73	2,18	2,97	0,71	1,21	1,34	-1,22	0,43	0,4	2,33	-1,21	-1,34	1,22																																																																																																																																																																																																																																																						
91 N	22,8	25,87	25,97	22,66	3,07	3,17	-0,14	2,1	1,54	-2,07							92 T	21,52	22,25	29,99	22,26	0,73	8,47	0,74	-0,24	6,84	-1,19	1,18	0,01	2,28	0,24	-6,84	1,19	92 N	18,94	22,52	23,77	21,38	3,59	4,83	2,45	2,62	3,2	0,52	93 T	20,03	22,07	26,45	24,5	2,04	6,42	4,47	1,07	4,79	2,54	0,48	0,04	0,17	-1,07	-4,79	-2,54	93 N	19,26	22,98	25,16	31,75	3,71	5,89	12,49	2,74	4,26	10,56	94 T	19,69	22,89	27,11	22,27	3,2	7,42	2,58	2,23	5,79	0,65	0,21	0,02	0,64	-2,23	-5,79	-0,65	94 N	21,96	22,96	24	27,98	1	2,04	6,02	0,03	0,41	4,09	95 T	19,81	23,15	30,6	22,81	3,33	10,79	2,99	2,36	9,16	1,06	0,19	0	0,48	-2,36	-9,16	-1,06	95 N	23,02	22,02	22,68	27,51	-1	-0,34	4,49	-1,97	-1,97	2,56	96 T	19,47	22,01	28,56	22,17	2,54	9,09	2,7	1,57	7,46	0,77	0,34	0,01	0,59	-1,57	-7,46	-0,77	96 N	24,37	22,99	25,83	25,48	-1,38	1,46	1,11	-2,35	-0,17	-0,82	97 T	21,02	24,02	28,3	23,28	3,01	7,28	2,26	2,04	5,65	0,33	0,24	0,02	0,79	-2,04	-5,65	-0,33	97 N	20,5	21,97	25,37	22,95	1,47	4,87	2,44	0,5	3,24	0,51	98 T	20,31	21,99	28,85	22,28	1,68	8,54	1,97	0,71	6,91	0,04	0,61	0,01	0,97	-0,71	-6,91	-0,04	98 N	20,8	21,96	23,13	27,74	1,16	2,33	6,95	0,19	0,7	5,02	99 T	19,74	22,09	25,63	23,6	2,35	5,89	3,86	1,38	4,26	1,93	0,38	0,05	0,26	-1,38	-4,26	-1,93	99 N	27,28	24,73	28,15	32,67	-2,55	0,87	5,39	-3,52	-0,76	3,46	100 T	19,55	24,67	27,32	23,42	5,12	7,77	3,88	4,15	6,14	1,95	0,06	0,01	0,26	-4,15	-6,14	-1,95	100 N	20,9	22,52	27,84	32,24
92 T	21,52	22,25	29,99	22,26	0,73	8,47	0,74	-0,24	6,84	-1,19	1,18	0,01	2,28	0,24	-6,84	1,19																																																																																																																																																																																																																																																						
92 N	18,94	22,52	23,77	21,38	3,59	4,83	2,45	2,62	3,2	0,52							93 T	20,03	22,07	26,45	24,5	2,04	6,42	4,47	1,07	4,79	2,54	0,48	0,04	0,17	-1,07	-4,79	-2,54	93 N	19,26	22,98	25,16	31,75	3,71	5,89	12,49	2,74	4,26	10,56	94 T	19,69	22,89	27,11	22,27	3,2	7,42	2,58	2,23	5,79	0,65	0,21	0,02	0,64	-2,23	-5,79	-0,65	94 N	21,96	22,96	24	27,98	1	2,04	6,02	0,03	0,41	4,09	95 T	19,81	23,15	30,6	22,81	3,33	10,79	2,99	2,36	9,16	1,06	0,19	0	0,48	-2,36	-9,16	-1,06	95 N	23,02	22,02	22,68	27,51	-1	-0,34	4,49	-1,97	-1,97	2,56	96 T	19,47	22,01	28,56	22,17	2,54	9,09	2,7	1,57	7,46	0,77	0,34	0,01	0,59	-1,57	-7,46	-0,77	96 N	24,37	22,99	25,83	25,48	-1,38	1,46	1,11	-2,35	-0,17	-0,82	97 T	21,02	24,02	28,3	23,28	3,01	7,28	2,26	2,04	5,65	0,33	0,24	0,02	0,79	-2,04	-5,65	-0,33	97 N	20,5	21,97	25,37	22,95	1,47	4,87	2,44	0,5	3,24	0,51	98 T	20,31	21,99	28,85	22,28	1,68	8,54	1,97	0,71	6,91	0,04	0,61	0,01	0,97	-0,71	-6,91	-0,04	98 N	20,8	21,96	23,13	27,74	1,16	2,33	6,95	0,19	0,7	5,02	99 T	19,74	22,09	25,63	23,6	2,35	5,89	3,86	1,38	4,26	1,93	0,38	0,05	0,26	-1,38	-4,26	-1,93	99 N	27,28	24,73	28,15	32,67	-2,55	0,87	5,39	-3,52	-0,76	3,46	100 T	19,55	24,67	27,32	23,42	5,12	7,77	3,88	4,15	6,14	1,95	0,06	0,01	0,26	-4,15	-6,14	-1,95	100 N	20,9	22,52	27,84	32,24	1,62	6,94	11,34	0,65	5,31	9,41																						
93 T	20,03	22,07	26,45	24,5	2,04	6,42	4,47	1,07	4,79	2,54	0,48	0,04	0,17	-1,07	-4,79	-2,54																																																																																																																																																																																																																																																						
93 N	19,26	22,98	25,16	31,75	3,71	5,89	12,49	2,74	4,26	10,56							94 T	19,69	22,89	27,11	22,27	3,2	7,42	2,58	2,23	5,79	0,65	0,21	0,02	0,64	-2,23	-5,79	-0,65	94 N	21,96	22,96	24	27,98	1	2,04	6,02	0,03	0,41	4,09	95 T	19,81	23,15	30,6	22,81	3,33	10,79	2,99	2,36	9,16	1,06	0,19	0	0,48	-2,36	-9,16	-1,06	95 N	23,02	22,02	22,68	27,51	-1	-0,34	4,49	-1,97	-1,97	2,56	96 T	19,47	22,01	28,56	22,17	2,54	9,09	2,7	1,57	7,46	0,77	0,34	0,01	0,59	-1,57	-7,46	-0,77	96 N	24,37	22,99	25,83	25,48	-1,38	1,46	1,11	-2,35	-0,17	-0,82	97 T	21,02	24,02	28,3	23,28	3,01	7,28	2,26	2,04	5,65	0,33	0,24	0,02	0,79	-2,04	-5,65	-0,33	97 N	20,5	21,97	25,37	22,95	1,47	4,87	2,44	0,5	3,24	0,51	98 T	20,31	21,99	28,85	22,28	1,68	8,54	1,97	0,71	6,91	0,04	0,61	0,01	0,97	-0,71	-6,91	-0,04	98 N	20,8	21,96	23,13	27,74	1,16	2,33	6,95	0,19	0,7	5,02	99 T	19,74	22,09	25,63	23,6	2,35	5,89	3,86	1,38	4,26	1,93	0,38	0,05	0,26	-1,38	-4,26	-1,93	99 N	27,28	24,73	28,15	32,67	-2,55	0,87	5,39	-3,52	-0,76	3,46	100 T	19,55	24,67	27,32	23,42	5,12	7,77	3,88	4,15	6,14	1,95	0,06	0,01	0,26	-4,15	-6,14	-1,95	100 N	20,9	22,52	27,84	32,24	1,62	6,94	11,34	0,65	5,31	9,41																																																		
94 T	19,69	22,89	27,11	22,27	3,2	7,42	2,58	2,23	5,79	0,65	0,21	0,02	0,64	-2,23	-5,79	-0,65																																																																																																																																																																																																																																																						
94 N	21,96	22,96	24	27,98	1	2,04	6,02	0,03	0,41	4,09							95 T	19,81	23,15	30,6	22,81	3,33	10,79	2,99	2,36	9,16	1,06	0,19	0	0,48	-2,36	-9,16	-1,06	95 N	23,02	22,02	22,68	27,51	-1	-0,34	4,49	-1,97	-1,97	2,56	96 T	19,47	22,01	28,56	22,17	2,54	9,09	2,7	1,57	7,46	0,77	0,34	0,01	0,59	-1,57	-7,46	-0,77	96 N	24,37	22,99	25,83	25,48	-1,38	1,46	1,11	-2,35	-0,17	-0,82	97 T	21,02	24,02	28,3	23,28	3,01	7,28	2,26	2,04	5,65	0,33	0,24	0,02	0,79	-2,04	-5,65	-0,33	97 N	20,5	21,97	25,37	22,95	1,47	4,87	2,44	0,5	3,24	0,51	98 T	20,31	21,99	28,85	22,28	1,68	8,54	1,97	0,71	6,91	0,04	0,61	0,01	0,97	-0,71	-6,91	-0,04	98 N	20,8	21,96	23,13	27,74	1,16	2,33	6,95	0,19	0,7	5,02	99 T	19,74	22,09	25,63	23,6	2,35	5,89	3,86	1,38	4,26	1,93	0,38	0,05	0,26	-1,38	-4,26	-1,93	99 N	27,28	24,73	28,15	32,67	-2,55	0,87	5,39	-3,52	-0,76	3,46	100 T	19,55	24,67	27,32	23,42	5,12	7,77	3,88	4,15	6,14	1,95	0,06	0,01	0,26	-4,15	-6,14	-1,95	100 N	20,9	22,52	27,84	32,24	1,62	6,94	11,34	0,65	5,31	9,41																																																																														
95 T	19,81	23,15	30,6	22,81	3,33	10,79	2,99	2,36	9,16	1,06	0,19	0	0,48	-2,36	-9,16	-1,06																																																																																																																																																																																																																																																						
95 N	23,02	22,02	22,68	27,51	-1	-0,34	4,49	-1,97	-1,97	2,56							96 T	19,47	22,01	28,56	22,17	2,54	9,09	2,7	1,57	7,46	0,77	0,34	0,01	0,59	-1,57	-7,46	-0,77	96 N	24,37	22,99	25,83	25,48	-1,38	1,46	1,11	-2,35	-0,17	-0,82	97 T	21,02	24,02	28,3	23,28	3,01	7,28	2,26	2,04	5,65	0,33	0,24	0,02	0,79	-2,04	-5,65	-0,33	97 N	20,5	21,97	25,37	22,95	1,47	4,87	2,44	0,5	3,24	0,51	98 T	20,31	21,99	28,85	22,28	1,68	8,54	1,97	0,71	6,91	0,04	0,61	0,01	0,97	-0,71	-6,91	-0,04	98 N	20,8	21,96	23,13	27,74	1,16	2,33	6,95	0,19	0,7	5,02	99 T	19,74	22,09	25,63	23,6	2,35	5,89	3,86	1,38	4,26	1,93	0,38	0,05	0,26	-1,38	-4,26	-1,93	99 N	27,28	24,73	28,15	32,67	-2,55	0,87	5,39	-3,52	-0,76	3,46	100 T	19,55	24,67	27,32	23,42	5,12	7,77	3,88	4,15	6,14	1,95	0,06	0,01	0,26	-4,15	-6,14	-1,95	100 N	20,9	22,52	27,84	32,24	1,62	6,94	11,34	0,65	5,31	9,41																																																																																																										
96 T	19,47	22,01	28,56	22,17	2,54	9,09	2,7	1,57	7,46	0,77	0,34	0,01	0,59	-1,57	-7,46	-0,77																																																																																																																																																																																																																																																						
96 N	24,37	22,99	25,83	25,48	-1,38	1,46	1,11	-2,35	-0,17	-0,82							97 T	21,02	24,02	28,3	23,28	3,01	7,28	2,26	2,04	5,65	0,33	0,24	0,02	0,79	-2,04	-5,65	-0,33	97 N	20,5	21,97	25,37	22,95	1,47	4,87	2,44	0,5	3,24	0,51	98 T	20,31	21,99	28,85	22,28	1,68	8,54	1,97	0,71	6,91	0,04	0,61	0,01	0,97	-0,71	-6,91	-0,04	98 N	20,8	21,96	23,13	27,74	1,16	2,33	6,95	0,19	0,7	5,02	99 T	19,74	22,09	25,63	23,6	2,35	5,89	3,86	1,38	4,26	1,93	0,38	0,05	0,26	-1,38	-4,26	-1,93	99 N	27,28	24,73	28,15	32,67	-2,55	0,87	5,39	-3,52	-0,76	3,46	100 T	19,55	24,67	27,32	23,42	5,12	7,77	3,88	4,15	6,14	1,95	0,06	0,01	0,26	-4,15	-6,14	-1,95	100 N	20,9	22,52	27,84	32,24	1,62	6,94	11,34	0,65	5,31	9,41																																																																																																																																						
97 T	21,02	24,02	28,3	23,28	3,01	7,28	2,26	2,04	5,65	0,33	0,24	0,02	0,79	-2,04	-5,65	-0,33																																																																																																																																																																																																																																																						
97 N	20,5	21,97	25,37	22,95	1,47	4,87	2,44	0,5	3,24	0,51							98 T	20,31	21,99	28,85	22,28	1,68	8,54	1,97	0,71	6,91	0,04	0,61	0,01	0,97	-0,71	-6,91	-0,04	98 N	20,8	21,96	23,13	27,74	1,16	2,33	6,95	0,19	0,7	5,02	99 T	19,74	22,09	25,63	23,6	2,35	5,89	3,86	1,38	4,26	1,93	0,38	0,05	0,26	-1,38	-4,26	-1,93	99 N	27,28	24,73	28,15	32,67	-2,55	0,87	5,39	-3,52	-0,76	3,46	100 T	19,55	24,67	27,32	23,42	5,12	7,77	3,88	4,15	6,14	1,95	0,06	0,01	0,26	-4,15	-6,14	-1,95	100 N	20,9	22,52	27,84	32,24	1,62	6,94	11,34	0,65	5,31	9,41																																																																																																																																																																		
98 T	20,31	21,99	28,85	22,28	1,68	8,54	1,97	0,71	6,91	0,04	0,61	0,01	0,97	-0,71	-6,91	-0,04																																																																																																																																																																																																																																																						
98 N	20,8	21,96	23,13	27,74	1,16	2,33	6,95	0,19	0,7	5,02							99 T	19,74	22,09	25,63	23,6	2,35	5,89	3,86	1,38	4,26	1,93	0,38	0,05	0,26	-1,38	-4,26	-1,93	99 N	27,28	24,73	28,15	32,67	-2,55	0,87	5,39	-3,52	-0,76	3,46	100 T	19,55	24,67	27,32	23,42	5,12	7,77	3,88	4,15	6,14	1,95	0,06	0,01	0,26	-4,15	-6,14	-1,95	100 N	20,9	22,52	27,84	32,24	1,62	6,94	11,34	0,65	5,31	9,41																																																																																																																																																																																														
99 T	19,74	22,09	25,63	23,6	2,35	5,89	3,86	1,38	4,26	1,93	0,38	0,05	0,26	-1,38	-4,26	-1,93																																																																																																																																																																																																																																																						
99 N	27,28	24,73	28,15	32,67	-2,55	0,87	5,39	-3,52	-0,76	3,46							100 T	19,55	24,67	27,32	23,42	5,12	7,77	3,88	4,15	6,14	1,95	0,06	0,01	0,26	-4,15	-6,14	-1,95	100 N	20,9	22,52	27,84	32,24	1,62	6,94	11,34	0,65	5,31	9,41																																																																																																																																																																																																																										
100 T	19,55	24,67	27,32	23,42	5,12	7,77	3,88	4,15	6,14	1,95	0,06	0,01	0,26	-4,15	-6,14	-1,95																																																																																																																																																																																																																																																						
100 N	20,9	22,52	27,84	32,24	1,62	6,94	11,34	0,65	5,31	9,41																																																																																																																																																																																																																																																												

**Tablo-46'nin devamı**

Hasta No	<i>RNU48</i>	<i>miR-22</i>	<i>miR-138</i>	<i>miR-223</i>	Ortalama Kontrol $\Delta$ CT <i>miR-22</i>	Ortalama Kontrol $\Delta$ CT <i>miR-138</i>	Ortalama Kontrol $\Delta$ CT <i>miR-223</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>miR-22</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>miR-138</i>	Ortalama $\Delta$ CT <i>miR-223</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-22</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-138</i>	$2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-223</i>	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-22</i> )	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-138</i> )	$\log_2(2^{\Delta\Delta$ CT <i>miR-223</i> )
Ortalama	24,07	25,63	27,63	25,52	0,97	1,63	1,93	0,58	1,92	-0,49	3,44	1,7	13,78	-1,17	-3,84	0,97



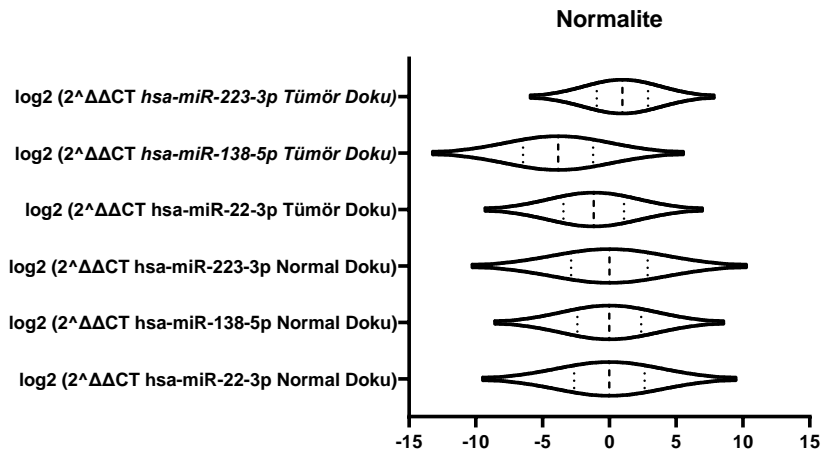
Şekil-40 miR-223, miR-138 ve miR-22'in sıcaklık haritalaması görüntüsü

*VHL* genini hedefleyen miR-223, *HIF1A*'yı hedefleyen miR-138 ve *HIF1A*'i hedefleyen miR-22,  $\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$  değerleri açısından değerlendirildiğinde miR-22 -1,17 kat ( $p=0,0309$ ), miR-138 -3,84 kat ( $p<0,0001$ ) azalma, miR-223 0.97 kat ( $p=0,0458$ ) artış göstermektedir (Tablo 46).

Bu artış ve azalışların istatistiksel analizi yapıldığında öncelikle her bir miRNA'nın tümör ve normal doku örneklerinin  $\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$  değerleri normalite testine tabi tutulmuştur. Normalite testi sonucunda değeri miR-22 Tümör Doku,  $\log_2$  miR-223 Tümör Doku ve miR-223 Normal Doku örneklerinde sağlanmamıştır. miR-22 Tümör Doku,  $\log_2$  miR-223 Tümör Doku ve miR-223 Normal Doku verisinin kullanıldığı tüm analizler parametrik olmayan testler ile yapılmıştır (Tablo 47) (Şekil 41).

**Tablo-47 MicroRNA'lara ait  $\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$  değerlerinin normalite testi**

Normalite Testi		
Test Edilen Parametreler	p Value	Yapılan Test
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-22 Tümör Doku)	0,0284	Shapiro-Wilk testi
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-22 Normal Doku)	0,9728	Shapiro-Wilk testi
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-138 Tümör Doku)	0,6987	Shapiro-Wilk testi
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-138 Normal Doku)	0,5429	Shapiro-Wilk testi
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-223 Tümör Doku)	0,0011	Shapiro-Wilk testi
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-223 Normal Doku)	0,0284	Shapiro-Wilk testi

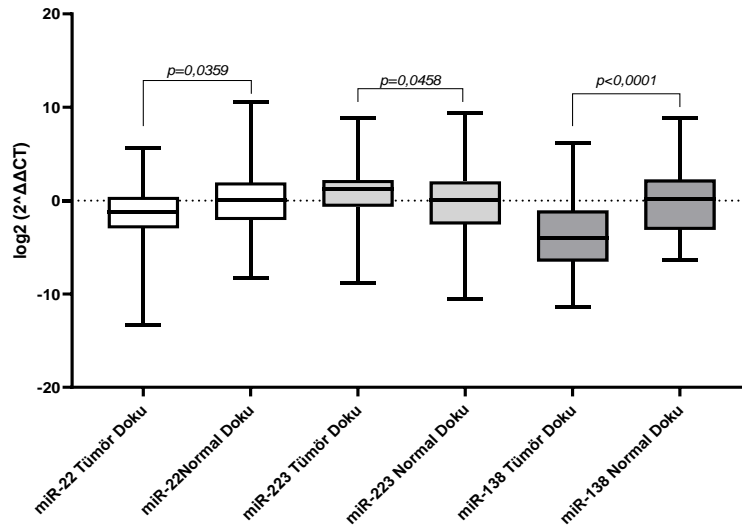


**Şekil-41 miR-223, miR-138 ve miR-22'in ifadelerinin  $\log_2(2^{\Delta\Delta CT})$  değerlerinin normalite dağılım grafiği**

İstatistiksel olarak tümör ve normal doku miRNA'lar açısından karşılaştırıldığında miR-22;  $p=0.0309$ , miR-138;  $p<0.0001$  ve miR-223;  $p=0.0458$  olarak analiz edilmiştir.  $p<0,05$  anlamlılık düzeyinde üç miRNA da tümör ve normal doku gen ifade değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi (Tablo 48).

**Tablo-48 MicroRNA'lara ait  $\log_2(2^{-\Delta\Delta CT})$  değerlerinin karşılaştırılması**

Test Edilen Parametreler		p Value	Yapılan Test
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-22 Tümör Doku)	$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-22 Normal Doku)	0,0309	Mann Whitney Testi
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-138 Tümör Doku)	$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-138 Normal Doku)	<0,0001	T-Testi
$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-223 Tümör Doku)	$\log_2(2^{\Delta\Delta CT}$ miR-223 Normal Doku)	0,0458	Mann Whitney Testi



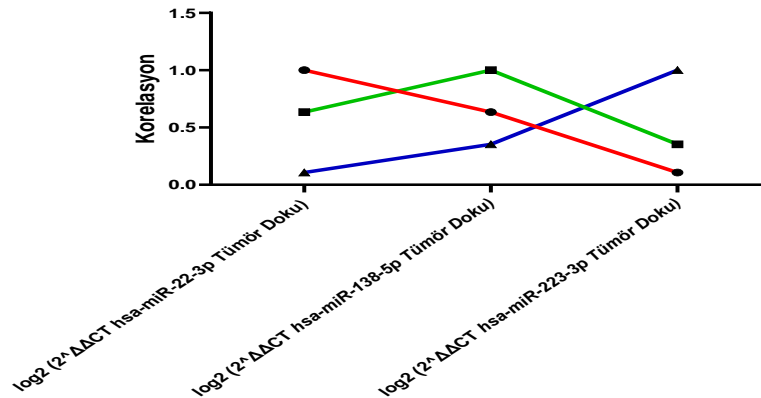
**Şekil-42 miR-22, miR-223 ve miR-138 miRNA ifadesinin t-testi sonuçları**

Aday biyobelirteç olarak seçilen genleri hedef alan miRNA'ların ifade düzeyleri arasındaki ilişkinin tespit edilmesi amacı ile korelasyon analizi yapılmıştır (Tablo 49). MiR-22 ile miR-138 arasında istatistiksel olarak anlamlı doğrusal bir ilişki mevcuttur ( $p<0.001$ , Spearman  $r: 0,634$ ). MiR-22 ile miR-223 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. ( $p=0.377$ , Spearman  $r: 0,106$ ). miR-223 ile

miR-138 arasında istatistiksel olarak anlamlı doğrusal bir ilişki mevcuttur ( $p= 0.002$ , Spearman  $r: 0,352$ ) (Şekil 43). En güçlü doğrusal ilişki miR-22 ile miR-138 arasında tespit edilmiştir.

**Tablo-49 miR-22, miR-138 ve miR-223 arasındaki korelasyon analiz sonuçları.**

		log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-22 Tümör Doku)	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-138 Tümör Doku)	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-223 Tümör Doku)
Korelasyon R	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-22 Tümör Doku)	1	0,634801579	0,106306246
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-138 Tümör Doku)	0,634801579	1	0,352577295
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-223 Tümör Doku)	0,106306246	0,352577295	1
P Value	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-22 Tümör Doku)	0	2,76344E-09	0,377583971
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-138 Tümör Doku)	2,76344E-09	0	0,002564579
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-223 Tümör Doku)	0,377583971	0,002564579	0
Güven Aralığı	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-22 Tümör Doku)	1,000 to 1,000	0,4713 to 0,7561	-0,1302 to 0,3314
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-138 Tümör Doku)	0,4713 to 0,7561	1,000 to 1,000	0,1300 to 0,5414
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-223 Tümör Doku)	-0,1302 to 0,3314	0,1300 to 0,5414	1,000 to 1,000

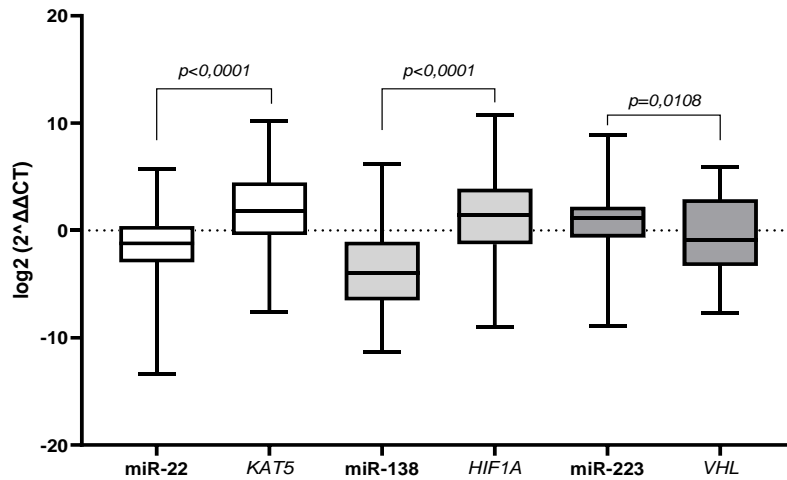


**Şekil-43 Tümör dokulara ait miR-22, miR-138 ve miR-223 genlerinin arasındaki korelasyon grafiği (Mavi Çizgi: miR-223 Yeşil Çizgi: miR-138 ve Kırmızı Çizgi: miR-22)**

Tümör doku örnekleri incelendiğinde her bir aday gen ve onu hedef alan miRNA istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 50). *VHL* ile miR-223 arasında karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ( $p=0.0108$ ). *HIF1A* ile miR-138 arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ( $p<0.0001$ ). *KAT5* ile miR-22 karşılaştırması da diğerleri gibi istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir ( $p<0.0001$ ) (Şekil 44).

**Tablo-50 Genler ile miRNA'ların t-testi analiz sonuçları**

Test Edilen Parametreler		p Value	Yapılan Test
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ VHL Tumor Doku})$	$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ miR-223 Tumor Doku})$	0,0108	Mann Whitney Testi
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ HIF1A Tumor Doku})$	$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ miR-138 Tumor Doku})$	<0,0001	T-Testi
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ KAT5 Tumor Doku})$	$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ miR-22 Tumor Doku})$	<0,0001	Mann Whitney Testi



**Şekil-44 A) miR-22 / HIF1A, miR-138 / HIF1A ve miR-223 / VHL ifadesinin t-testi grafiği**

MiR-22 ile *KAT5* değerlendirilmesi yapıldığında miR-22'in baskılanarak *HIF1A* ifadesinin arttığını görülmektedir. Yine aynı şekilde miR-138 ifadesi baskılanırken *HIF1A* ifadesi artış göstermektedir. Ancak *VHL* ve miR-223 arasındaki ilişkide tam tersi şekilde miRNA ifadesi artarak *VHL* gen ifadesini baskıladığı görüldü.



Herbir aday gen ve onu hedef alan miRNA arasındaki korelasyon ilişkisi açısından analiz edildiğinde, *VHL* ve miR-223 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p= 0,81$ ) (Tablo 51). *HIF1A* ve miR-138 arasındaki korelasyon analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p= 0,008$ ) (Tablo 52). Aralarındaki ilişki doğrusal olmayan yönde tespit edilmiştir. *HIF1A* gen ifadesi artarken bu geni hedefleyen ve baskılayan miR-138 ifade düzeyi azalma göstermektedir (Pearson  $r = -0,308$ ). *KAT5* ve miR-22 arasındaki korelasyon ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,0001$ ) (Tablo 53). *KAT5* ve onu hedefleyerek gen ifadesini baskılayan miR-22 arasında doğrusal olmayan bir ilişki tespit edilmiştir (Pearson  $r: -0,487$ ).

**Tablo-51 *VHL* ve miR-223 arasındaki korelasyon analizi sonucu**

		$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ miR-223 Tumor Doku})$	$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ VHL Tumor Doku})$
Korelasyon R	$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ miR-223 Tumor Doku})$	1	-0,027697031
	$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ VHL Tumor Doku})$	-0,027697031	1
P Value	$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ miR-223 Tumor Doku})$	0	0,818650671
	$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ VHL Tumor Doku})$	0,818650671	0
Güven	$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ miR-223 Tumor Doku})$	1,000 to 1,000	-0,2069 to 0,2593
	$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{ VHL Tumor Doku})$	-0,2069 to 0,2593	1,000 to 1,000

**Tablo-52 HIF1A ve miR-138 arasındaki korelasyon analizi sonucu**

		log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-138 Tümör Doku)	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> HIF1A Tümör Doku)
Korelasyon R	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-138 Tümör Doku)	1	-0,308417699
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> HIF1A Tümör Doku)	-0,308417699	1
P Value	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-138 Tümör Doku)	0	0,008876605
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> HIF1A Tümör Doku)	0,008876605	0
Güven Aralığı	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-138 Tümör Doku)	1,000 to 1,000	-0,5054 to -0,08094
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> HIF1A Tümör Doku)	-0,5054 to -0,08094	1,000 to 1,000

**Tablo-53 KAT5 ve miR-22 arasındaki korelasyon analizi sonucu**

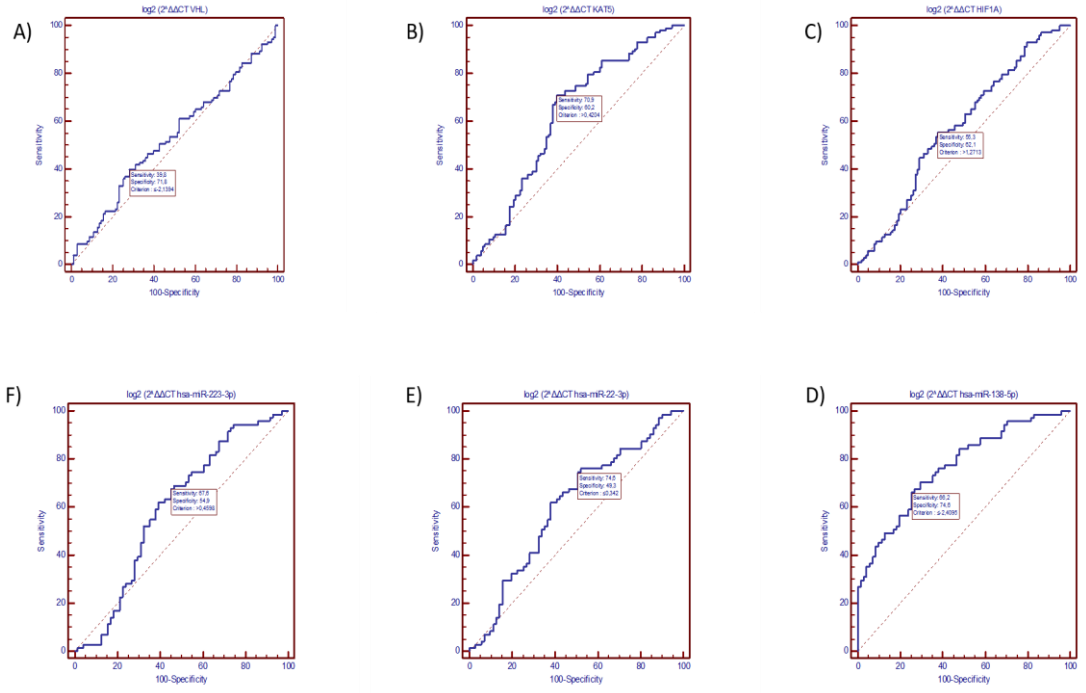
		log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-22 Tümör Doku)	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> KAT5 Tümör Doku)
Korelasyon R	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-22 Tümör Doku)	1	-0,487373698
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> KAT5 Tümör Doku)	-0,487373698	1
P Value	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-22 Tümör Doku)	0	1,62878E-05
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> KAT5 Tümör Doku)	1,62878E-05	0
Güven Aralığı	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> miR-22 Tümör Doku)	1,000 to 1,000	-0,6471 to -0,2867
	log <sub>2</sub> (2 <sup>ΔΔCT</sup> KAT5 Tümör Doku)	-0,6471 to -0,2867	1,000 to 1,000

Çalışma kapsamında yapılan bir diğer analiz ise roc curve yani eşik değeri belirleme analizidir. Bu analiz ile 100 hastaya ait olan tümör ve normal dokuların ifadesel verilerinin log<sub>2</sub> (2<sup>ΔΔCT</sup>) değerlerini kullanarak ifadesel değerlerdeki değişimlerin tümör ve normal doku arasında ayırım yapılabilmesi adına eşik değeri belirleme analizi yapılmıştır (Şekil 45). Sonuç olarak *VHL* gen ifadesi bakımından normal doku ile tümör doku arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememesinden dolayı istatistiksel olarak anlamlı bir eşik değeri saptanmamıştır ( $p=0,442$ ). *KAT5* için yapılan roc curve analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı eşik değeri  $>0,4204$  olarak tespit edilmiştir ( $p= 0,0009$ ). *KAT5* için yapılan roc curve analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı eşik değeri  $>1,27$  olarak tespit edilmiştir

( $p= 0,0401$ ). *HIF1A* gen ifadesi istatistiksel olarak tümör ve normal dokuda anlamlı derecede farklı bulunmuş olsa da bu fark *HIF1A* gen ifade düzeyine göre tümör ve normal doku arasında ayırım yapılabilecek bir değer tespiti için yeterli değildir ( $p=0,054$ ). Genleri hedef alan miRNA'lar için istatistiksel olarak anlamlı bir eşik değeri hesaplanmıştır. miR-223 için yapılan roc curve analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı eşik değeri  $>0,4598$  olarak tespit edilmiştir ( $p= 0.046$ ). MiR-138 için yapılan roc curve analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı eşik değeri  $\leq -2,4095$  olarak tespit edilmiştir ( $p<0,0001$ ). miR-22 için yapılan roc curve analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı eşik değeri  $\leq 0,342$  olarak tespit edilmiştir ( $p=0,028$ ) (Tablo 54).

**Tablo-54 Genler ve miRNA'ların roc curve analiz sonuçları**

Roc Curve Analizi				
Parametre	p Value	%95 Güven Aralığı	Standart Hata	Eşik Değeri
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} VHL)$	0,4429	0,460463 - 0,600747	0,0405	$\leq -2,1394$
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} HIF1A)$	0,0554	0,506181 - 0,645126	0,0401	$>1,2713$
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} KAT5)$	0,0009	0,560275 - 0,696171	0,0393	$>0,4204$
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{miR-223})$	0,0462	0,511581 - 0,678487	0,0487	$>0,4598$
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{miR-138})$	$<0,0001$	0,688223 - 0,833355	0,0391	$\leq -2,4095$
$\log_2 (2^{\Delta\Delta CT} \text{miR-22})$	0,0288	0,519410 - 0,685801	0,048	$\leq 0,342$



**Şekil-45 Genler ve miRNA'ların roc curve grafikleri (A:VHL, B: HIF1A, C: KAT5, D: miR-138, E: miR-223, F: miR-22)**

Proje kapsamına 100 hastaya ait cinsiyet, yaş, fuhrman derecesi, patolojik tümör evresi, büyüme paterni, renal kapsül invazyonu, Perirenal yağ doku invazyonu, tümör dışı böbrek, CK7, renal ven invazyonu, vimentin, CD10, EMA, LMWCK, CK19, masson trikrom, PAS, kongo red, işlem, PASM ve RCC olmak üzere yirmi bir farklı klinik parametre dahil edildi. Hastaların klinikopatolojik özellikleri ile gen ve miRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 55).

**Tablo-55 Klinik parametrelerin istatistiksel dağılım ve değerleri**

Klinik Parametre	Analiz Edilen Hasta Yüzdesi (%)	Standart Hata	Standart Sapma	Varyans
Cinsiyet	100	0,04943	0,49431	0,244
Fuhrman Derecesi	100	0,07961	0,79614	0,634
Patolojik Tümör Evresi	77	0,12410	1,08900	1,186
Büyüme Paterni	100	0,07189	0,71887	0,517
Renal Kapsül İnvazyonu	98	0,05067	0,50163	0,252
Perirenal Yağ Doku İnvazyonu	98	0,03656	0,36190	0,131
Tümör Dışı Böbrek	99	0,13343	1,32760	1,763
CK7	54	0,03597	0,26435	0,070
Renal Ven İnvazyonu	94	0,02722	0,26394	0,070
Vimentin	84	0,01190	0,10911	0,012
CD10	73	0,02339	0,19989	0,040
EMA	74	0,02308	0,19857	0,039
LMWCK	75	0,05787	0,50117	0,251
CK19	26	0,09515	0,48516	0,235
Masson Trikróm	25	0,10000	0,50000	0,250
PAS	26	0,09231	0,47068	0,222
Kongo Red	24	0,00000	0,00000	0,000
İşlem	96	0,22604	2,21468	4,905
PASM	22	0,04545	0,21320	0,045
RCC	32	0,06521	0,36890	0,136
VHL	100	0,04943	0,49431	0,244
HIF1A	100	0,04560	0,45605	0,208
HIF1A	100	0,05009	0,50091	0,251
miR-22	100	0,05200	0,43812	0,192
miR-138	100	0,05593	0,47131	0,222
miR-223	100	0,05527	0,46573	0,217

Öncelikle tüm klinik parametreler kendi içinde analiz edilmiştir. 21 farklı parametrede istatistiksel olarak anlamlı değerler tespit edilmiştir (Tablo 56). Yapılan analizde kategorik değişkenlerin arasındaki istatistiksel anlamlılık karşılaştırıldığı için ki-kare testi yapılmıştır. İkişer kategoriden oluşan iki klinik parametre karşılaştırılmasında 2X2'lik tablo sonucu Fisher's Exact Test sonuçları hesaba alınırken daha fazla kategoriden oluşan gruplarda Pearson ki-kare testi hesaba alınmıştır.

**Tablo-56 Klinik parametreler arasında ki- kare testi sonuçları (İstatiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilenler tabloya dahil edilmiştir.)**

CK19			Negatif	Pozitif	pValue	Yapılan Test			
Cinsiyet	Kadın	Miktar	6	3	0,02	Fisher's Exact Test			
		%	66,70%	33,30%					
	Erkek	Miktar	3	14					
		%	17,60%	82,40%					
Patolojik Tümör Evresi			pT1a	pT1b	pT2	pT3a	pValue	Yapılan Test	
Furhmann	1	Miktar	4	0	1	0	0	Pearson Chi-Square	
		%	80,00%	0,00%	20,00%	0,00%			
	2	Miktar	15	6	4	1			
		%	57,70%	23,10%	15,40%	3,80%			
	3	Miktar	4	14	11	9			
		%	10,50%	36,80%	28,90%	23,70%			
	4	Miktar	0	2	2	4			
		%	0,00%	25,00%	25,00%	50,00%			
Büyüme Paterni			Alveoler	Papiller	Solid	Multikistik	Multioküler	pValue	Yapılan Test
Furhmann	1	Miktar	9	0	0	1	0	0	Pearson Chi-Square
		%	90,00%	0,00%	0,00%	10,00%	0,00%		
	2	Miktar	30	1	1	1	1		
		%	88,20%	2,90%	2,90%	2,90%	2,90%		
	3	Miktar	46	1	0	0	0		
		%	97,90%	2,10%	0,00%	0,00%	0,00%		
	4	Miktar	5	0	4	0	0		
		%	55,60%	0,00%	44,40%	0,00%	0,00%		
Peri Renal Yağ Doku İnvazyonu			Pozitif	Negatif	pValue	Yapılan Test			
Furhmann	1	Miktar	0	10	0,0001	Pearson Chi-Square			
		%	0,00%	100,00%					
	2	Miktar	1	32					
		%	3,00%	97,00%					
	3	Miktar	9	37					
		%	19,60%	80,40%					
	4	Miktar	5	4					
		%	55,60%	44,40%					

Tablo-56'nın devamı

PASM			Negatif	Pozitif	pValue	Yapılan Test		
Furhmann	1	Miktar	2	0	0	Pearson Chi-Square		
		%	100,00%	0,00%				
	2	Miktar	4	0				
		%	100,00%	0,00%				
	3	Miktar	15	0				
		%	100,00%	0,00%				
	4	Miktar	0	1				
		%	0,00%	100,00%				
Büyüme Paterni			Alveoler	Papiller	Solid	Multikistik	pValue	Yapılan Test
Patolojik Tümör Evresi	pT1a	Miktar	22	0	0	1	0,004	Pearson Chi-Square
		%	95,70%	0,00%	0,00%	4,30%		
	pT1b	Miktar	21	1	0	0		
		%	95,50%	4,50%	0,00%	0,00%		
	pT2	Miktar	18	0	0	0		
		%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%		
	pT3a	Miktar	9	1	4	0		
		%	64,30%	7,10%	28,60%	0,00%		
Renal Kapsül İnvazyonu					Pozitif	Negatif	pValue	Yapılan Test
Patolojik Tümör Evresi	pT1a	Miktar	11	12	0	Pearson Chi-Square		
		%	47,80%	52,20%				
	pT1b	Miktar	5	17				
		%	22,70%	77,30%				
	pT2	Miktar	8	10				
		%	44,40%	55,60%				
	pT3a	Miktar	14	0				
		%	100,00%	0,00%				
Perirenal Yağ Doku İnvazyonu					Pozitif	Negatif	pValue	Yapılan Test
Patolojik Tümör Evresi	pT1a	Miktar	0	23	0	Pearson Chi-Square		
		%	0,00%	100,00%				
	pT1b	Miktar	0	22				
		%	0,00%	100,00%				
	pT2	Miktar	0	18				
		%	0,00%	100,00%				
	pT3a	Miktar	13	1				
		%	92,90%	7,10%				

**Tablo-56'nın devamı**

Renal Ven İnvazyonu			Pozitif	Negatif	pValue	Yapılan Test
Patolojik Tümör Evresi	pT1a	Miktar	0	23	0	Pearson Chi-Square
		%	0,00%	100,00%		
	pT1b	Miktar	0	22		
		%	0,00%	100,00%		
	pT2	Miktar	0	17		
		%	0,00%	100,00%		
	pT3a	Miktar	4	10		
		%	28,60%	71,40%		
Perirenal Yağ Doku İnvazyonu			Pozitif	Negatif	pValue	Yapılan Test
Büyüme Paterni	Alveoler	Miktar	9	79	0,0001	Pearson Chi-Square
		%	10,20%	89,80%		
	Papiller	Miktar	1	1		
		%	50,00%	50,00%		
	Solid	Miktar	5	0		
		%	100,00%	0,00%		
	Multikistik	Miktar	0	2		
		%	0,00%	100,00%		
	Miktar	0	1			
	%	0,00%	100,00%			
Perirenal Yağ Doku İnvazyonu			Pozitif	Negatif	pValue	Yapılan Test
Renal Kapsül İnvazyonu	Pozitif	Miktar	15	31	0,0001	Fisher's Exact Test
		%	32,60%	67,40%		
	Negatif	Miktar	0	52		
		%	0,00%	100,00%		
Renal Ven İnvazyonu			Pozitif	Negatif	pValue	Yapılan Test
Renal Kapsül İnvazyonu	Pozitif	Miktar	7	37	0,004	Fisher's Exact Test
		%	15,90%	84,10%		
	Negatif	Miktar	0	50		
		%	0,00%	100,00%		
RCC			Negatif	Pozitif	pValue	Yapılan Test
Renal Kapsül İnvazyonu	Pozitif	Miktar	5	10	0,018	Fisher's Exact Test
		%	33,30%	66,70%		
	Negatif	Miktar	0	16		
		%	0,00%	100,00%		

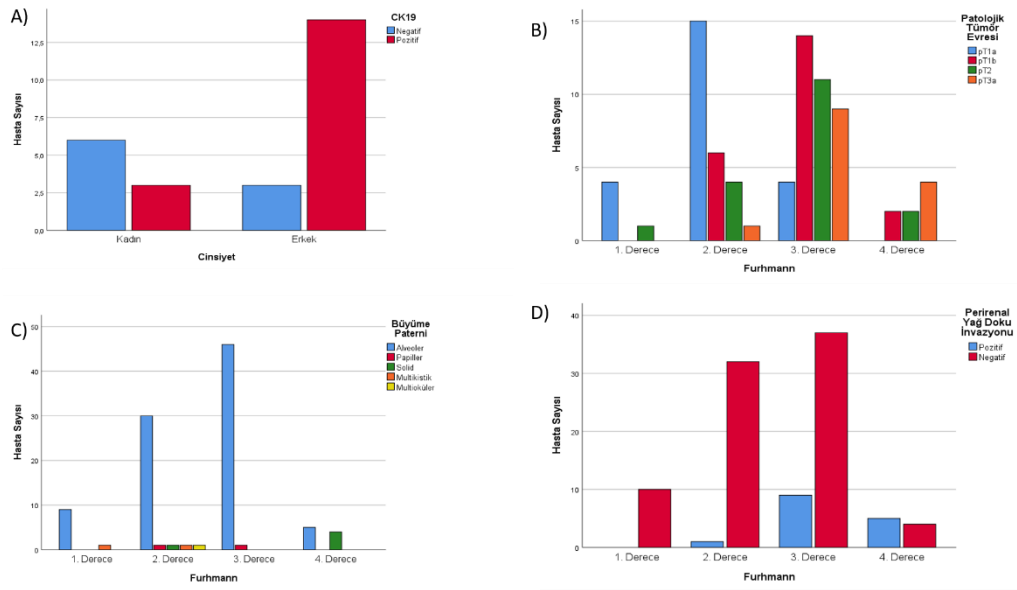


Tablo-56'nın devamı

Renal Ven İnvazyonu			Pozitif	Negatif	pValue	Yapılan Test			
Perirenal Yağ Doku İnvazyonu	Pozitif	Miktar	6	9	0,0001	Fisher's Exact Test			
		%	40,00%	60,00%					
	Negatif	Miktar	1	78					
		%	1,30%	98,70%					
Renal Ven İnvazyonu			Pozitif	Negatif	pValue	Yapılan Test			
Tümör Dışı Böbrek	Pozitif	Miktar	0	7	0,037	Pearson Chi-Square			
		%	0,00%	100,00%					
	Negatif	Miktar	5	67					
		%	6,90%	93,10%					
	Kalsifikasyon		1	0					
		Miktar	100,00%	0,00%					
	Tübüler Atrofi	%	0	2					
		Miktar	0,00%	100,00%					
	Renal Kist	%	1	9					
			10,00%	90,00%					
	Fibrozis	Miktar	0	1					
		%	0,00%	100,00%					
Kronik Enflamasyon	Miktar	0	1						
	%	0,00%	100,00%						
İşlem		Sağ Nefrektomi	Sağ Parsiyel Nefrektomi	Sağ Radikal Nefrektomi	Sol Parsiyel Nefrektomi	Parsiyel Nefrektomi	Sol Nefrektomi	Radikal Nefrektomi	
Renal Ven İnvazyonu	Pozitif	Miktar	1	0	3	0	0	0	
		%	16,70%	0,00%	50,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
	Negatif	Miktar	10	4	36	8	5	13	
		%	11,80%	4,70%	42,40%	9,40%	5,90%	15,30%	
	İşlem		Laparoskopik Sağ Radikal Nefrektomi	Nefrektomi	Laoroskopik Sol Nefrektomi	Sol Radikal Nefrektomi	pValue	Yapılan Test	
	Pozitif	Miktar	0	2	0	0	0,025	Pearson Chi-Square	
		%	0,00%	33,30%	0,00%	0,00%			
	Negatif	Miktar	4	1	1	1			
	%	4,70%	1,20%	1,20%	1,20%				
MassonTrikrom			Negatif	Pozitif	pValue	Yapılan Test			
LMWCK	Negatif	Miktar	10	2	0,01	Fisher's Exact Test			
		%	83,30%	16,70%					
	Pozitif	Miktar	3	8					
		%	27,30%	72,70%					

**Tablo-56'nın devamı**

PAS			Negatif	Pozitif	pValue	Yapılan Test		
Masson Trikrom	Negatif	Miktar	15	0	0,0001	Fisher's Exact Test		
		%	100,00%	0,00%				
	Pozitif	Miktar	3	7				
		%	30,00%	70,00%				
PAS			Negatif	Pozitif	pValue	Yapılan Test		
İşlem	Sağ Nefrektomi	Miktar	2	3	0,033	Pearson Chi-Square		
		%	40,00%	60,00%				
	Sağ Parsiyel Nefrektomi	Miktar	3	0				
		%	100,00%	0,00%				
	Sağ Radikal Nefrektomi	Miktar	9	2				
		%	81,80%	18,20%				
	Sol Parsiyel Nefrektomi	Miktar	1	0				
		%	100,00%	0,00%				
	Sol Nefrektomi	Miktar	0	3	0,00%	100,00%		
	%	0,00%	100,00%					
Tümör Dışı Böbrek		Pozitif	Negatif	Kalsifikasyon	Tübüler Atrofi	pValue	Yapılan Test	
Büyüme Paterni	Alveoler	Miktar	7	65	0	3	0,004	Pearson Chi-Square
		%	7,90%	73,00%	0,00%	3,40%		
	Papiller	Miktar	0	1	1	0		
		%	0,00%	50,00%	50,00%	0,00%		
	Solid	Miktar	0	5	0	0		
		%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%		
	Multikistik	Miktar	0	2	0	0		
		%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%		
	Multioküler	Miktar	0	1	0	0		
		%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%		
			<b>Renal Kist</b>	<b>Papiller Adenom</b>	<b>Fibrozis</b>	<b>Kronik Enflamasyon</b>		
	Alveoler	Miktar	11	1	1	1		
		%	12,40%	1,10%	1,10%	1,10%		
	Papiller	Miktar	0	0	0	0		
		%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		
	Solid	Miktar	0	0	0	0		
		%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		
	Multikistik	Miktar	0	0	0	0		
		%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		
	Multioküler	Miktar	0	0	0	0		
	%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%			



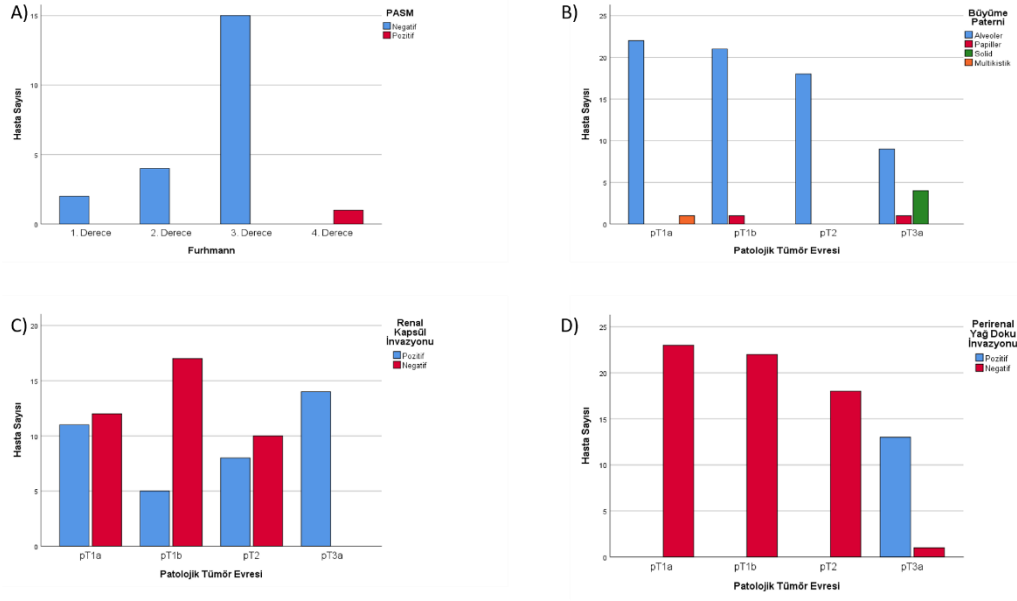
**Şekil-47 A) Cinsiyet ile CK19 arasındaki dağılım grafiği, B) Fuhrman ile Patolojik Tümör derecesi arasındaki dağılım grafiği, C) Fuhrman ile Büyüme Paterni arasındaki dağılım grafiği, D) Fuhrman ile Perirenal Yağ Doku İnvazyonu arasındaki dağılım grafiği**

Yapılan analizlerde görülmüştür ki, cinsiyet ile CK19 klinik parametresi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmaktadır ( $p= 0.02$ ). Erkek hastalarda CK19 değeri anlamlı derecede pozitif değer gösterirken kadın hastalarda CK19 değeri daha çok negatif değer almaktadır (Şekil 47).

Hastalara ait tümörlerin fuhrman derecelendirmesi ile patolojik tümör evresi değerlendirildiğinde iki derecelendirme sisteminin birlikte artma gösterdiği görülmektedir ( $p<0.0001$ ) (Şekil 47).

Hastalara ait tümörlerin fuhrman derecelendirmesi ile büyüme paterni karşılaştırıldığında, alveolar büyüme paterni ilk üç evrede artma gösterirken son evrede azalırken solid büyüme paterninin derecesi artma göstermektedir ( $p<0.0001$ ) (Şekil 47).

Hastalara ait tümörlerin fuhrman derecelendirmesi ile perirenal yağ doku invazyonu karşılaştırıldığında ilk üç evrede yağ invazyonu negatifliği yüksek iken dördüncü evrede yağ doku invazyonu daha sık görülmektedir ( $p=0.001$ ) (Şekil 47).



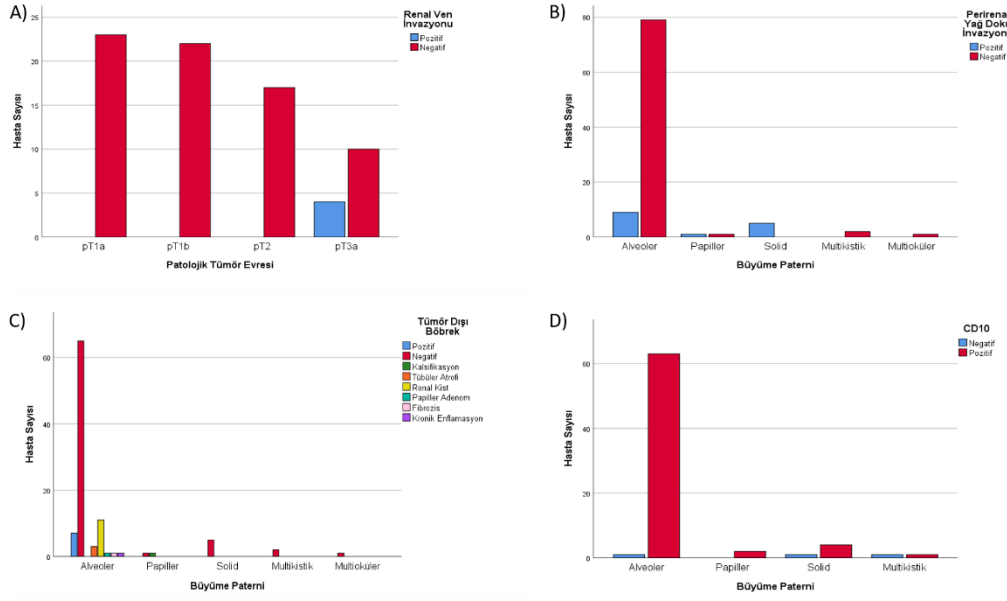
**Şekil-48 A) Fuhrman ile PASM arasındaki dağılım grafiği, B) Patolojik Tümör Evresi ile Büyüme Paterni arasındaki dağılım grafiği, C) Patolojik Tümör Evresi ile Renal Kapsül İnvazyonu arasındaki dağılım grafiği, D) Patolojik Tümör Evresi ile Perirenal Yağ Doku İnvazyonu arasındaki dağılım grafiği**

Fuhrman derecelendirmesi ile PASM karşılaştırıldığında ilk üç evrede artan bir PASM negatifliği görülürken sadece dördüncü evrede PASM pozitifliği negatifliğinden fazla olduğu görüldü ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 48).

Patolojik tümör evresi ile büyüme paterni karşılaştırıldığında alveolar tip ilk üç derecede artış gösterirken dördüncü evrede bir azalma göstermektedir ve dördüncü evrede solid büyüme paterni derecesi artma göstermektedir ( $p = 0.004$ ) (Şekil 48).

Patolojik tümör evresi ile renal kapsül invazyonu karşılaştırıldığında ilk üç evrede negatif olma durumu yüksek iken dördüncü evrede sadece pozitif olma durumu yüksek derecede görülmektedir ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 48).

Patolojik tümör evresi ile perirenal yağ doku invazyonu karşılaştırıldığında ilk üç evrede sadece üçüncü evreye doğru azalan bir negatiflik görülsede dördüncü evrede en düşük negatiflik ve ondan oranca yüksek derecede fazla olan pozitif perirenal yağ doku invazyonu görüldü ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 48).



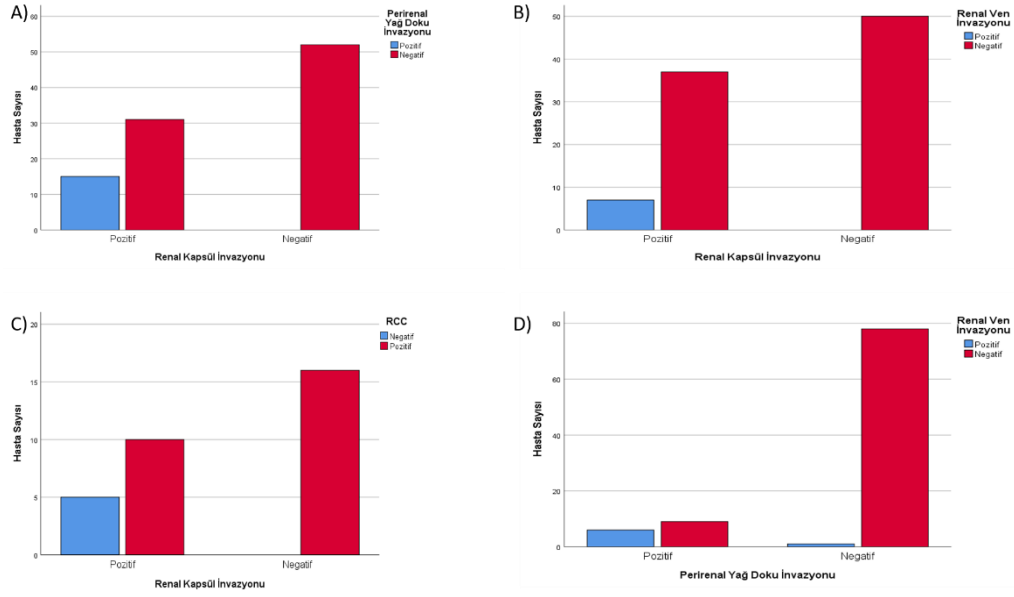
**Şekil-49 A) Patolojik Tümör Evresi ile Renal Ven İnvazyonu arasındaki dağılım grafiği, B) Büyüme Paterni ile Perirenal Yağ Doku İnvazyonu arasındaki dağılım grafiği. C) Büyüme Paterni ile Tümör Dışı Böbrek arasındaki dağılım grafiği D) Büyüme Paterni ile CD10 arasındaki dağılım grafiği**

Patolojik tümör evresi ile renal ven invazyonu karşılaştırıldığında evreler ilerledikçe negatiflikte düşme görülürken sadece son evrede bir miktar pozitiflik ve en düşük negatiflik görüldü ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 49).

Büyüme paterni ile perirenal yağ doku invazyonu karşılaştırıldığında alveolar grupta oldukça yüksek negatiflik görülürken diğer gruplarda bu oran değişerek pozitif ve negatif değerler birbirine oldukça yakın olarak görüldü ( $p = 0.0001$ ) (Şekil 49).

Büyüme paterni ile tümör dışı böbrek durumu karşılaştırıldığında alveolar grupta yüksek negatiflik görülürken diğer gruplarda bu oran korunamamıştır ( $p = 0.004$ ) (Şekil 49).

Büyüme paterni ile CD10 karşılaştırıldığında alveolar grupta çok yüksek pozitiflik görülürken diğer gruplarda bu oran korunmamıştır ( $p = 0.002$ ) (Şekil 49).



**Şekil-50 A) Renal Kapsül İnvazyonu ile Perirenal Yağ Doku İnvazyonu arasındaki dağılım grafiği, B) Renal Kapsül İnvazyonu ile Renal Ven İnvazyonu arasındaki dağılım grafiği, C) Renal Kapsül İnvazyonu ile RCC arasındaki dağılım grafiği, D) Perirenal Yağ Doku İnvazyonu ile Renal Ven İnvazyonu arasındaki dağılım grafiği**

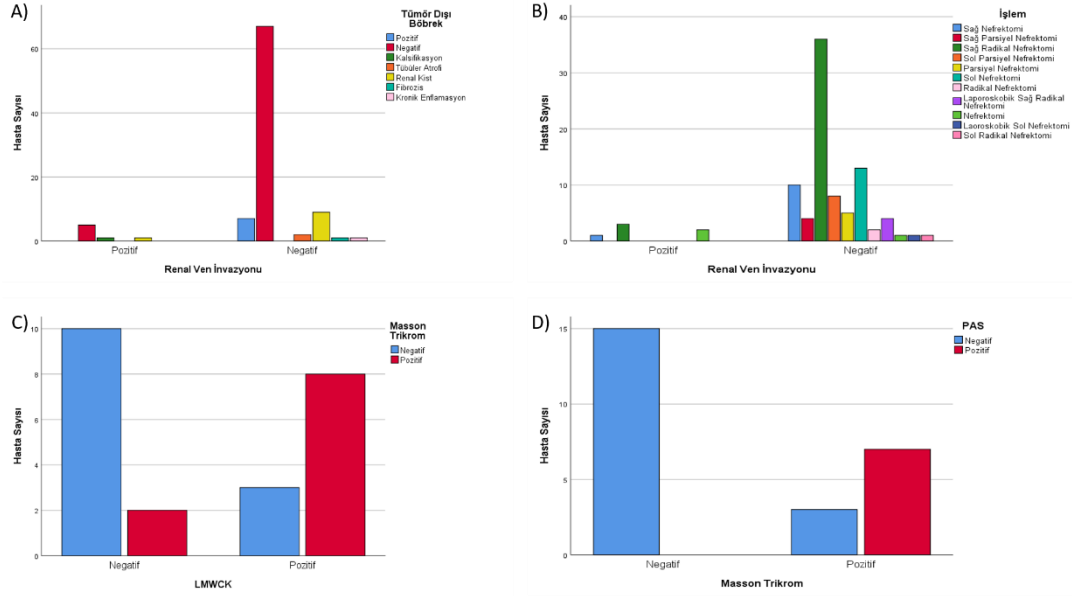
Renal kapsül invazyonu ile perirenal yağ doku invazyonu karşılaştırıldığında kapsül invazyonu pozitif grupta yağ doku invazyonu pozitif bireyler görülürken kapsül invazyonu negatif hastalarda hiç yağ doku invazyonu görülmemektedir ( $p= 0.0001$ ) (Şekil 50).

Renal kapsül invazyonu ile renal ven invazyonu karşılaştırıldığında kapsül invazyonu pozitif hastaların düşük bir oranında renal ven invazyonu görülürken kapsül invazyonu negatif hasta grubunda sadece yüksek oranda ven invazyonu negatif vaka vardır ( $p= 0.004$ ) (Şekil 50).

Renal kapsül invazyonu ile RCC karşılaştırıldığında kapsül invazyonu pozitif grupta oranı düşük olmakla birlikte RCC negatif hastalar bulunmaktadır ancak kapsül invazyonu negatif grupta sadece RCC pozitif hastalar bulunmaktadır ( $p=0.018$ ) (Şekil 50).

Perirenal yağ doku invazyonu ile renal ven invazyonu karşılaştırıldığında yağ doku invazyonu pozitif grupta yakın oranlarda olmakla negatif ven invazyonu daha fazladır ancak yağ doku invazyonu negatif olan grupta bu oran bozularak ven

invazyonu negatif olan hasta grubu pozitifte göre fazla olduğu görüldü ( $p= 0.0001$ ) (Şekil 50).



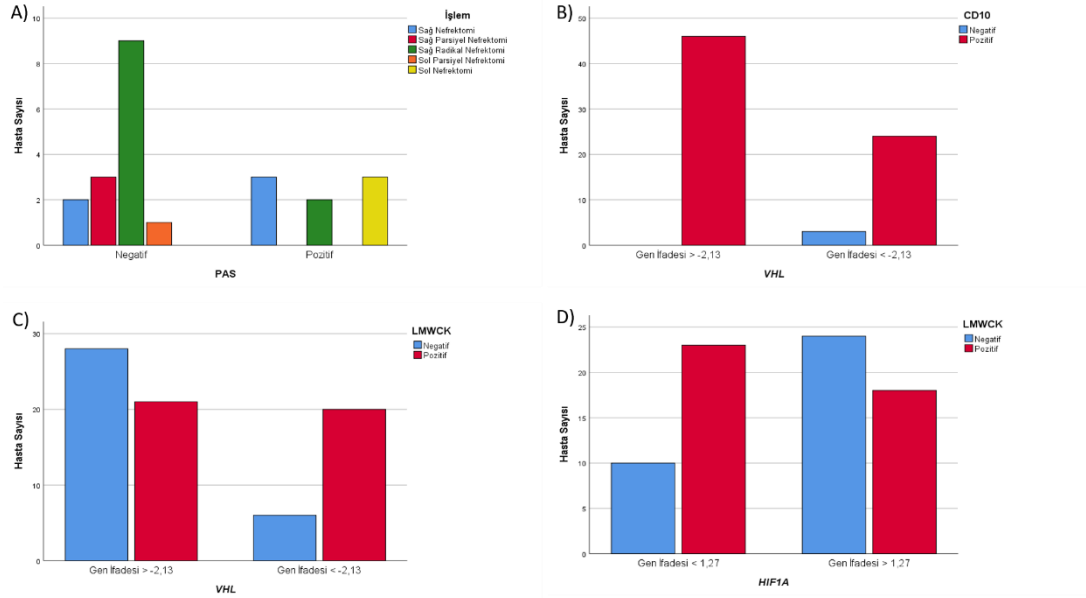
**Şekil-51 A) Renal Ven İnvazyonu ile Tümör Dışı Böbrek arasındaki dağılım grafiği, B) Renal Ven İnvazyonu ile Hastalara uygulanan işlem arasındaki dağılım grafiği, C) LMWCK ile Masson Trikrom arasındaki dağılım grafiği, D) Masson Trikrom ile PAS arasındaki dağılım grafiği**

Renal ven invazyonu ile tümör dışı böbrek durumu karşılaştırıldığında ven invazyonu pozitif grupta, düşük oranlarda tümör dışı böbrek negatifliği, klasifikasyon ve renal kist yapısı görülürken, ven invazyonu negatif grupta çok yüksek derecede negatif tümör dışı böbrek, düşük oranda pozitif tümör dışı böbrek ve düşük oranda renal kist yapısı görüldü ( $p=0.037$ ) (Şekil 51).

Renal ven invazyonu ile hastalara uygulanan cerrahi işlem türü karşılaştırıldığında ven invazyonu pozitif hastalarda düşük oranlarda nefrektomi, radikal nefrektomi görülürken ven invazyonu negatif grupta çok yüksek oranda radikal nefrektomi ve normal nefrektomi görüldü ( $p= 0.025$ ) (Şekil 51).

LMWCK ile massom trikrom karşılaştırıldığında LMWCK negatif grupta masson trikrom negatif iken LMWCK pozitif grupta masson trikrom pozitif değer almakta olduğu görüldü ( $p= 0.01$ ) (Şekil 51).

Masson trikrom ile PAS karşılaştırıldığında masson negatif grupta PAS sadece negatif değer alırken pozitif grupta pozitif değer oranı negatife göre yüksektir olduğu tespit edildi ( $p=0.0001$ ) (Şekil 51).



**Şekil-52 A) PAS ile Hastalara uygulanan işlem arasındaki dağılım grafiği, B) VHL gen ifadesi ile CD10 arasındaki dağılım grafiği, C) VHL gen ifadesi ile LMWCK arasındaki dağılım grafiği, D) HIF1A gen ifadesi ile LMWCK arasındaki dağılım grafiği**

PAS ile hastalara uygulanan işlem karşılaştırıldığında PAS negatif grupta daha yüksek sayıda radikal nefrektomi uygulanırken, PAS pozitifte nefrektomi ile radikal nefrektomi değerleri birbirine oldukça yakın ve ek olarak radikal nefrektomi normal nefrektomi oranından düşük olduğu analiz edildi ( $p= 0,033$ ) (Şekil 52).

Klinik parametreler kendi aralarında istatistiksel olarak değerlendirme yapıldıktan sonra, öncelikle roc curve analizine göre belirlenen eşik değerlerine göre gruplara ayrılan gen ve miRNA ifadelerinin klinik parametreler ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı analiz edildi (Tablo 57).



**Tablo-57 VHL, HIF1A, KAT5, miR-22, miR-138 ve miR-223 ifade düzeylerinin klinik parametreler ile ilişkisi**

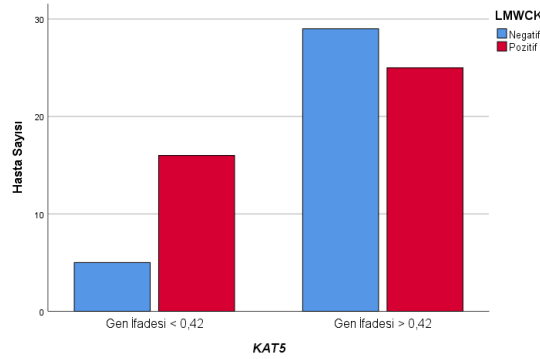
	VHL	HIF1A	KAT5	miR-22	miR-138	miR-223	Yapılan Test
Cinsiyet	0,55	0,44	0,27	0,38	0,34	0,34	Fisher's Exact Test
Fuhrman Derecesi	0,13	0,15	0,26	0,11	0,20	0,99	Pearson Chi-Square
Patolojik Tümör Evresi	0,76	0,30	0,08	0,07	0,96	0,75	Pearson Chi-Square
Büyüme Paterni	0,58	0,51	0,42	0,60	0,23	0,89	Pearson Chi-Square
Renal Kapsül İnvazyonu	0,46	0,17	0,35	0,54	0,56	0,19	Fisher's Exact Test
Perirenal Yağ Doku İnvazyonu	0,37	0,36	0,47	0,15	0,51	0,24	Fisher's Exact Test
Tümör Dışı Böbrek	0,48	0,52	0,44	0,30	0,28	0,58	Pearson Chi-Square
CK7	0,17	0,51	0,68	0,17	0,38	0,56	Fisher's Exact Test
Renal Ven İnvazyonu	0,62	0,45	0,63	0,51	0,36	0,61	Fisher's Exact Test
Vimentin	0,37	0,57	0,74	0,74	0,32	0,66	Fisher's Exact Test
CD10	0,05	0,07	0,53	0,43	0,34	0,28	Fisher's Exact Test
EMA	0,70	0,18	0,45	0,57	0,46	0,59	Fisher's Exact Test
LMWCK	0,00	0,02	0,02	0,42	0,56	0,28	Fisher's Exact Test
CK19	0,30	0,41	0,58	0,32	0,43	0,45	Fisher's Exact Test
Masson Trikrom	0,60	0,39	0,53	0,23	0,57	0,56	Fisher's Exact Test
PAS	0,64	0,48	0,64	0,73	0,63	0,63	Fisher's Exact Test
Kongo Red	-	-	-	-	-	-	-
İşlem	0,61	0,22	0,85	0,53	0,91	0,94	Pearson Chi-Square
PASM	0,23	727,00	0,86	0,75	0,75	0,38	Fisher's Exact Test
RCC	0,37	0,38	0,38	0,66	0,44	0,28	Fisher's Exact Test
Yaş	0,26	0,05	0,38	0,10	0,18	0,57	Fisher's Exact Test

Yirmi bir klinik parametre içerisinde dört adet başlık ifade düzeyleri ile istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermiştir. VHL gen ifadesi -2.13'ten büyük olduğu grupta CD10 sadece pozitif değer alırken -2.13'ten küçük olduğu grupta negatif aldığı değerler de mevcut olduğu görüldü ( $p=0.047$ ) (Şekil 52).

VHL gen ifadesi LMWCK ile karşılaştırıldığında gen ifadesi -2.13'ten büyük olduğu grupta LMWCK yüksek oranda negatif iken -2.13'ten küçük olduğu grupta yüksek oranda pozitif olduğu saptandı ( $p=0.004$ ) (Şekil 52).

LMWCK ile *HIF1A* gen ifadesi karşılaştırıldığında <1.27 iken LMWCK yüksek oranda pozitif, >1.27 iken yüksek oranda negatif olarak hesaplandı ( $p=0.018$ ) (Şekil 52).

*HIF1A* gen ifadesi LMWCK ile karşılaştırıldığında, gen ifadesi <0.42 iken LMWCK sadece pozitif değer alırken, >0,42 iken yüksek oranda negatif değer aldığı tespit edildi ( $p=0.018$ ) (Şekil 53).



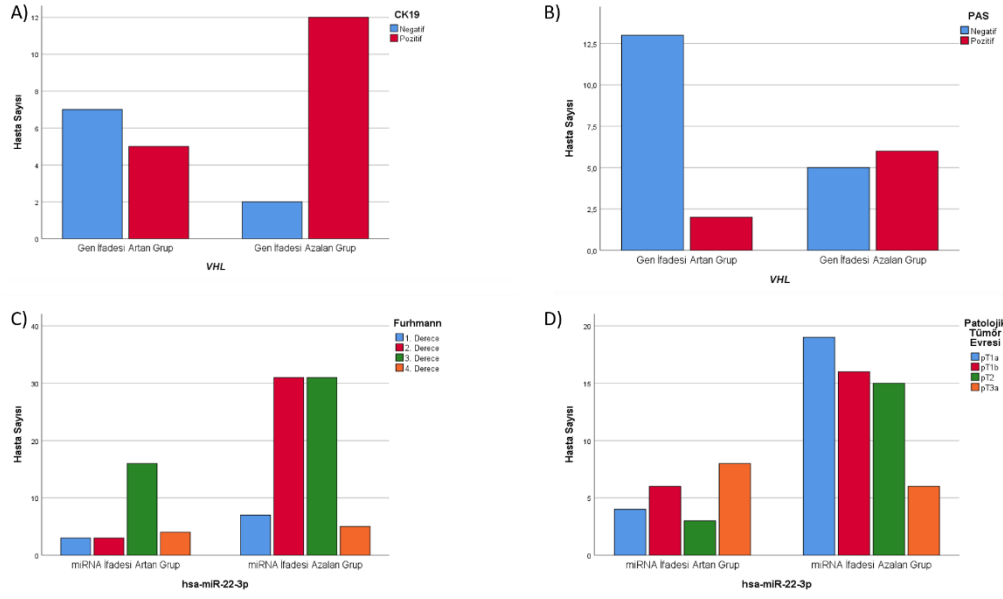
**Şekil-53 KAT5 gen ifadesi ile LMCWK arasındaki dağılım grafiği**

Yapılan roc curve analizi ile elde edilen eşik değerleri *VHL* ve *HIF1A*'da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ancak, *KAT5* ve miRNA ifadelerinde anlamlılık mevcuttur. Bu bulgular ışığında klinik parametreler ile yapılan karşılaştırmalarda eşik değeri anlamlı olan gruplarda klinik açıdan *KAT5* ve LMWCK arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark dışında bir veri elde edilmemiştir. Bu konuda ek olarak gen ve miRNA ifadeleri tümör dokulardaki artma ve azalmasına göre iki gruba ayrılarak klinik parametreler ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Tablo 58).

**Tablo-58 VHL, HIF1A, KAT5, miR-22, miR-138 ve miR-223 ifade düzeylerinin artma ve azalmasına göre klinik parametreler ile ilişkisi**

	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	miR-22	miR-138	miR-223	Yapılan Test
<b>Cinsiyet</b>	0,168	0,458	0,42	0,07	0,22	0,197	Fisher's Exact Test
<b>Fuhrman Derecesi</b>	0,812	0,35	0,441	0,037	0,582	0,239	Pearson Chi-Square
<b>Patolojik Tümör Evresi</b>	0,588	0,416	0,076	0,038	0,105	0,306	Pearson Chi-Square
<b>Büyüme Paterni</b>	0,631	0,638	0,506	0,704	0,365	0,617	Pearson Chi-Square
<b>Renal Kapsül İnvazyonu</b>	0,525	0,434	0,298	0,555	0,603	0,418	Fisher's Exact Test
<b>Perirenal Yağ Doku İnvazyonu</b>	0,55	0,495	0,603	0,003	0,05	0,204	Fisher's Exact Test
<b>Tümör Dışı Böbrek</b>	0,23	0,493	0,346	0,506	0,056	0,578	Pearson Chi-Square
<b>CK7</b>	0,636	0,138	0,726	0,627	0,571	0,694	Fisher's Exact Test
<b>Renal Ven İnvazyonu</b>	0,405	0,478	0,373	0,089	0,309	0,061	Fisher's Exact Test
<b>Vimentin</b>	0,476	0,667	0,762	0,714	0,821	0,726	Fisher's Exact Test
<b>CD10</b>	0,136	0,685	0,53	0,665	0,421	0,399	Fisher's Exact Test
<b>EMA</b>	0,562	0,284	0,451	0,595	0,583	0,192	Fisher's Exact Test
<b>LMWCK</b>	0,567	0,322	0,253	0,484	0,461	0,306	Fisher's Exact Test
<b>CK19</b>	0,025	0,302	0,569	0,587	0,431	0,255	Fisher's Exact Test
<b>Masson Trikrom</b>	0,183	0,455	0,468	0,607	0,654	0,313	Fisher's Exact Test
<b>PAS</b>	0,034	0,101	0,498	0,191	0,314	0,622	Fisher's Exact Test
<b>Kongo Red</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>İşlem</b>	0,449	0,171	0,29	0,406	0,72	0,227	Pearson Chi-Square
<b>PASM</b>	0,545	0,773	0,818	0,318	0,864	0,172	Fisher's Exact Test
<b>RCC</b>	0,563	0,683	0,572	0,673	0,512	0,162	Fisher's Exact Test
<b>Yaş</b>	0,506	0,318	0,109	0,211	0,26	0,032	Fisher's Exact Test

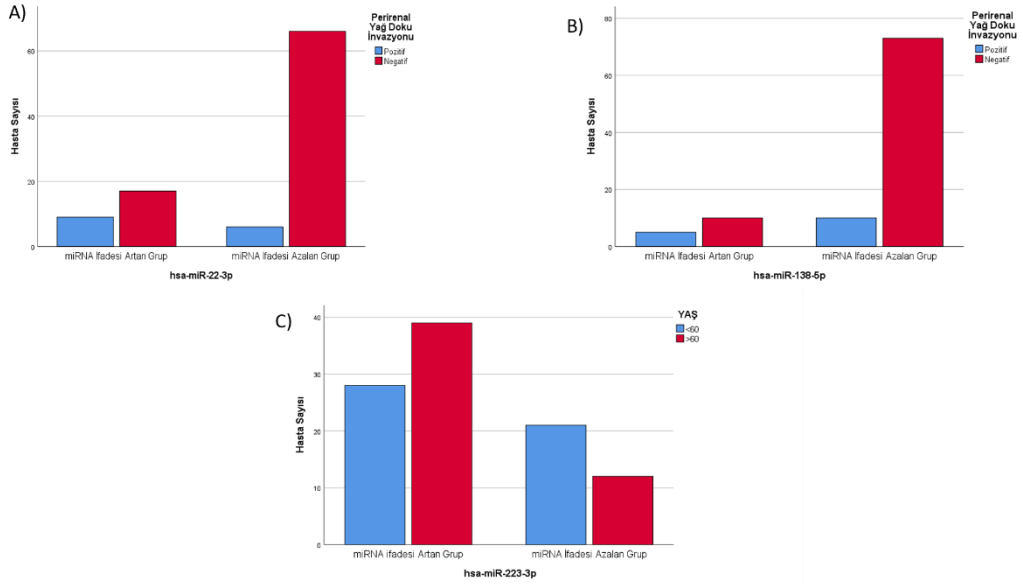
*VHL* gen ifadesi ile CK19 karşılaştırıldığında, gen ifadesi artan grupta CK19 büyük oranda negatif iken *VHL* ifadesinin azaldığı grupta CK19 çok yüksek oranda pozitif olduğu analiz edildi ( $p= 0.025$ ).



**Şekil-54 A) *VHL* gen ifadesi ile CK19 arasındaki dağılım grafiği, B) *VHL* gen ifadesi ile PAS arasındaki dağılım grafiği, C) miR-22 ifadesi ile Fuhrman derecelendirmesi arasındaki dağılım grafiği, D) miR-22 ifadesi ile Patolojik Tümör Evresi arasındaki dağılım grafiği**

*VHL* gen ifadesi ile PAS karşılaştırıldığında gen ifadesi artan grupta PAS büyük oranda negatif iken *VHL* ifadesinin azaldığı grupta PAS nispeten yüksek oranda pozitif olduğu saptandı ( $p=0.034$ ) (Şekil 54).

miR-22 ile Fuhrman derecelendirmesi karşılaştırıldığında, miRNA ifadesi artan grupta 3. derecede artış gözlemlenirken miR-22 ifadesinin azaldığı grupta 2. ve 3. derece yüksek değerler aldığı görüldü ( $p=0.037$ ) (Şekil 54). miR-22 ile patolojik tümör evresi karşılaştırıldığında, miRNA ifadesi artan grupta yüksek evre hasta sayısı fazla iken miRNA ifadesi düşen grupta ilk evredeki hasta sayıları daha yüksek olduğu saptandı ( $p=0.038$ ) (Şekil 54). MiR-22 ile perirenal yağ doku invazyonu karşılaştırıldığında miRNA ifadesi artan grupta negatiflik pozitifliğe göre çok düşük oranda yüksek iken miRNA ifadesi azalan grupta perirenal yağ doku invazyonu oldukça yüksek oranda negatif değer almadığı saptandı ( $p=0.003$ ) (Şekil 55).



**Şekil-55 A) miR-22 ifadesi ile Perirenal Yağ Doku İnvazyonu arasındaki dağılım grafiği, B) miR-138 ifadesi ile Perirenal Yağ Doku İnvazyonu arasındaki dağılım grafiği, C) miR-223 ifadesi ile Yaş dağılımı arasındaki dağılım grafiği**

miR-138 ile perirenal yağ doku invazyonu karşılaştırıldığında ise, miRNA ifadesi artan grupta negatiflik pozitifliğe göre çok düşük oranda yüksek iken miRNA ifadesi azalan grupta perirenal yağ doku invazyonu oldukça yüksek oranda negatif değer aldığı görüldü ( $p= 0.05$ ) (Şekil 55).

miR-223 ile yaş karşılaştırıldığında miRNA ifadesi artan grupta 60 yaşından büyükler daha fazla yer alırken miRNA ifadesi azalan grupta 60 yaş altı hastalar daha fazla yer aldığı analiz edildi ( $p= 0.032$ ) (Şekil 55).

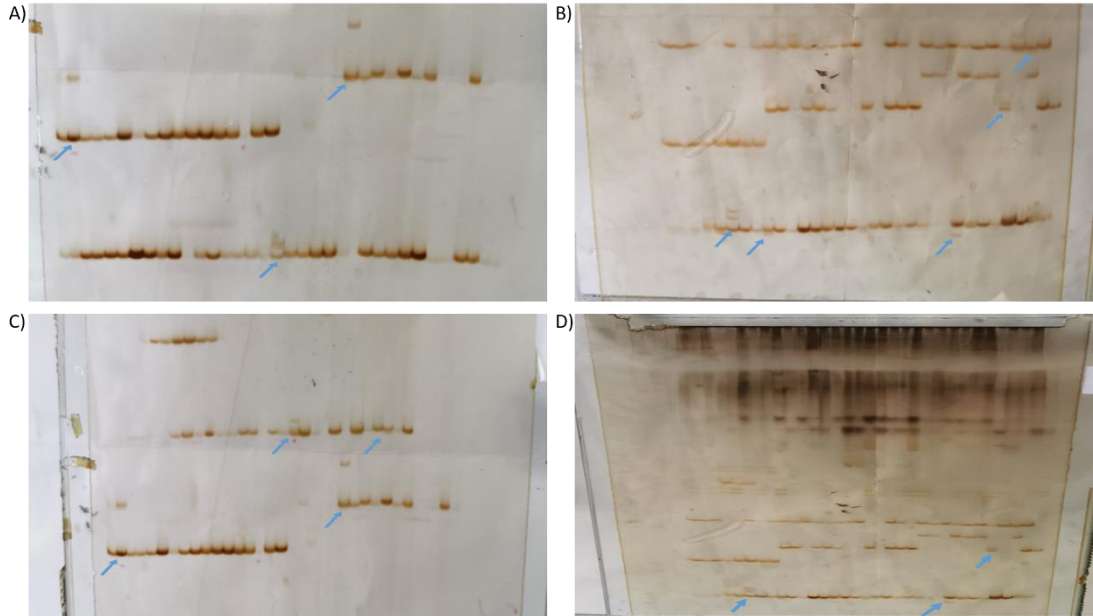
100 hastanın geneline bakıldığında *VHL* gen ifadesi yaklaşık hastaların yarısında arttığı diğer yarısında azaldığı tespit edildi. Ancak, diğer gen ve miRNA ifade seviyeleri artma ve azalmada kümeleşme gösterdiği tespit edildi (Tablo 59).

**Tablo-59 Hastaların gen ve miRNA ifadelerinin artma-azalma verileri**

<b>VHL</b>	<b>Sayı</b>	<b>%</b>	<b>miR-22</b>	<b>Sayı</b>	<b>%</b>
İfadesinde Artma	46	46	İfadesinde Artma	26	26
İfadesinde Azalma	54	54	İfadesinde Azalma	74	74
<b>HIF1A</b>	<b>Sayı</b>	<b>%</b>	<b>miR-138</b>	<b>Sayı</b>	<b>%</b>
İfadesinde Artma	64	64	İfadesinde Artma	15	15
İfadesinde Azalma	36	36	İfadesinde Azalma	85	85
<b>KAT5</b>	<b>Sayı</b>	<b>%</b>	<b>miR-223</b>	<b>Sayı</b>	<b>%</b>
İfadesinde Artma	73	73	İfadesinde Artma	67	67
İfadesinde Azalma	27	27	İfadesinde Azalma	33	33

#### 4.4. HDA ve Sekans Analiz Sonuçları

Gen ve miRNA ifadelerinin değerlendirilmesi sonrasında hastalıkta etken gen olarak tanımlanmış *VHL* geni için 100 hastanın tümör dokusundan elde edilen DNA örneklerine HDA yapıldı (Şekil 56).



**Şekil-56 A, B, C ve D şekillerinde HDA sonucu poliakrilamit jel görüntülerinde saptanan bantlar**

**Tablo-60 Hetero dublex analizi sonucu elde edilen bantlar**

Hasta No	Ekzon 1A	Ekzon 1B	Ekzon 2	Ekzon 3
1		☰		
2	☰	☰		
5		—	☰	
6		—		
11			☰	
12			☰	
14			☰	
15	☰			
20				☰
21		☰		
22		☰		
23		☰		
31		☰		—
38		☰		

**Tablo-60'in devamı**

Hasta No	Ekzon 1A	Ekzon 1B	Ekzon 2	Ekzon 3
49		☐☐		
50			☐☐☐	
51	☐☐☐			
54		☐☐		
57		☐☐		
58	☐			
63	☐☐☐		☐☐	
70	☐☐	☐☐	☐☐	
74			☐☐	☐☐
88	☐			
89	☐		☐	
90	☐			
93	☐			
95		☐☐	☐☐	



Tablo-60'ın devamı

Hasta No	Ekzon 1A	Ekzon 1B	Ekzon 2	Ekzon 3
96		☰	☰	
		☰		
98		☰		
78		☰		—
86		☰		
91	—			
92	—			
53			☰	
73		☰		
97			☰	
100			☰	

HDA sonucu 38 hasta farklı bant özelliği tespit edildi. Bazı hastalarda birden fazla değişim görüldü (Tablo 60). Aşağıdaki tabloda ise bant türlerine göre her ekzondaki değişim türleri sınıflandırılmıştır. Bu işlem sonucunda *VHL* ekzon 1A için 5, 1B için 5, ekzon 2 için 3 ve ekzon 3 için 2 farklı bant tespit edildi (Tablo 61).

**Tablo-61 Saptanan farklı bantların kategorize şekli**

Hasta No	Ekzon 1A	Ekzon 1b	Ekzon 2	Ekzon 3
1	X	3	X	X
2	1	3	X	X
5	X	1	1	X
6	X	1	X	X
11	X	X	1	X
12	X	X	2	X
14	X	X	1	X
15	1	X	X	X
20	X	X	X	1
21	X	2	X	X
22	X	4	X	X
23	X	4	X	X
31	X	3	X	2
38	X	4	X	X
49	X	2	X	X
50	X	X	2	X
51	2	X	X	X
54	X	4	X	X
57	X	2	X	X
58	3	X	X	X
63	2	X	1	X
70	5	4	1	X
74	X	X	1	1
88	4	X	X	X
89	4	X	3	X
90	4	X	X	X
93	3	4	X	X
95	X	4	1	X
96	X	5	2	X
98	X	2	X	X
78	X	4	X	2
86	X	4	X	X
91	4	X	X	X
92	4	X	X	X
53	X	X	1	X
73	X	2	X	X
97	X	X	1	X
100	X	X	2	X

HDA sonucu saptanan 15 farklı bant değişimlerinin tespiti için sekans analizi yapılmıştır. Sekans reaksiyonu kapsamında 3 ekzondan oluşan *VHL* geni 4 primer çifti ile bölünerek okutmalar yapılmıştır. 1. Ekzon'daki baz sayısı fazla olduğu için iki farklı primer çifti kullanılarak ekzon iki parçaya bölünerek okutulmuştur (Tablo 62).

**Tablo-62 Sekans analizi için kullanılan primer çiftleri**

Primer Dizisi
<b>Ekzon 1A</b>
<b>F:</b> GTCTGGATCGCGGAGGGAAT
<b>R:</b> GGACTGCGATTGCAGAAGAT
<b>Ekzon 1B</b>
<b>F:</b> TGCCTCGGTGAACTCGCGCGA
<b>R:</b> TTCAGACCGTGCTATCGTCC
<b>Ekzon 2</b>
<b>F:</b> CACCGGTGTGGCTCTTTAAC
<b>R:</b> TGGGCTTAATTTTCAAGTGG
<b>Ekzon 3</b>
<b>F:</b> GCAAAGCCTCTGTTCGTTC
<b>R:</b> CCATCAAAAAGCTGAGATGAAA

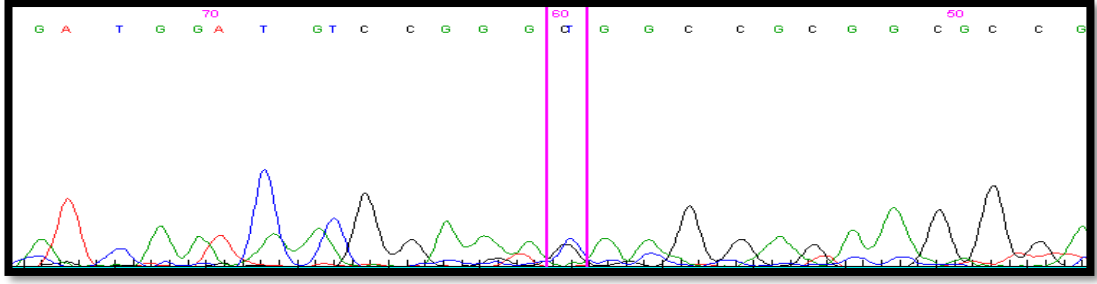
Yapılan sekans analizi ışığında tabloda belirtilen değişimler tespit edilmiştir (Tablo 63). Ancak parafin dokudan elde edilen DNA kaliteleri hasta materyalinin eskiliği ile doğru orantılıdır. Eski kayıtlı hasta örnekleri ne yazık ki istenilen kalitede okuma yapılmasına engel olmaktadır. Bu nedenle ekzon 1B'de 1. Tip değişim ve ekzon 2'deki 3 farklı değişim saptanan hastaların parafin dokularından sekans analizi yapılacak kalitede DNA elde edilememiştir.

**Tablo-63 VHL geninde HDA sonucu tespit edilen 15 farklı değişimin sekans sonuçları**

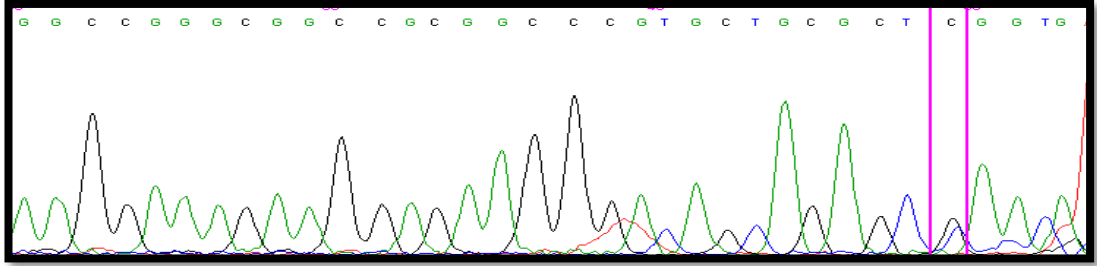
Saptanan Değişimler	
<b>Ekzon 1A</b>	
1. Tip Değişim	Rs757781272
2. Tip Değişim	Rs5030826
3. Tip Değişim	Kromozom 3:10141907 C>A
4. Tip Değişim	Normal
5. Tip Değişim	Normal
<b>Ekzon 1B</b>	
1. Tip Değişim	X
2. Tip Değişim	Normal
3. Tip Değişim	Rs864622545
4. Tip Değişim	Normal
5. Tip Değişim	CI073785
<b>Ekzon 2</b>	
1. Tip Değişim	X
2. Tip Değişim	X
3. Tip Değişim	X
<b>Ekzon 3</b>	
1. Tip Değişim	Rs1131690962
2. Tip Değişim	Kromozom 3: 10149790 Del A

HDA görüntüsünde farklı bant özelliği tespit edilen 15 farklı hasta DNA'sının 11 tanesinin sekans verileri değerlendirilecek kalitede elde edildi. HDA sonucunda farklı bant görülen ekzon 1A'da tip bir ve iki, ekzon 1B'de tip iki sekans analizi sonucunda bir değişim içermedikleri tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil-57'de gösterilmektedir.

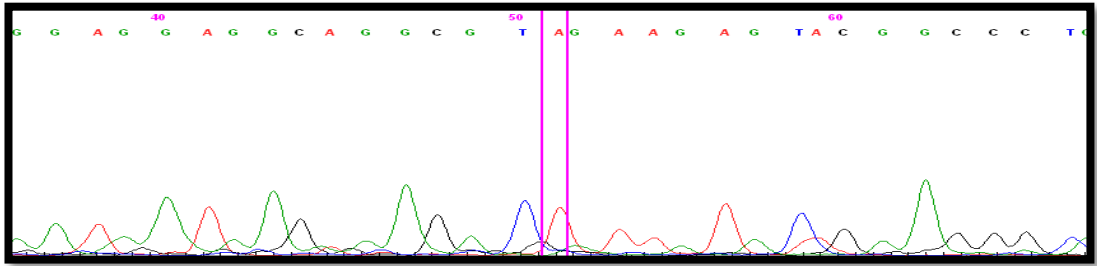
A)



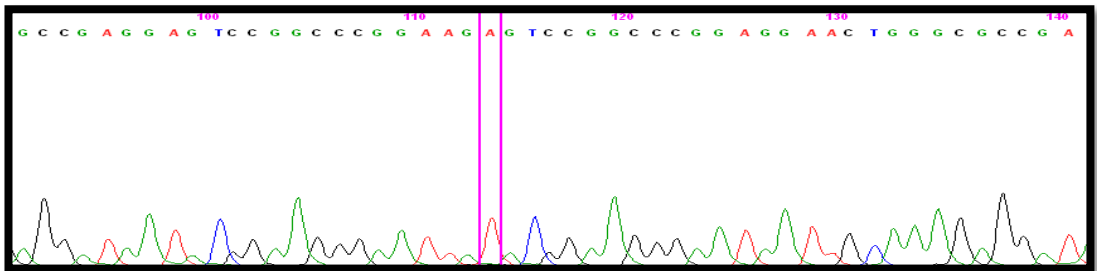
B)



C)

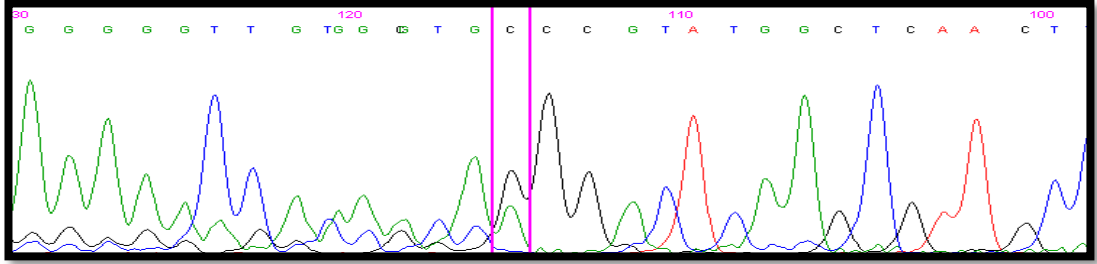


D)

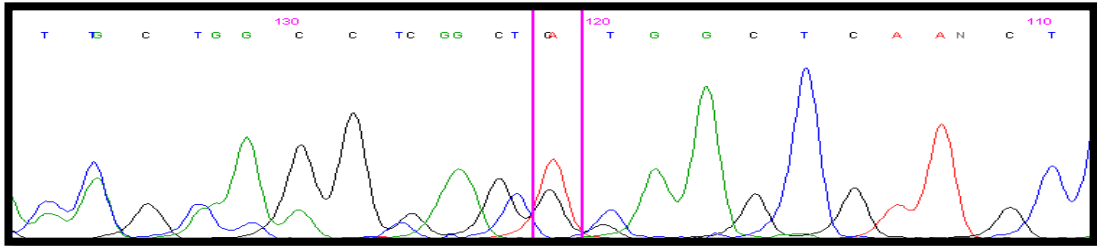


**Şekil-57 100 BHTRHK hastasında Sekans analizi sonucu tespit edilen değişimler A) RS757781272, B) RS5030826, C) Kromozom 3:10141907 C>A, D) NORMAL, E) RS864622545, F) CI073785 INSERION C, G) RS1131690962, H) Kromozom 3: 10149790 Del A**

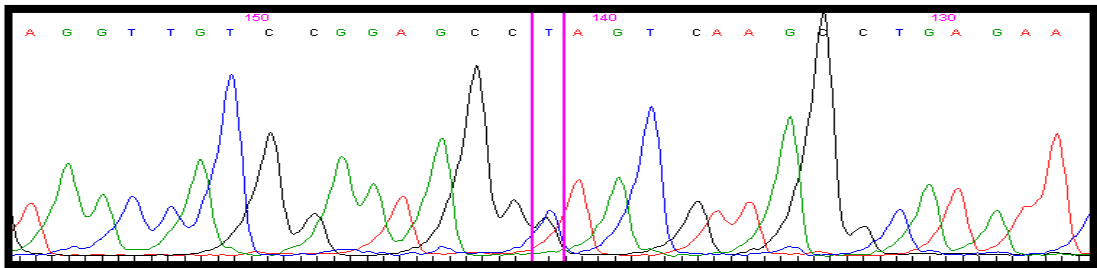
E)



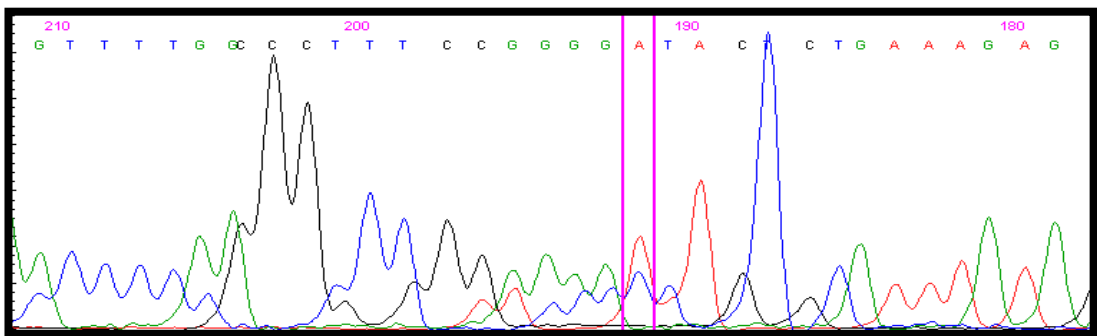
F)



G)



H)



Şekil-57'nin devamı

**Tablo-64 Tespit edilen mutasyonların frekans tablosu**

Rs Kodu	Değişimin Adı	Etki	Değişim Türü	Protein Değişimi	İlişkisi	Frekans	Güney Asya	Avrupa
Rs757781272	NM_000551.3(VH L):c.172C>T (p.Arg58Trp)	Etkisi Bilinmeyen	Tekli nükleotid varyant	R58W	Von Hippel Lidau Sendromu	0.02	0.0005138	0.00002268
Rs5030826	NM_000551.4(VH L):c.194C>G (p.Ser65Trp)	Patojenik	Tekli nükleotid varyant	S65W	Von Hippel Lidau Sendromu	0.02	0,00	0,00
Rs864622545	NM_000551.3(VH L):c.258del (p.Val87fs)	Patojenik	delesyon	V87fs	Von Hippel Lidau Sendromu	0.03	-	-
CI073785	-	Patojenik	İnsersiyon C	-	Von Hippel Lidau Sendromu	0.01	-	-
Rs1131690962	NM_000551.3(VH L):c.506T>C (p.Leu169Pro)	Patojenik Benzeri	Tekli nükleotid varyant	L169P	Hereditör Kanser	0.02	-	-

Sekans verisi sonucu elde edilen 11 değişim içerisindeki 5 mutasyon (Tablo 64) sistemde tanımlanmış RS koduna sahip değişimler olarak saptandı. 4 hasta sekans sonucu normaldir. 2 değişim sistemde kayıtlı değildir. Bunlardan ilki kromozom 3:10149790 Del A'da tespit edilen ve çerçeve kaymasına sebep olan bir değişimdir. A nükleotidindeki delesyon nedeni ile meydana gelmektedir. Diğer değişim ise lokasyon olarak kromozom 3:10141907 C>A kodlu değişimdir. Global veri bankalarında sadece Rs757781272 ve Rs5030826 değişimlerine ait frekans verileri mevcuttur. Rs5030826 değişimi Güney Asya ve Avrupa popülasyonlarında görülmez iken bizim hasta grubumuz içerisinde %2'lik bir frekans değeri almıştır. Rs757781272 değişimi frekans bakımından incelendiğinde Güney Asya ve tüm Avrupa genelindeki frekans dağılımından daha yüksek bir frekans değeri bizim hasta grubumuzda tespit edilmiştir. Tespit edilen ve tanımlı tüm değişimlerin sonucu VHL sendromu ile ilişkili çıkmıştır.

Hastaların sekans sonuçlarının klinik parametreleri değerlendirildi (Tablo 65).

**Tablo-65 Sekans sonuçlarında tespit edilen değişimlerin klinik özellikleri**

Saptanan Değişimler	VHL	HIF1A	KAT5	miR-22	miR-138	miR-223	Furhmann Grade	Patolojik Tümör Evresi	Tümör Büyüklüğü	Büyüme Paterni	Renal Kapsül İnvazyonu	Perirenal Yağ Doku İnvazyonu	Renal Ven İnvazyonu	Tümör Dışı Böbrek	Lenf Nodu	Adrenal Gland	CK7	Vimentin	EMA	CD10	RCC	LMWCK	CK19	Masson Trikrom	PAS	PAS-M	Kongo Red	İşlem
<b>Ekzon 1A</b>																												
Rs757781272	-1,91	4,67	5,46	-13,34	-10,72	3,60	1	pT2	7,5x7x6	Alveolar	+	-	-	-	-	-		+	+	+	-	-		+	+	-	-	Sol Radikal Nefrektomi
Rs5030826	-2,00	2,75	3,41	-0,51	0,09	-2,60	3	pT2	10x8	Alveolar	-	-	-	-	+	-		+	+	+		-						Sol Nefrektomi
Kromozom 3:10141907 C>A	-0,09	5,51	3,45	0,23	-5,58	1,03	4&3	pT3a	7,5x7	Solid	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+		-	+					Sol Nefrektomi
<b>Ekzon 1B</b>																												
Rs864622545	1,77	5,10	2,20	-0,32	-5,13	1,76	3	pT2	14x10x11	Alveolar	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	Sol Radikal Nefrektomi
Cl073785	2,30	2,52	0,46	5,68	6,17	3,49	1		3x2,5	Multikistik	-	-	-	-	-	-	-	+		-		+						Sol Parsiyel Nefrektomi
<b>Ekzon 3</b>																												
Rs1131690962	4,02	4,88	5,28	0,24	-6,84	1,19	3	pT1b	5x4,5x4	Alveolar	-	-	-	Renal Kist	-	-	-	+	+	+		+	+					Laporooskopik Sağ Radikal Nefrektomi
Kromozom 3: 10149790 Del A	1,51	6,24	4,55	3,54	-5,14	0,35	2	pT1a	2,5x2,5	Multikistik	-	-	-	-	-	-	-	+		+		+						Sağ Radikal Nefrektomi



Yukarıdaki tabloda her bir değişime sahip hastaların klinik ve moleküler özelliklerinin ortalama değerleri yazıldı.

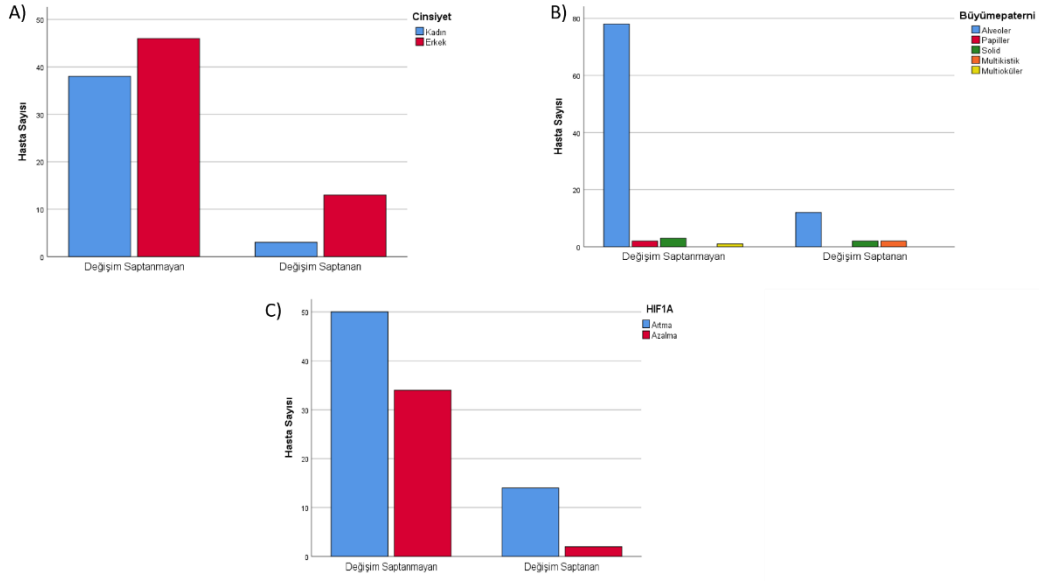
*VHL* genindeki heterojenite bu tablolada da kendini göstermektedir. *HIF1A* ve *HIF1A* ifade bakımından hasta profilinde daha kararlı bir ifade gruplaşması göstermektedir. Ancak bu 3 geni düzenleyici etki yapan miRNA ifadeleri değerlendirildiğinde genlere göre daha kararlı bir ifade düzeyinde oldukları görülmektedir. İfade sonuçlarının analizi sırasında istatistiksel olarak anlamlı fark miRNA ifadelerinde daha yüksektir.

Klinik olarak ele alındıklarında derece olarak sadece klinik etkisi bilinmeyen 1. Ekzondaki Rs757781272 değişimi ve yine 1. Ekzondaki CI073785 İnsC değişimi daha düşük dereceli hastalarda görüldü.

Sekans analizi sonucu mutasyon saptanan hastaların klinik parametreleri ile saptanmayanların arasında karşılaştırma yapıldı (Tablo 66). *VHL* değişimi saptanan grup içerisindeki erkek oranı istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu saptandı ( $p= 0,041$ ) (Şekil 58). Değişim saptanan grup içerisindeki büyüme paternleri içerisinde multikistik sadece bu gruba özgü olup değişim saptanmayan grupta da değişim saptanan gruba göre farklı olarak papiller ve multiokuler yapı görüldü ( $p= 0,008$ ) (Şekil 58). Değişim saptanan grup içerisindeki *HIF1A* ifadesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu görüldü ( $p= 0,027$ ) (Şekil 58).

**Tablo-66 DNA dizi analizi sonucu değişim saptanan hastalar ile saptanmayan hastaların klinik parametreleri açısından karşılaştırılmaları**

Klinik Parametre	Ki-Kare	Test	Odds Ratio		
			Değer	Alt Sınır	Üst Sınır
Cinsiyet	0,04146	Fisher's Exact Test	3,58	0,95	13,493
Büyüme paterni	0,008	Pearson Chi-Square	-	-	-
<i>HIF1A</i>	0,02703	Fisher's Exact Test	0,21	0,045	0,984



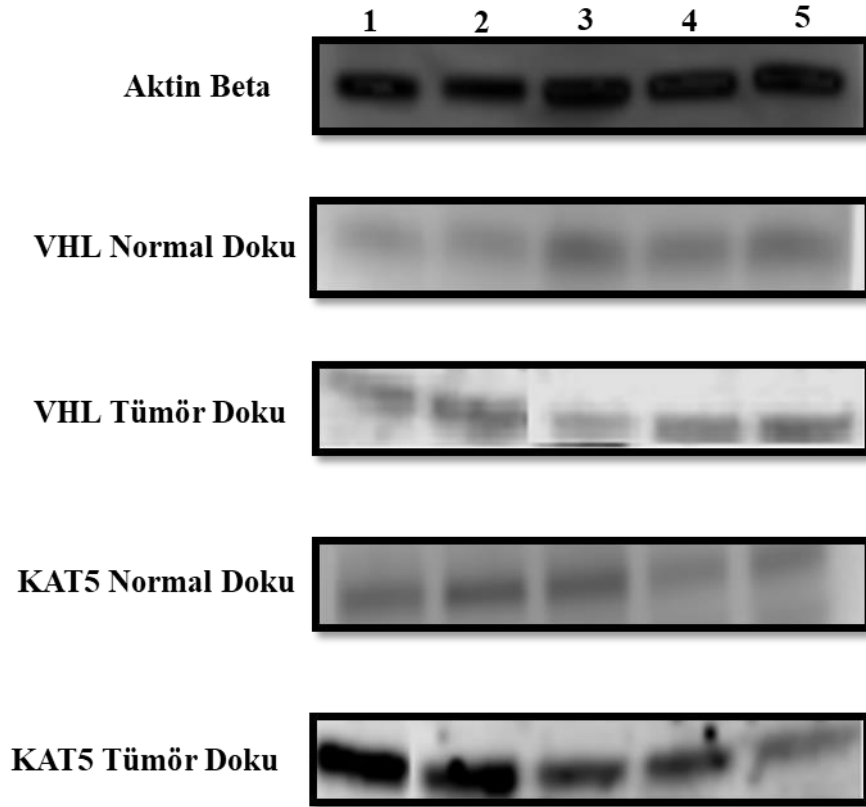
**Şekil-58 A) Sekans analizi sonucu mutasyon saptanan hastalar ile saptanmayan hastalar arasındaki cinsiyet dağılım grafiği, B) Sekans analizi sonucu mutasyon saptanan hastalar ile saptanmayan hastalar arasındaki Büyüme Paterni dağılım grafiği, C) Sekans analizi sonucu mutasyon saptanan hastalar ile saptanmayan hastalar arasındaki *HIF1A* Gen ifadesinin dağılım grafiği**

#### 4.5. Western Blot Analizi Sonuçları

DNA dizi analizi sonucu değişim tespit edilen ve sekans analizi yapılamayan ancak HDA'da normalden farklı bant özelliği gösteren toplamda 7 farklı değişimin western blot analizi ile protein miktarlarındaki farklar incelendi (Şekil 59). Hasta tümör doku örneklerinden elde edilen protein miktarları Tablo-67'de gösterilmektedir. Parafin bloktan elde edilen protein izolasyonları sonucu 11 değişim içerisinde sadece 5 tanesi western yapılabilecek kalitede protein ihtiva etmekteydi. Literatür çalışmaları da parafin dokulardan kaliteli protein eldesinin en fazla 5 yıllık parafin dokulardan mümkün olduğunu belirtmiştir. Mevcut çalışma kapsamında kullanılan parafin bloklar arasında 10 yıldan eski hasta örneklerinin olması, protein izolasyonunun optimizasyon aşamalarını oldukça zorlaştırmıştır.

**Tablo-67 Qubit ile ölçüm sonucu elde edilen protein miktarları**

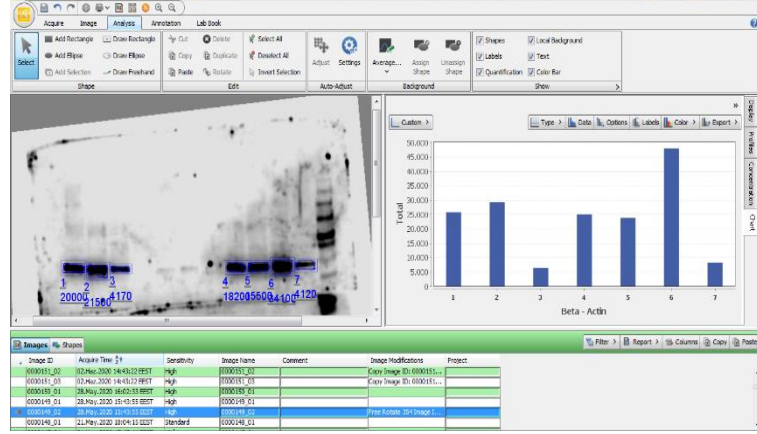
Hasta No	Tümör Doku Protein Miktarı	Normal Doku Protein Miktarı
1	26 µg/ml	23 µg/ml
15	23,4 µg/ml	22,9 µg/ml
20	21,7 µg/ml	26,3 µg/ml
58	25 µg/ml	21 µg/ml
96	22,2 µg/ml	24,6 µg/ml



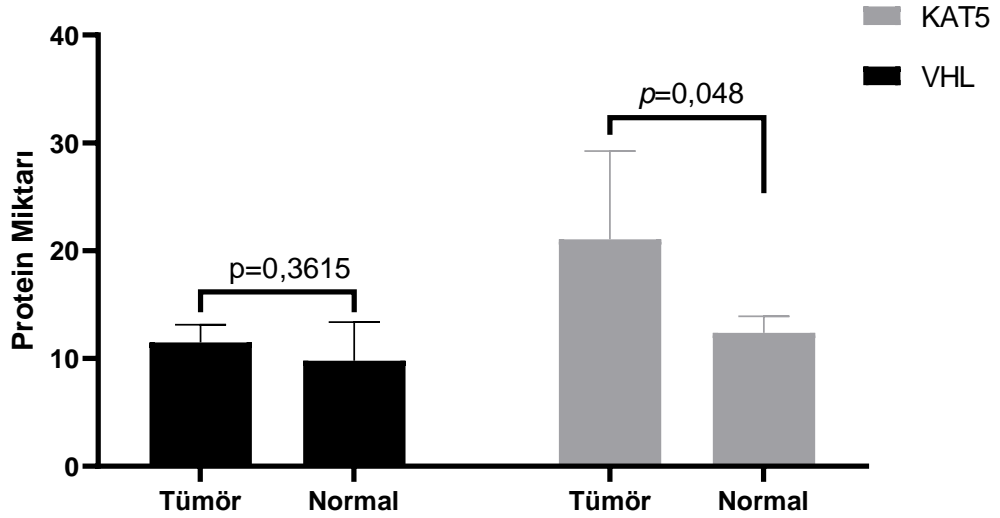
**Şekil-59 5 farklı değişimin western blot görüntüleme ile analiz sonuçları. VHL tümör dokuda saptanan mutasyonlar; 1 no'lu değişim 3: 10149790 Del A, 2 no'lu değişim CI073785, 3 no'lu değişim Rs864622545, 4 no'lu değişim Rs1131690962 değişimi, 5 no'lu değişim Rs757781272 değişimi**

İmage Studio Digits uygulaması kullanılarak western blot analizi sonucu jelde görüntülemeleri yapılan protein örnekleri nicel olarak ölçüldü (Şekil 60).

A) İmage Studio Digits analiz arayüzü



B)



Şekil-60 Western- Blot analizi sonucu elde edilen bantların nicel olarak ölçümü  
A) Protein Bantlarının işaretlenip nicel olarak ölçülmesi B) Nicel verilerin karşılaştırılması

**Tablo-68 Western-Blot Analizi yapılan hastaların Sekans ve Ekspresyon sonuçları**

Hasta No	Western Blot		Sekans		Ekspresyon					
	<i>VHL</i>	<i>KAT5</i>	<i>VHL</i>	Etki	<i>VHL</i>	<i>HIF1A</i>	<i>KAT5</i>	miR-22	miR-138	miR-223
15	Değişim Yok	Artma	Rs757781272	Etkisi Bilinmeyen	-1,91	4,67	5,46	-13,34	-10,72	3,60
20	Değişim Yok	Artma	Rs1131690962	Patojenik Benzeri	-2,65	1,97	3,48	-1,46	-3,12	2,60
1	Değişim Yok	Artma	Rs864622545	Patojenik	1,77	5,10	2,20	-7,52	-10,33	1,41
96	Değişim Yok	Artma	CI073785	Patojenik	2,30	2,52	0,46	-3,00	-3,82	1,20
58	Değişim Yok	Artma	3: 10149790 Del A	-	1,25	7,37	6,91	3,54	-5,14	0,35

BHTRHK'da *VHL*'nin baskılanması ve *KAT5*'in artışı ile hücre proliferasyonunun tetiklenmesi söz konusudur. *KAT5* geninin *VHL* ve *HIF1A* geni ile dolaylı olarak ilişkisi BHTRHK'da *KAT5* geni ifadesinin artması yönündedir. Elde edilen western blot sonuçlarında tümör-normal doku karşılaştırıldığında *VHL* protein miktarı değişim göstermez iken, artan *KAT5* protein ifadesi görüldü (Tablo 68). Ancak, *HIF1A* analiz edilemedi.

## 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

BHTRHK, 2018 yılı için dünya çapında yaklaşık 300.000 yeni vaka ve yaklaşık 175.000 ölümün görüldüğü yaygın ve ölümcül bir hastalıktır (Padala & Kallam, 2020). BHTRHK, böbrek korteksinden veya renal tübüler epitel hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Son yıllarda hastalığın insidansı giderek artmaktadır ve şu anda erkekler arasında en yaygın 7. kanser olarak sıralanmaktadır. Genitoüriner kanserler arasında BHTRHK en yüksek mortalite oranına sahiptir (Padala & Kallam, 2020).

BHTRHK cerrahi sonrası metastaz ve ilaç direncinin ortaya çıkması nedeniyle diğer RHK alt tipleri arasında en yüksek mortalite oranı ile karakterizedir. BHTRHK hastalarında %50 metastaz riski görülmektedir (van den Berg, 2013). Modern ilaçların uygulanmasıyla bile 5 yıllık sağkalım oranı %40'tır. Her ne kadar tüm BHTRHK'lar nefron kökenli ve ortak klinik parametreler içerse de histolojik alt tipleri, biyolojileri ve terapötik sonuçları bakımından oldukça heterojen bir yapı göstermektedir (Dal et al., 2019).

BHTRHK, genetik veya akiz nedenlerden köken alarak gelişim göstermektedir. En yaygın iki genetik anormallik *VHL* ve *PBRM-1* genleri kaynaklıdır. Sıklıkla akiz nedenler arasında uzun süreli diyaliz kullanımı, sigara öyküsü, uzun süreli analjezik kullanımı, obezite, hipertansiyon ve diyabet bulunmaktadır (Protzel et al., 2012).

*VHL* genindeki mutasyonlar otozomal dominant veya sporadik bir şekilde oluşabilmektedir. BHTRHK hastalarının %50'den fazlası sporadik *VHL* gen anormalliklerine sahiptir. BHTRHK'lerin %90'ında *VHL* tümör baskılayıcısının biallelik kaybı mevcuttur. BHTRHK'lı hastaların yaklaşık %95'inde 3p kaybı bir delesyon saptanmaktadır (van den Berg, 2013). *VHL* genindeki değişimler, *PDGFB* ve *VEGF* genlerinin mRNA seviyelerinin artmasına yol açan etkileşimlere neden olmaktadır. Büyüme faktörlerindeki ifade artışı vasküler tümörlerin gelişimini teşvik etmektedir. Normal oksijen koşulları altında pVHL, HIF1A ve HIF2A üzerine bağlanarak hidroksilasyona sebep olmaktadır. Hipoksemik koşullarda veya pVHL'nin yokluğunda, HIF1A seviyesinde artış görülmektedir (Wierzbicki et al., 2019). HIF1A birikimi, artan anjiyogenez, glikoliz ve anormal yağ asidi metabolizmasına yol açan hücrel hipoksik yanıtı yönlendirmektedir; böylece karakteristik glikojen ve lipit

açısından zengin sitoplazmik tortular ve hiper-vaskülarite ile birlikte BHTRHK'ya şekil vermektedir (Rosalie Fisher et al., 2014). VHL'nin hipermetilasyon veya delesyon ile inaktivasyonu çoğu BHTRHK'nin karakteristik özelliğidir. VHL, VHL-E3 ubiquitin ligaz kompleksinin önemli bir bileşenidir ve hidrosillenmiş hedef proteinleri oksijene bağlı bir şekilde tanır ve bağlayarak etki eder (Guo et al., 2012).

Lokalize hastalığın tedavisi küratif amaçlı cerrahidir. Radikal nefrektomi veya parsiyel nefrektomi, hastalığın derecesine, hastanın komorbiditelerine ve altta yatan böbrek fonksiyonuna bağlı olarak tercih edilir. Tirozin kinaz inhibitörleri (sunitinib ve pazopanib), VEGFR'yi inhibe ederek etki ettikleri için metastatik BHTRHK'da kullanılmaktadır (Wierzbicki et al., 2019). Rapamisin (mTOR inhibitörleri) everolimus ve temsirolimus'un metastatik BHTRHK için kullanımı yeni onaylanan ilaçlar arasında yer almaktadır (Scelo et al., 2014). MTOR inhibitörü, lenvatinib (VEGFR inhibitörü) ile birlikte, metastatik BHTRHK'da ikinci basamak bir ajan olarak kullanılmaktadır.

BHTRHK hastalığının tanı ve tedavisinde ilerleme kat edilebilmesi için yüksek heterojen yapısı göz önüne alınarak farklı histolojik alt tipleri, ayırt edici genetik ve moleküler değişiklikleri ve farklı klinik parametreleri ve tedavilere yanıtları olan farklı hastalık derecelerinin bir spektrumu olduğunun göz önüne alınarak çalışılması gerekmektedir (Padala & Kallam, 2020).

Günümüzde moleküler biyoloji ve genetik alanında yapılan çalışmalar sonucunda hastalıkla ilişkili ve hücrel yolaklarda görevli olan genlerin ekspresyon ifadelerinin belirlenmesinin tümörün moleküler düzeydeki sınıflandırılmasında, erken tanı ve tedaviye yön vermede kullanılan etkin yöntemlerden biri olduğu görülmektedir. Moleküler tekniklere ek olarak son yıllarda bilimsel alanda etkisini arttırarak gösteren in-silico analizler çalışmalara yön vermektedir. Biyoinformatik yaklaşım ile araştırmacılar global veri bankalarındaki hasta bilgilerini modelleyebilmektedirler ve geliştirdikleri algoritmalar ile analizleri gerçekleştirerek hastalıkların moleküler alt yapılarının tanımlanmasında çok geniş perspektifli çalışmalar sürdürebilmektedir (Ortiz-Estevez et al., 2012).

Mevcut tez çalışmasında BHTRHK hastalarına ait verilerin global veri bankalarından elde edilerek hastalığın tanı ve tedavisinde biyobelirteç olma

potansiyeli taşıyan gen ve bu genleri hedef alan miRNA'ların tespit edilmesi ve bu bulguların 100 BHTRHK hastasında validasyon araştırılması yapılmıştır. Tez çalışmasında izlenen biyoinformatik yaklaşımı ise aşağıda maddelenerek verilmektedir:

1. BHTRHK anahtar kelimesi girilerek global veri bankalarından uygun datalar çalışma kapsamında toplandı.
2. Global veri bankalarından elde edilen veri setlerinin; ekspresyon profili, NGS ve array verisi sonuçları gruplandırıldı.
3. Gruplanan veri setleri ortak bir veri havuzu halinde bir araya getirildi. Elde edilen sekans verisi mutasyon analizine tabi tutuldu. BHTRHK'dan sorumlu mutasyonlar tespit edildi. Analiz sonucunda %41,3 oran ile *VHL* geni BHTRHK'da en fazla mutasyon ihtiva eden gen olarak belirlendi.
4. *VHL* geninde fonksiyonel ve moleküler yolak analizleri yapıldı. Bu analizler sonucunda *VHL* geninin hipoksi yolağında %43.8 etkileşim gösterdiği *HIF1A* geni tespit edildi. *HIF1A* ve *VHL* birlikte fonksiyonel ve moleküler yolak analizi ile değerlendirildiğinde RHK'da en fazla etki gösterdikleri ve hücrel stres cevabı ile hücre dışı etkilere karşı cevap oluşturmada *KAT5* geni ile etkileşim halinde oldukları tespit edildi.
5. Saptanan bu üç geni hedef alan miRNA'lar analiz programları kullanılarak tespit edildi. Yapılan analiz sonucunda *VHL* genini hedef alan miR-223, *HIF1A* genini hedef alan mir-138 ve son olarak *KAT5* genini hedef alan mir-22 değerlendirilmek üzere belirlendi.

Veri bankalarından toplanan tüm veriler in-silico analizler ile biyoinformatik olarak değerlendirilerek elde edildi. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan 100 BHTRHK hastasının parafinize edilmiş tümör ve normal dokuları ile karşılaştırılarak valide edildi.

Gen ve miRNA ifadesi bakımından yapılan in-silico analizler ışığında BHTRHK hastaları cinsiyet bakımından değerlendirildiğinde Woldrich ve arkadaşlarının (2019) yapmış olduğu çalışmayla paralel bir şekilde erkek hasta oranının kadın hasta oranına göre daha yüksek olduğu görüldü. Ancak, kadın hasta



oranı düşük olmasına karşın *VHL* gen ifadesi erkek hastaların seviyesinden oldukça düşük olarak tespit edildi ( $p=0,02$ ). *HIF1A* ve *KAT5* gen ifadesi bakımından cinsiyete dayalı istatistiksel olarak anlamlı bir fark içermediği görüldü.

GSE3619, GSE68950 veri setleri incelendiğinde GSE3619 için *VHL* ( $p<0,001$ ), *HIF1A* ( $p<0,001$ ) ve *KAT5* ( $p<0,001$ ) gen ifadeleri tüm kanser grupları içerisinde BHTRHK hastalarında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı ifade edildiği tespit edildi. Ancak, GSE68950 veri setinde sadece *HIF1A* geninde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ( $p<0,001$ ). Bu durum *VHL* gen ifadesinin BHTRHK hastalarında yapılan C. Lance Cowey ve arkadaşlarının (2017) çalışmasında görüldüğü gibi mRNA düzeyinde değişme olmaksızın *VHL* yapısında bulunan mutasyonlar sonucu pVHL yapısında oluşan değişimlerin hipoksik yolu etkileyebildiği şeklinde yorumlanmıştır.

RHK'nın bir diğer histopatolojik alt tipi olan papiller RHK'nın gelişimi c-Met, PI3K, mTOR ve HIF yolu üzerinden olmasına karşın, GSE19949 veri seti analiz edildiğinde papiller RHK ile BHTRHK arasında *VHL* ve *KAT5* gen ifadesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (Hes et al., 2016). Ancak, Rohan ve arkadaşlarının (2011) yapmış olduğu çalışmaya paralel olarak *HIF1A* gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede 0,54 kat ( $p=0,01$ ) artma tespit edildi.

Rosalie Fisher (2014) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada görüldüğü gibi GSE40435 veri seti üzerinde yapılan analizler sonucunda da hastalığın evreleri arttıkça *VHL* ( $p= 0.00$ ) ve *HIF1A* ( $p= 0.04$ ) gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede fark tespit edildi.

Bir tirozin kinaz inhibitörü olan sunitinib, VEGFR'yi inhibe etmektedir. Bu özelliğinde dolayı BHTRHK hastalarında tedavi amaçlı kullanılan sunitinip özellikle metastatik BHTRHK hastalarında kullanılmaktadır. GSE65615 veri setinde sunitinib tedavisinde olumlu cevap alınan ve alınmayan BHTRHK hastaları gen ifadesi bakımından karşılaştırıldığında *VHL*;  $p=0.03$ , *HIF1A*;  $p=0.05$ , *KAT5*;  $p=0.14$  olarak görülmektedir. *VHL* geni tedaviye yanıt verenlerde vermeyenlere göre -3.22 kat az seviyede ifade edilmektedir. *HIF1A* gen ifadesinde -2.67 kat azaldığı hesaplandı. Wierzbicki (2019) ve ekibinin yaptığı çalışmada görüldüğü gibi sunitinib tedavisine

yanıt veren hasta gruplarında *HIF1A* ve *VHL* gen ifadesi yanıt vermeyen gruba göre azalma görülmüştür.

Akiz nedenler arasında bulunan sigara tüketimi ve obezite BHTRHK gelişiminde oldukça önemlidir. GSE46699 veri setinde yapılan t-testi analizleri sonucunda; obez olan hastalar ile sigara tüketen hasta grupları arasında *VHL* ( $p<0.001$ ) ve *KAT5* ( $p=0.03$ ) gen ifadesi istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu analiz edildi. Sigara tüketen hasta grubunda, obez hasta grubuna göre *VHL* ifadesi -5,88 kat daha az olarak hesaplandı. Aynı gruplar arasında *KAT5* gen ifadesinde 3,40 kat artış görüldü. Hem obez hem de sigara tüketen hasta grubu ile sadece obez olan hasta grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark sadece *VHL* gen ifadesinde 4,01 kat ( $p<0,001$ ) artma olarak tespit edildi. Yalnızca obez olan hastalarda *VHL* seviyesi hem obez hem de sigara tüketen gruba göre yüksektir. Sigara tüketiminin bu analizler sonucunda *VHL* ifadesi azalmasında doğrudan ilişkili olduğu saptandı. McGuire & Fitzpatrick'in (2011) yaptıkları çalışmada obezitenin *VHL* üzerinde net bir etkisinin olmadığını ancak, hipoksik koşullarda berrak tipte kanser hücresi oluşumunu destekler nitelikte olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışmada Van Dijk ve arkadaşları (2006) tarafından sigaranın etkisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. *VHL* üzerinde bir etkisi olmaksızın sigaranın BHTRHK gelişimini etkilediğini belirlemişlerdir.

Metastaz riskinin oldukça yüksek olduğu BHTRHK'da GSE10528 veri seti üzerinde yapılan analiz ile primer ile metastatik BHTRHK arasında yapılan analiz sonucunda *VHL* gen ifadesi metastatik grupta 3,13 kat ( $p=0,01$ ) artış görüldü. *KAT5* gen ifadesi bakımından değerlendirildiğinde metastatik BHTRHK hasta grubunda -5.11 kat ( $p=0,01$ ) azalma görüldü. Wierzbicki (2019) ve ekibinin yaptığı çalışmada elde ettikleri veriler ışığında metastatik BHTRHK'da *VHL* ifadesinin arttığı görüldü. Sonuç olarak kanser gelişimindeki *VHL*, *HIF* yolağı ilişkisinin böbrek dokusu spesifik olduğu ve böbrek dışında gelişim gösterebilen metastatik BHTRHK hücrelerinde etkisinin azaldığı görülmüştür.

GSE3, GSE17818 veri setinde yapılan analiz sonucunda BHTRHK tümör dokusu ile normal doku karşılaştırmasında *VHL* ifadesinin -1,96 kat istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ( $p=0,04$ ). *HIF1A* gen ifadesi ise tümör dokuda istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermektedir ( $p=0,05$ ). Validasyon

kapsamında çalıştığımız BHTRHK tümör dokuları ile normal dokuları karşılaştırıldığında; *VHL* gen ifadesi -0,39 kat ( $p=0,4419$ ) azalma, *HIF1A* gen ifadesi 1,23 kat ( $p=0,0402$ ) artma, *KAT5* gen ifadesi 1,88 kat ( $p=0,001$ ) artma tespit edildi. *HIF1A* ve *KAT5* arasında doğrusal bir korelasyon tespit edildi ( $p<0.0001$ , Pearson  $r: 0.777$ ). Groß (2020) ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışma ile sonuçlarımız paralellik göstermektedir. Ancak, *KAT5* ile ilgili BHTRHK çalışması bulunmaması nedeni ile *KAT5* değerleri literatür ile karşılaştırılamamıştır. Bu genleri hedef alan miRNA'ların ifadeleri ise, miR-223'de Xiao (2019) çalışmasındaki ile benzer şekilde 0,97 kat ( $p=0,0458$ ) artma, miR138 ifadesinde Song (2011) çalışmasında görüldüğü gibi -3,84 kat ( $p<0,0001$ ) azalma, miR-22 ifadesinde Gong (2019) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tespit ettikleri gibi -1,17 kat ( $p=0,0309$ ) azalma tespit edildi. Genler ve hedef miRNA'larının ifade değerleri karşılaştırıldığında; *VHL* ile miR-223 ( $p=0.0108$ ), *HIF1A* ile miR-138 ( $p<0.0001$ ) ve *KAT5* ile miR-22 ( $p<0.0001$ ) karşılaştırması da diğerleri gibi istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir. BHTRHK hastalarında *VHL* gen ifadesi azalırken miR-223 ifadesinde artma (Spearman  $r =-0,027$ ), *HIF1A* gen ifadesi artarken miR-138 ifadesinde azalma (Pearson  $r =-0,308$ ) ve *KAT5* ifadesi artarken miR-22 ifadesinde azalma (Pearson  $r:-0,487$ ) tespit edildi. Xiao (2019) ve Song (2011) çalışmalarından elde edilen sonuçlarda da *VHL* ifadesi azalırken miR-223 ifadesinin arttığı ve *HIF1A* ifadesi artarken mir-138 ifadesinin azaldığı görülmüştür.

BHTRHK hastalarında tümör doku ile normal doku arasındaki ifade düzeylerinin Roc curve analizi sonucunda farklı saptayabileceğimiz istatistiksel olarak anlamlı sonuç *KAT5* ( $p= 0,0401$ ), miR-22 ( $p=0,028$ ), miR138 ( $p<0,0001$ ) ve miR-223'te ( $p= 0.046$ ) tespit edilmiştir. *KAT5* gen ifade seviyesi 1,27'den büyük tüm değerler tümör dokuyu göstermektedir. MiR-223 ifadesi için 0,4598'ten büyük tüm değerler tümör dokuyu göstermektedir. MiR-138 ifadesi için bu değer  $\leq-2,4095$  ve miR-22 için  $\leq 0,342$  olarak tespit edildi.

Saptanan ifade değerlerinin hastaların klinik özellikleri ile analizi yapıldı. *VHL* gen ifadesi ile CD10, LMWCK değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ( $p=0.047$ ;  $p=0,004$ ). *VHL* gen ifadesi azalan hastalarda LMWCK pozitifliği arttığı görüldü. Buna karşın, *HIF1A* ve *KAT5* gen ifadeleri artan hastalarda LMWCK pozitifliği arttığı görüldü. *VHL* gen ifadesinin azaldığı hastalarda CK19 ve PAS

değerlerinin pozitif olduğu tespit edildi ( $p= 0.025$ ;  $p=0.034$ ). MiR-22 ifadesi artan hastalarda, fuhrman derecesi, patolojik tümör evresi ve perirenal yağ doku invazyonunda artış görüldü ( $p=0.037$ ;  $p=0.038$ ;  $p=0.003$ ). Gong ve arkadaşlarının (2019) yaptıkları çalışmada miR-22 ifadesinin invazyonu arttırdığı görülmüştür. Liu ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmada miR-138'in invazyon baskılayıcı etkisini göstermişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmaya paralel olarak miR-138 ile perirenal yağ doku invazyonu karşılaştırıldığında, miRNA ifadesi azalan hasta grubunda perirenal yağ doku invazyonunda azalma görüldü ( $p= 0.05$ ). Alibhai ve arkadaşlarının (2020) yapmış oldukları çalışmada yaşlılarda miR-223 ifadesinin arttığını göstermişlerdir. Bizim hasta grubumuzda 60 yaş üstü hastalarda miR-223'ün artan ifadesi tespit edildi ( $p= 0.032$ ).

In-silico analizler sonucunda BHTRHK'dan sorumlu mutasyonların %41,3 *VHL* kaynaklı iken, %1,5 *HIF1A* ve %0,5 *KAT5* kaynaklı olduğu saptandı. 3 gen arasında mutasyonlarının birlikte görülmesi durumları analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir değer elde edilmemiştir. 100 hastanın tümör doku örneklerinden yapılan *VHL* sekans analizi sonucunda hastaların %26'sında *VHL* değişimi görüldü. Sekans öncesi yapılan HDA analizinde jel görüntüsü üzerinde 15 farklı değişimi tespit edilmiştir. 15 farklı değişim görüntüsünün sadece 11 tanesi sekans verisi analiz edilecek kalitede elde edilmiştir. 4 adet değişim farklı metodlar (Farklı PCR kimyasalları kullanılması, primer çiftinin değiştirilmesi v.b) denenmesine rağmen istenilen kalitede bir okuma elde edilememiştir. Bu durumun sebeplerinden bir diğeri ise, *VHL* geninde bulunan büyük delesyonların sekans analizi gibi delesyonları tanımlayamayan sistemlerde tespit edilememesidir. Analiz sonucunda 7 farklı değişim saptandı, bunlardan 5 tanesi (Rs757781272, Rs5030826, Rs864622545, CI073785 ve Rs1131690962) sistemde kayıtlı olan mutasyonlardı, 2 değişim (Kromozom 3:10141907 C>A, Kromozom 3: 10149790 Del A) ise sistemde daha önce kayıt altına alınmamış novel değişimler olarak tespit edildi. Rs1131690962 NM\_000551.3 (*VHL*):c.506T>C (p.Leu169Pro) mutasyonu in-silico analizler sonucu saptanan BHTRHK'dan sorumlu *VHL* mutasyonları içerisinde en sık görülen 17. mutasyon olarak tespit edildi. Rs5030826 NM\_000551.4 (*VHL*):c.194C>G (p.Ser65Trp) mutasyonu ise, en sık görülen 22. mutasyon olarak saptandı.

Tez çalışması kapsamında hasta parafin blok örneklerinden western blot analizi yapıldı. Literatürde yer alan birçok protein izolasyonu yöntemi denenmesine rağmen sonuç alınamadı. Çalışma kapsamında ekibimizce geliştirilen protein izolasyonu metodu başarı ile kullanıldı. Western blot analizi sonucunda VHL ve KAT5 proteinlerinin jeldeki bantlaşmaları elde edilirken satın alınan antikorun çalışmaması nedeni ile HIF1A protein verileri sunulamamıştır.

BHTRHK hastalarında pVHL miktarı bakımından tümör-normal doku arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi. Bunun nedeni hastaların tümünde VHL sendromu olması nedeni ile tümör ve normal dokuda VHL ifade baskılanması mevcuttur. KAT5 gen ve protein ifadesinde artış saptandı (Wierzbicki et al., 2019).

**Tablo-69 BHTRK hastalarında gen ve miRNA ifadelerinin kat sayısı ve hasta grubundaki yüzdelik dağılımı**

Tümör Dokuda Gen İfadesi		Hastalarda İfade Düzeyi		Tümör Dokuda miRNA İfadesi		Hastalarda İfade Düzeyi	
		Artma	Azalma			Artma	Azalma
VHL	-0,39	46%	54%	mir223	0,97	67%	33%
HIF1A	1,23	64%	36%	mir138	-3,84	15%	85%
KAT5	1,88	73%	27%	mir22	-1,17	26%	74%

Elde edilen sonuçlar VHL, HIF1A ve KAT5 miR-22, miR-138 ve miR-223 ifadelerinin BHTRHK hastalığının tanısında ve tedavisine karar vermede yol gösterici olabileceğini göstermektedir. Mevcut bulgular VHL, HIF1A ve KAT5 miR-22, miR-138 ve miR-223 ifadelerinin BHTRHK hastalarının klinik parametreleri ile istatistiksel olarak ilişkili olduğu gösterdi. Tez çalışmasından elde edilen bulgular, KAT5 gen ifadesi ile BHTRHK ilişkisini nicel veriler ile ortaya koyan ilk çalışma özgünlüğünü göstermektedir. Ayrıca VHL, HIF1A ve KAT5 genlerini hedef alan miR-22, miR-138 ve miR-223 ifadelerinin BHTRHK hastalarının tanısında istatistiksel olarak daha duyarlı olduğu görüldü (Tablo 69). miR-223'ün proliferasyon ve metastaz artışına neden olduğu bilinmektedir. Araştırmalar sonucunda miR-223 baskılanmasının

apoptoz arttırıcı etkisi görülmüştür (Xiao et al., 2019). Mevcut çalışmalarda miR-138'in *HIF1A* genini baskıladığı bilinmektedir. Bu durum BHTRHK hastalarında artan *HIF1A* gen ifadesinin baskılanmasında miR-138'in teröpatik bir ajan olarak kullanılabilceğini göstermektedir (Song et al., 2011). MiR-22 genel metabolik baskılayıcı olarak işlev görmektedir (Gong et al., 2019). MiR-22 hücre yaşlanmasında, enerji metabolizmasında, anjiyogenezde, EMT yolağında, proliferasyonda, metastaz ve apoptoz süreçlerinin tamamında etkin bir rol oynamaktadır. MiR-22, RHK, intra hepatic kolanjiyo karsinom, hepatosellüler karsinom, akciğer adenokarsinomları, mide kanseri ve kolon kanserinde ifadesel olarak azalma göstermektedir (J. Wang et al., 2017). BHTRHK hastalarında hipoksi yolağındaki artan metabolik etkinin azaltılmasında teröpatik bir ajan olarak kullanılma potansiyeli taşımaktadır. Yapılan çalışma kapsamında BHTRHK'da etkili oldukları nicel olarak kanıtlanan miR-22 ve miR-138 tedavi modellerinin geliştirilmesinde teröpatik etki oluşturabilecek niteliktedir.

BHTRHK gelişiminde rolü potansiyel genetik ve epigenetik değişimlerin incelenerek mevcut tez çalışmasında elde edilen veriler BHTRHK hastalarının etkin tedavisine katkı sağlayabilecek nitelikte veriler olup, hem global veri bankalarından elde edilen verilerin biyoinformatik analizinin gerçekleştirilmiş olması, hem de belirlenen *VHL*, *HIF1A*, *KAT5* ile bu genleri hedef alan miR-22, miR-138 ve miR-223'e ait Türk popülasyonuna özgü elde edilen ilk verilerin birlikte değerlendirilmiş olması nedenleriyle uluslararası literatüre katkı sağlaması beklenmektedir. Ayrıca, *VHL* sendromu tanısı almış takip hastalarında olası erken cerrahi eksizyon ve/veya tedavi modellerinin seçilmesinde de elde edilen bulgular yol gösterici olabilecek nitelik taşımaktadır.

Sonuç olarak tez çalışması kapsamında BHTRHK gelişiminde rolü potansiyel genetik ve epigenetik değişimler araştırılarak elde edilen bulgular ışığında, BHTRHK'da kötü prognozun belirlenebilmesi için mir-22 ve mir-138'ün ifade düzeylerindeki farklılıkların biyobelirteç olma potansiyelinin mevcut olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca mir-22 ve mir-138'ün potansiyel terapötik hedef olarak kullanılabilirliğine ait ön verilerin elde edilmesi, hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesini içeren ileri çalışmalara temel oluşturmaktadır. Dolayısıyla, terapötik hedef olarak öngörülen mir-22 ve mir-138 ile ilgili olarak hedefe yönelik ilaç

geliştirilebilmesi için ileri fonksiyonel analizlerin gerçekleştirildiği kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut tez çalışması, kötü prognoza sahip BHTRHK'lu hastaların moleküler biyobelirteçler ile ayırt edilerek bireye özgü etkin tedavi modellerinin geliştirilmesine katkı sağlar niteliktedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *ELife*, 4(AUGUST2015), 1–38. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Alibhai, F. J., Lim, F., Yeganeh, A., DiStefano, P. V., Binesh-Marvasti, T., Belfiore, A., Wlodarek, L., Gustafson, D., Millar, S., Li, S. H., Weisel, R. D., Fish, J. E., & Li, R. K. (2020). Cellular senescence contributes to age-dependent changes in circulating extracellular vesicle cargo and function. *Aging Cell*, 19(3), 1–14. <https://doi.org/10.1111/accel.13103>
- Alvarez, M., Martinez-Pineiro, L., & Rios, E. (2011). Renal Tumors in Patients with von Hippel-Lindau Disease: “State of Art Review.” *Renal Cell Carcinoma*, May 2014. <https://doi.org/10.5772/26332>
- Antonelli, A., Arrighi, N., Tardanico, R., Balzarini, P., Zanotelli, T., Corti, S., Zani, D., Cozzoli, A., Cunico, S. C., & Simeone, C. (2010). Prognostic value of cytogenetic analysis in clear cell renal carcinoma: A study on 131 patients with long-term follow-up. *Anticancer Research*, 30(11), 4705–4709.
- Banerjee, M., George, J., Song, E. Y., Roy, A., & Hryniuk, W. (2004). Tree-based model for breast cancer prognostication. *Journal of Clinical Oncology*, 22(13), 2567–2575. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.11.141>
- Beleut, M., Zimmermann, P., Baudis, M., Bruni, N., Bühlmann, P., Laule, O., Luu, V. D., Grussem, W., Schraml, P., & Moch, H. (2012). Integrative genome-wide expression profiling identifies three distinct molecular subgroups of renal cell carcinoma with different patient outcome. *BMC Cancer*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-310>
- Bellmunt, J., Négrier, S., Escudier, B., Awada, A., & Aapro, M. (2009). The medical treatment of metastatic renal cell cancer in the elderly: Position paper of a SIOG Taskforce. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 69(1), 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.08.002>
- Bewick, V., Cheek, L., & Ball, J. (2004). Statistics review 12: Survival analysis. *Critical Care*, 8(5), 389–394. <https://doi.org/10.1186/cc2955>
- Bishara, A. J., & Hittner, J. B. (2012). Testing the significance of a correlation with nonnormal data: Comparison of Pearson, Spearman, transformation, and resampling approaches. *Psychological Methods*, 17(3), 399–417. <https://doi.org/10.1037/a0028087>
- Bivand, R. S., Pebesma, E. J., & Gómez-rubio, V. (2012). 9780387781709-T1. 1–7. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-78170-9-T1>
- Brooks, S. A., Brannon, A. R., Parker, J. S., Fisher, J. C., Sen, O., Kattan, M. W., Hakimi, A. A., Hsieh, J. J., Choueiri, T. K., Tamboli, P., Maranchie, J. K., Hinds, P., Miller, C. R., Nielsen, M. E., & Rathmell, W. K. (2014). ClearCode34: A prognostic risk predictor for localized clear cell renal cell carcinoma. *European Urology*, 66(1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.02.035>
- Burrell, R. A., McClelland, S. E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M. C., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S. M., Gronroos, E., Chew, S. K., Rowan, A. J., Schenk, A., Sheffer, M., Howell, M., Kschischo, M., Behrens, A.,



- Helleday, T., Bartek, J., ... Swanton, C. (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature*, 494(7438), 492–496. <https://doi.org/10.1038/nature11935>
- Casuscelli, J., Vano, Y.-A., Fridman, W. H., & Hsieh, J. J. (2017). Molecular Classification of Renal Cell Carcinoma and Its Implication in Future Clinical Practice. *Kidney Cancer*, 1(1), 3–13. <https://doi.org/10.3233/kca-170008>
- Chakravarty, D., Gao, J., Phillips, S. M., Kundra, R., Zhang, H., Wang, J., Rudolph, J. E., Yaeger, R., Soumerai, T., Nissan, M. H., Chang, M. T., Chandarlapaty, S., Traina, T. A., Paik, P. K., Ho, A. L., Hantash, F. M., Grupe, A., Baxi, S. S., Callahan, M. K., ... Kravis, H. R. (2017). *OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base HHS Public Access*. 1–23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5586540/pdf/nihms897314.pdf>
- Chen, M., Ye, Y., Yang, H., Tamboli, P., Matin, S., Tannir, N. M., Wood, C. G., Gu, J., & Wu, X. (2009). Genome-wide profiling of chromosomal alterations in renal cell carcinoma using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *International Journal of Cancer*, 125(10), 2342–2348. <https://doi.org/10.1002/ijc.24642>
- Cowey, C. L., & Rathmell, W. K. (2009). VHL gene mutations in renal cell carcinoma: Role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. *Current Oncology Reports*, 11(2), 94–101. <https://doi.org/10.1007/s11912-009-0015-5>
- Croft, D., O’Kelly, G., Wu, G., Haw, R., Gillespie, M., Matthews, L., Caudy, M., Garapati, P., Gopinath, G., Jassal, B., Jupe, S., Kalatskaya, I., MayMahajan, S., May, B., Ndegwa, N., Schmidt, E., Shamovsky, V., Yung, C., Birney, E., ... Stein, L. (2011). Reactome: A database of reactions, pathways and biological processes. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 1), 691–697. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1018>
- Dal, A., Ac, A., & Hastanesi, A. (n.d.). *cerrahi yaklaşım*. 4.
- Dagliesh, G. L., Furge, K., Greenman, C., Chen, L., Bignell, G., Butler, A., Davies, H., Edkins, S., Hardy, C., Latimer, C., Teague, J., Andrews, J., Barthorpe, S., Beare, D., Buck, G., Campbell, P. J., Forbes, S., Jia, M., Jones, D., ... Futreal, P. A. (2010). Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature*, 463(7279), 360–363. <https://doi.org/10.1038/nature08672>
- Denny, P., Feuermann, M., Hill, D. P., Lovering, R. C., Plun-Favreau, H., & Roncaglia, P. (2018). Exploring autophagy with Gene Ontology. *Autophagy*, 14(3), 419–436. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1415189>
- Duns, G., Hofstra, R. M. W., Sietzema, J. G., Hollema, H., van Duivenbode, I., Kuik, A., Giezen, C., Jan, O., Bergsma, J. J., Bijnen, H., van der Vlies, P., van den Berg, E., & Kok, K. (2012). Targeted exome sequencing in clear cell renal cell carcinoma tumors suggests aberrant chromatin regulation as a crucial step in ccRCC development. *Human Mutation*, 33(7), 1059–1062. <https://doi.org/10.1002/humu.22090>
- Eichelberg, C., Junker, K., Ljungberg, B., & Moch, H. (2009). Diagnostic and Prognostic Molecular Markers for Renal Cell Carcinoma: A Critical Appraisal of the Current State of Research and Clinical Applicability. *European Urology*, 55(4), 851–863. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.01.003>
- Eloranta, S., Smedby, K. E., Dickman, P. W., & Andersson, T. M. (2020). Cancer survival statistics for patients and healthcare professionals – a tutorial of real-

- world data analysis. *Journal of Internal Medicine*, 1–17.  
<https://doi.org/10.1111/joim.13139>
- Emilio, S., Luigi, V., Riccardo, B., Carlo, G., Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A., Eloranta, S., Smedby, K. E., Dickman, P. W., Andersson, T. M., Merlo, L. M. F., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2019). Lifestyle in urology: Cancer. *Nature Reviews Cancer*, 69(1), 924–935.  
<https://doi.org/10.1177/0391560319846012>
- Feng, X., Zhang, L., Tu, W., & Cang, S. (2019). Frequency, incidence and survival outcomes of clear cell renal cell carcinoma in the United States from 1973 to 2014: A SEER-based analysis. *Medicine*, 98(31), e16684.  
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016684>
- Fisher, R., Pusztai, L., & Swanton, C. (2013). Cancer heterogeneity: Implications for targeted therapeutics. *British Journal of Cancer*, 108(3), 479–485.  
<https://doi.org/10.1038/bjc.2012.581>
- Fisher, Rosalie, Horswell, S., Rowan, A., Salm, M. P., de Bruin, E. C., Gulati, S., McGranahan, N., Stares, M., Gerlinger, M., Varela, I., Crockford, A., Favero, F., Quidville, V., André, F., Navas, C., Grönroos, E., Nicol, D., Hazell, S., Hrouda, D., ... Swanton, C. (2014). Development of synchronous VHL syndrome tumors reveals contingencies and constraints to tumor evolution. *Genome Biology*, 15(8), 433. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0433-z>
- Gerlinger, M., & Gore, M. ; P. T. (2012). Royal Marsden Hospital De-partment of Medicine. *Barts Cancer Institute N Engl J Med*, 366(10), 883–892.  
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1113205>
- Gerlinger, Marco, Catto, J. W., Orntoft, T. F., Real, F. X., Zwarthoff, E. C., & Swanton, C. (2015). Intratumour heterogeneity in urologic cancers: From molecular evidence to clinical implications. *European Urology*, 67(4), 729–737.  
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.04.014>
- Girgis, A. H., Iakovlev, V. V., Beheshti, B., Bayani, J., Squire, J. A., Bui, A., Mankaruos, M., Youssef, Y., Khalil, B., Khella, H., Pasic, M., & Yousef, G. M. (2012). Multilevel whole-genome analysis reveals candidate biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Research*, 72(20), 5273–5284.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0656>
- Gong, X., Zhao, H., Saar, M., Peehl, D. M., & Brooks, J. D. (2019). miR-22 Regulates Invasion, Gene Expression and Predicts Overall Survival in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Kidney Cancer*, 3(2), 119–132.  
<https://doi.org/10.3233/kca-190051>
- Gorrini, C., Squatrito, M., Luise, C., Syed, N., Perna, D., Wark, L., Martinato, F., Sardella, D., Verrecchia, A., Bennett, S., Confalonieri, S., Cesaroni, M., Marchesi, F., Gasco, M., Scanziani, E., Capra, M., Mai, S., Nuciforo, P., Crook, T., ... Amati, B. (2007). Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature*, 448(7157), 1063–1067. <https://doi.org/10.1038/nature06055>
- Gossage, L., Eisen, T., & Maher, E. R. (2015). VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nature Reviews Cancer*, 15(1), 55–64.  
<https://doi.org/10.1038/nrc3844>
- Graham, T. A., & Sottoriva, A. (2017). Measuring cancer evolution from the genome. *Journal of Pathology*, 241(2), 183–191.  
<https://doi.org/10.1002/path.4821>

- Grimm, M. O., Wolff, I., Zastrow, S., Fröhner, M., & Wirth, M. (2010). Advances in renal cell carcinoma treatment. *Therapeutic Advances in Urology*, 2(1), 11–17. <https://doi.org/10.1177/1756287210364959>
- Groß, A., Chernyakov, D., Gallwitz, L., Bornkessel, N., & Edemir, B. (2020). Deletion of von hippel–lindau interferes with hyper osmolality induced gene expression and induces an unfavorable gene expression pattern. *Cancers*, 12(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cancers12020420>
- Guo, G., Gui, Y., Gao, S., Tang, A., Hu, X., Huang, Y., Jia, W., Li, Z., He, M., Sun, L., Song, P., Sun, X., Zhao, X., Yang, S., Liang, C., Wan, S., Zhou, F., Chen, C., Zhu, J., ... Wang, J. (2012). Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Nature Genetics*, 44(1), 17–19. <https://doi.org/10.1038/ng.1014>
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 67–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
- Hejna, J., Holtorf, M., Hines, J., Mathewson, L., Hemphill, A., Al-Dhalimy, M., Olson, S. B., & Moses, R. E. (2008). Tip60 is required for DNA interstrand cross-link repair in the fanconi anemia pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9844–9851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709076200>
- Heng, D. Y. C., Xie, W., Regan, M. M., Warren, M. A., Golshayan, A. R., Sahi, C., Eigl, B. J., Ruether, J. D., Cheng, T., North, S., Peter, V., Knox, J. J., Chi, K. N., Kollmannsberger, C., McDermott, D. F., Oh, W. K., Atkins, M. B., Bukowski, R. M., Rini, B. I., & Choueiri, T. K. (2009). Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: Results from a large, multicenter study. *Journal of Clinical Oncology*, 27(34), 5794–5799. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.4809>
- Hes, O., Compérat, E. M., & Rioux-Leclercq, N. (2016). Clear cell papillary renal cell carcinoma, renal angiomyoadenomatous tumor, and renal cell carcinoma with leiomyomatous stroma relationship of 3 types of renal tumors: a review. *Annals of Diagnostic Pathology*, 21, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2015.11.003>
- Hu, Y., Liu, H.-X., Jena, P. K., Sheng, L., Ali, M. R., & Wan, Y.-J. Y. (2020). miR-22 inhibition reduces hepatic steatosis via FGF21 and FGFR1 induction. *JHEP Reports*, 2(2), 100093. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100093>
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., & Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes and Development*, 12(2), 149–162. <https://doi.org/10.1101/gad.12.2.149>
- Jewell, U. R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., & Gassmann, M. (2001). *Jewell et al. 2001 Induction of HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia is instantaneous.pdf*. 2.
- Juan, D., Alexe, G., Antes, T., Liu, H., Madabhushi, A., Delisi, C., Ganesan, S., Bhanot, G., & Liou, L. S. (2010). Identification of a MicroRNA Panel for Clear-cell Kidney Cancer. *Urology*, 75(4), 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.10.033>
- Jünemann, S., Kleinbölting, N., Jaenicke, S., Henke, C., Hassa, J., Nelkner, J., Stolze, Y., Albaum, S. P., Schlüter, A., Goesmann, A., Sczyrba, A., & Stoye, J.

- (2017). Bioinformatics for NGS-based metagenomics and the application to biogas research. *Journal of Biotechnology*, 261(August), 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.012>
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), 109–114. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr988>
- Karner, C., Kew, K., Wakefield, V., Masento, N., & Edwards, S. J. (2019). Targeted therapies for previously treated advanced or metastatic renal cell carcinoma: Systematic review and network meta-analysis. *BMJ Open*, 9(3), 1–10. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-024691>
- Karner, C., Kew, K., Wakefield, V., Masento, N., Edwards, S. J., سعيد, ص. ف., Burrell, R. A., Mcgranahan, N., Bartek, J., Swanton, C., Garcia, J. A., Cowey, C. L., Godley, P. A., Mcgranahan, N., Swanton, C., Girgis, A. H., Iakovlev, V. V., Beheshti, B., Bayani, J., ... Hughes, R. (2009). Renal Cell Carcinoma. *Nature*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01293-6>
- Kim, M.-Y., Ann, E.-J., Kim, J.-Y., Mo, J.-S., Park, J.-H., Kim, S.-Y., Seo, M.-S., & Park, H.-S. (2007). Tip60 Histone Acetyltransferase Acts as a Negative Regulator of Notch1 Signaling by Means of Acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(18), 6506–6519. <https://doi.org/10.1128/mcb.01515-06>
- Koudijs, K. K. M., Terwisscha van Scheltinga, A. G. T., Böhringer, S., Schimmel, K. J. M., & Guchelaar, H. J. (2019). The impact of estimated tumour purity on gene expression-based drug repositioning of Clear Cell Renal Cell Carcinoma samples. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39891-y>
- Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., Acker, T., Flamme, I., & Plate, K. H. (2000). Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene*, 19(48), 5435–5443. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203938>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Legube, G., Linares, L. K., Lemercier, C., Scheffner, M., Khochbin, S., & Trouche, D. (2002). Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation. *EMBO Journal*, 21(7), 1704–1712. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1704>
- Liu, X., Jiang, L., Wang, A., Yu, J., Shi, F., & Zhou, X. (2009). MicroRNA-138 suppresses invasion and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Letters*, 286(2), 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.030>
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., & Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834–838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
- Luo, Y., Chen, L., Wang, G., Xiao, Y., Ju, L., & Wang, X. (2019). Identification of a three-miRNA signature as a novel potential prognostic biomarker in patients

- with clear cell renal cell carcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(8), 13751–13764. <https://doi.org/10.1002/jcb.28648>
- Manuscript, A. (2013). *Europe PMC Funders Group p53 and MDM2 in Renal Cell Carcinoma* : 116(4), 780–790. <https://doi.org/10.1002/cncr.24841.p53>
- Manuscript, A. (2014). 27 Cbio-. *Sci Signal*, 6(269), 1–34. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>. Integrative
- Maranchie, J. K., Vasselli, J. R., Riss, J., Bonifacino, J. S., Linehan, W. M., & Klausner, R. D. (2002). The contribution of VHL substrate binding and HIF1- $\alpha$  to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell*, 1(3), 247–255. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00044-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00044-2)
- McGuire, B. B., & Fitzpatrick, J. M. (2011). BMI and the risk of renal cell carcinoma. *Current Opinion in Urology*, 21(5), 356–361. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e32834962d5>
- Mchugh, M. L. (2013). The Chi-square test of independence Lessons in biostatistics. *Biochemia Medica*, 23(2), 143–149. <https://doi.org/10.11613/BM.2013.018>
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(2), 117–134. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9178-9>
- Nabi, S., Kessler, E. R., Bernard, B., Flaig, T. W., & Lam, E. T. (2018). Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Research*, 7(0), 307. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13179.1>
- Nickerson, M. L., Jaeger, E., Shi, Y., Durocher, J. A., Mahurkar, S., Zaridze, D., Matveev, V., Janout, V., Kollarova, H., Bencko, V., Navratilova, M., Szeszenia-Dabrowska, N., Mates, D., Mukeria, A., Holcatova, I., Schmidt, L. S., Toro, J. R., Karami, S., Hung, R., ... Moore, L. E. (2008). Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clinical Cancer Research*, 14(15), 4726–4734. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4921>
- Nobile, M. S., Cazzaniga, P., Tangherloni, A., & Besozzi, D. (2017). Graphics processing units in bioinformatics, computational biology and systems biology. *Briefings in Bioinformatics*, 18(5), 870–885. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw058>
- Oliver, G. R., Hart, S. N., & Klee, E. W. (2015). Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clinical Chemistry*, 61(1), 124–135. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.224360>
- Ortiz-Estevez, M., Aramburu, A., Bengtsson, H., Neuvial, P., & Rubio, A. (2012). CalMaTe: A method and software to improve allele-specific copy number of SNP arrays for downstream segmentation. *Bioinformatics*, 28(13), 1793–1794. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts248>
- Padala, S. A., & Kallam, A. (2020). *Cancer , Clear Cell Renal Carcinoma Pathophysiology Histopathology Treatment / Management*. 5–9.
- Park, J. Y., Helm, J., Coppola, D., Kim, D., Malafa, M., & Kim, S. J. (2011). MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 17(7), 817–827. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i7.817>
- Perez-Perri, J. I., Dengler, V. L., Audetat, K. A., Pandey, A., Bonner, E. A., Urh, M., Mendez, J., Daniels, D. L., Wappner, P., Galbraith, M. D., & Espinosa, J. M. (2016). The TIP60 Complex Is a Conserved Coactivator of HIF1A. *Cell Reports*, 16(1), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.082>

- Perl, K., Ushakov, K., Pozniak, Y., Yizhar-Barnea, O., Bhonker, Y., Shivatzki, S., Geiger, T., Avraham, K. B., & Shamir, R. (2017). Reduced changes in protein compared to mRNA levels across non-proliferating tissues. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3683-9>
- Potochnik, A., Colombo, M., Wright, C., Potochnik, A., Colombo, M., & Wright, C. (2018). Statistics and Probability. *Recipes for Science, Table 2*, 167–206. <https://doi.org/10.4324/9781315686875-6>
- Prando, A. (2002). Enhancement characteristics of papillary renal neoplasms revealed on triphasic helical CT of the kidneys: Editorial comment. *International Braz J Urol*, *28*(2), 165–166.
- Protzel, C., Maruschke, M., & Hakenberg, O. W. (2012). Epidemiology, Aetiology, and Pathogenesis of Renal Cell Carcinoma. *European Urology, Supplements*, *11*(3), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2012.05.002>
- Qayyum, T., McArdle, P., Orange, C., Seywright, M., Horgan, P., Oades, G., Aitchison, M., & Edwards, J. (2013). Reclassification of the Fuhrman grading system in renal cell carcinoma-does it make a difference? *SpringerPlus*, *2*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-378>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, *3*(3), 71–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558171> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4280562>
- Rathmell, W. K., & Godley, P. A. (2010). Recent updates in renal cell carcinoma. *Current Opinion in Oncology*, *22*(3), 250–256. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e328337a5d2>
- Rini, B. I., & Atkins, M. B. (2009). Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *The Lancet Oncology*, *10*(10), 992–1000. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70240-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70240-2)
- Rohan, S. M., Xiao, Y., Liang, Y., Dudas, M. E., Al-Ahmadie, H. A., Fine, S. W., Gopalan, A., Reuter, V. E., Rosenblum, M. K., Russo, P., & Tickoo, S. K. (2011). Clear-cell papillary renal cell carcinoma: Molecular and immunohistochemical analysis with emphasis on the von Hippel-Lindau gene and hypoxia-inducible factor pathway-related proteins. *Modern Pathology*, *24*(9), 1207–1220. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.80>
- Ruxton, G. D. (2006). The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann-Whitney U test. *Behavioral Ecology*, *17*(4), 688–690. <https://doi.org/10.1093/beheco/ark016>
- Savage, P. D. (1994). Renal cell carcinoma. In *Current Opinion in Oncology* (Vol. 6, Issue 3). <https://doi.org/10.1097/00001622-199405000-00013>
- Scelo, G., Riazalhosseini, Y., Greger, L., Letourneau, L., González-Porta, M., Wozniak, M. B., Bourgey, M., Harnden, P., Egevad, L., Jackson, S. M., Karimzadeh, M., Arseneault, M., Lepage, P., How-Kit, A., Daunay, A., Renault, V., Blanché, H., Tubacher, E., Sehmoun, J., ... Lathrop, G. M. (2014). Variation in genomic landscape of clear cell renal cell carcinoma across Europe. *Nature Communications*, *5*(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms6135>
- Selli, C., Hinshaw, W. M., Woodard, B. H., & Paulson, D. F. (1983). Stratification of risk factors in renal cell carcinoma. *Cancer*, *52*(5), 899–903. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19830901\)52:5<899::AID-](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19830901)52:5<899::AID-)

CNCR2820520526>3.0.CO;2-#

- Shuliang Chen, Peter Novick, and S. F.-N. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Song, T., Zhang, X., Wang, C., Wu, Y., Cai, W., Gao, J., & Hong, B. (2011). MiR-138 suppresses expression of hypoxia-inducible factor: 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in clear cell renal cell carcinoma 786-O cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12(5), 1307–1311.
- Suárez, C., Morales, R., Muñoz, E., Rodón, J., Valverde, C. M., & Carles, J. (2010). Molecular basis for the treatment of renal cell carcinoma. *Clinical and Translational Oncology*, 12(1), 15–21. <https://doi.org/10.1007/s12094-010-0461-4>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., & Price, B. D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37), 13182–13187. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504211102>
- Swami, U., Nussenzweig, R. H., Haaland, B., & Agarwal, N. (2019). Revisiting AJCC TNM staging for renal cell carcinoma: quest for improvement. *Annals of Translational Medicine*, 7(S1), S18–S18. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.01.50>
- Türkiye kanser istatistikleri 2016*. (2019).
- van den Berg, E. (2013). Renal Cell Carcinoma. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 130–132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01293-6>
- Van Dijk, B. A. C., Schouten, L. J., Oosterwijk, E., Hulsbergen-Van De Kaa, C. A., Kiemeny, L. A. L. M., Goldbohm, R. A., Schalken, J. A., & Van Den Brandt, P. A. (2006). Cigarette smoking, von Hippel-Lindau gene mutations and sporadic renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 95(3), 374–377. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603281>
- Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299–309. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>
- Wang, J., Li, Y., Ding, M., Zhang, H., Xu, X., & Tang, J. (2017). Molecular mechanisms and clinical applications of MIR-22 in regulating malignant progression in human cancer (Review). *International Journal of Oncology*, 50(2), 345–355. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3811>
- Wang, Z., Zhang, Z., Zhang, C., & Xu, Y. (2018). Identification of potential pathogenic biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. *Oncology Letters*, 15(6), 8491–8499. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8398>
- White, N. M. A., Bao, T. T., Grigull, J., Youssef, Y. M., Girgis, A., Diamandis, M., Fatoohi, E., Metias, M., Honey, R. J., Stewart, R., Pace, K. T., Bjarnason, G. A.,

- & Yousef, G. M. (2011). MiRNA profiling for clear cell renal cell carcinoma: Biomarker discovery and identification of potential controls and consequences of miRNA dysregulation. *Journal of Urology*, *186*(3), 1077–1083. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.04.110>
- Wierzbicki, P. M., Klacz, J., Kotulak-Chrzaszcz, A., Wronska, A., Stanislawowski, M., Rybarczyk, A., Ludziejewska, A., Kmiec, Z., & Matuszewski, M. (2019). Prognostic significance of VHL, HIF1A, HIF2A, VEGFA and p53 expression in patients with clear-cell renal cell carcinoma treated with sunitinib as first-line treatment. *International Journal of Oncology*, *55*(2), 371–390. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4830>
- Woldrich, J. M., Mallin, K., Ritchey, J., Carroll, P. R., & Kane, C. J. (2008). Sex Differences in Renal Cell Cancer Presentation and Survival: An Analysis of the National Cancer Database, 1993-2004. *Journal of Urology*, *179*(5), 1709–1713. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.01.024>
- Wu, S., Jiang, F., Wu, H., Wang, Y., Xu, R., Cao, J., Lu, Q., Zhu, X., Zhong, Z., & Zhao, X. (2018). Prognostic significance of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  expression in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, *17*(3), 4846–4852. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8409>
- Wuttig, D., Zastrow, S., Füssel, S., Toma, M. I., Meinhardt, M., Kalman, K., Junker, K., Sanjmyatav, J., Boll, K., Hackermüller, J., Rolle, A., Grimm, M. O., & Wirth, M. P. (2012). CD31, EDNRB and TSPAN7 are promising prognostic markers in clear-cell renal cell carcinoma revealed by genome-wide expression analyses of primary tumors and metastases. *International Journal of Cancer*, *131*(5). <https://doi.org/10.1002/ijc.27419>
- Xiao, W., Wang, X., Wang, T., & Xing, J. (2019). MiR-223-3p promotes cell proliferation and metastasis by downregulating SLC4A4 in clear cell renal cell carcinoma. *Aging*, *11*(2), 615–633. <https://doi.org/10.18632/aging.101763>
- Yao, M., Huang, Y., Shioi, K., Hattori, K., Murakami, T., Sano, F., Baba, M., Kondo, K., Nakaigawa, N., Kishida, T., Nagashima, Y., Yamada-Okabe, H., & Kubota, Y. (2008). A three-gene expression signature model to predict clinical outcome of clear cell renal carcinoma. *International Journal of Cancer*, *123*(5), 1126–1132. <https://doi.org/10.1002/ijc.23641>
- Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, *21*(3), 497–503. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.497>
- Zhang, R.-L., Aimudula, A., Dai, J.-H., & Bao, Y.-X. (2020). RASA1 inhibits the progression of renal cell carcinoma by decreasing the expression of miR-223-3p and promoting the expression of FBXW7. *Bioscience Reports*, *0*(June), 1–12. <https://doi.org/10.1042/bsr20194143>
- Zhao, Y., & Srivastava, D. (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(4), 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.02.006>



## 7. SİMGELER VE KISALTMALAR

AKT: Serine-Threonine Kinase 1  
AML: Akut miyeloid lösemi  
Ago2: Argonaute RISC Catalytic Component 2  
ATM: Ataksi telanjiektazi mutant  
BAP1: BRCA1 Associated Protein 1  
Bcl-2: Apoptoz Düzenleyici Yolak  
BHTRHK: Berrak hücreli tip renal hücreli karsinom  
CD10: Nötr endopeptidaz  
CD31: Trombosit endotel hücresi yapışma molekülü  
CDK8: Cell division protein kinase 8  
CNV: Genlerin mRNA seviyesinde kopya sayısına göre varyasyon tayini  
TGF-a: Dönüştürücü büyüme faktörü  
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü'nün  
E2F1: Transcription Factor 1  
EDNRB: Endothelin Receptor Type B  
EPAS1: Endothelial PAS Domain Protein 1  
EPO: Eritropoitein  
FBXW7: F-Box And WD Repeat Domain Containing 7  
FDA: Food and Drug Administration  
FISH: Floresan in-situ hibridizasyon  
KO: Fonksiyonel ortologlar  
FOXO4: Forkhead Box O4  
GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase  
GEO: Gene Expression Omnibus  
GO: Gene Ontoloji  
GSEA: Gene Set Enrichment Analyze  
RT-qPCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu  
GSK3 $\beta$ : Glycogen synthase kinase 3 beta  
HeLa: Rahim ağzı kanseri hücrelerinden türetilen bir hücre hattı  
HDA: Hetero-Duplex Analysis  
*HIF1A*: Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha  
HIF1B: Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Beta  
HIF: Hipoksi indükleyen faktör  
HAT: Histon asetiltransferaz  
HDAC4: Histon deasetilaz 4  
IBM-SSP: Statistical Package for the Social Sciences  
HPV: İnsan papilloma virüsü  
HTLV: İnsan T hücresi lenfotropik virüs tip-1  
INF- $\alpha$ : İnterferon alfa  
TCGA: Kanser Genom Atlası  
KM: Kaplan Meier  
CGH: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon  
*HIF1A*: Lysine Acetyltransferase 5  
kDa: Kilo dalton  
KDM5c: Lysine Demethylase 5C

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
M0: Uzak metastaz yoktur.  
M1: Uzak metastaz vardır.  
MSK: Memorial Sloan Kettering  
miRNA: mikroRNA  
miRPathDB: miRNA Pathway Dictionary Database  
mTOR: The mammalian target of rapamycin  
Mx: Uzak metastazı saptamak için veriler yeterli değildir  
MYCBP: Myc Bağlayıcı Proteini  
N0: Bölgesel lenf nodlarında metastaz yoktur.  
N1: Tek bir lenf nodunda metastaz vardır.  
N2: Birden fazla lenf nodunda metastaz vardır.  
NGS: Next Gene Sequencing  
Nx: Bölgesel lenf nodlarını saptamak için veriler yeterli değildir  
onco-miR: Kanser oluşumunda etkili miRNA'lar  
OS-9: Endoplasmic Reticulum Lectin  
p53: Tumor Protein P53  
PBRM1: Polybromo 1  
PHD: Finger Protein 1  
PI3K: Phosphoinositide 3-kinases  
PDGF: Platelet sağlayıcı büyüme faktörü  
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu  
POLR2G: RNA Polymerase II Subunit G  
pre-miRNA: prekürsör miRNA  
pri-miRNA: primer miRNA  
PHD: prolil hidroksilazlar  
RHK: Renal hücreli kanserler  
RGS5: Regulator Of G Protein Signaling 5  
RISC: RNA ile uyarılan susturma kompleksi  
RNA pol II: RNA polimeraz II  
RNA-Seq: RNA-Dizileme  
RNU48: Small Nucleolar RNA, C/D Box 48  
RPB7: DNA-directed RNA polymerase II subunit  
SETD2: Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferas  
H0: Null Hipotezi  
SSAT2: Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase Family Member 2  
T0: Primer tümöre ait kanıt yok  
T1: Tümör en büyük boyutu  $\leq 7$  cm, böbrek içinde sınırlıdır.  
T1a: Tümör büyük çapı  $\leq 4$  cm'dir.  
T1b: Tümör büyük çapı  $>4$ cm ama  $\leq 7$ cm'dir.  
T2: Tümör en büyük boyutu  $>7$  cm, böbrek içinde sınırlıdır.  
T2a: Tümör büyük çapı  $>7$ cm ama  $\leq 10$ cm'dir.  
T2b: Tümör büyük çapı  $>10$  cm'dir.  
T3: Tümör major venlere yayılmış veya sürrenal bezi veya perinefrik dokuları tutmuş ancak gerotafasyasını aşmamıştır.  
T3a: Tümör renal ven veya segmental dallarını tutmuş veya perirenal ve/veya renal sinüs yağlı doku invazyonu mevcuttur.  
T3b: Tümör Vena Kava'yı diafragma altında gros olarak tutmuştur.

T3c: Tümör Vena Kava'yı diafragma üstünde gros olarak tutmuş veya Vena kava duvar invazyonu mevcuttur.

T4: Tümör gerota fasyasını aşmıştır (İpsilateral adrenal invazyonu).

SNP: Tek nükleotit polimorfizmi

TRBP: Transaktivasyondan Sorumlu RNA Bağlayıcı Protein

3'UTR: Translasyona Uğramayan 3' mRNA bölgesi

TRRAP: Transformation/Transcription Domain Associated Protein

TSPAN7: Tetraspanin 7

TS-miR: Tümör supressör miRNA'lar

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

Tx: Primer tümör saptamak için veriler yeterli değildir.

VEGF: vasküler endotel büyüme faktörü

VCAM1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VHL: Von Hippel-Lindau Hastalığı

## 8. EKLER

### 8.1 Ek.1 Etik Kurul Formu



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 2011-KAEK-26/454  
Konu : Etik Kurul kararı

09 / 10 / 2019

Sayın Doç.Dr.Berna AYTAÇ VURUŞKAN  
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Patoloji AD Öğretim Üyesi

Sorumlu araştırmacısı olduğunuz "*Berrak hücreli tip renal hücreli karsinom gelişiminde miRNA ekspresyon farklılıklarının araştırılması ve klinik ile ilişkisinin belirlenmesi, retrospektif araştırma*" başlıklı araştırmanız ile ilgili kurulumuzun 02 Ekim 2019 tarih, 2019-16/19 nolu kararı ekte gönderilmektedir.

Gereği için bilgilerinize sunulur.

Prof.Dr.Mustafa H.İMUSTAFAOĞLU  
Kurul Başkanı

EK:  
-Karar (1 adet)

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası, Görükle Kampüsü 16059 Nilüfer/BURSA  
Tel: 0-224-2950020 Fax: 0-224-2950029  
e-posta: [uukack@uludag.edu.tr](mailto:uukack@uludag.edu.tr) Elektronik Ağ: [www.tip.uludag.edu.tr](http://www.tip.uludag.edu.tr)

**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

<b>ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI</b>	Berrak Hücreli Tıp Renal Hücreli Karsinom Gelişiminde miRNA Ekspresyon Farklılıklarının Araştırılması ve Klinik ile İlişkinin Belirlenmesi, Retrospektif Araştırma
------------------------------	--

<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>	<b>ETİK KURULUN ADI</b>	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2011-KAEK-26
	<b>AÇIK ADRESİ</b>	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Rektörlük Binası Kat.1 Görükle Kampüsü Nilüfer/ Bursa
	<b>TELEFON</b>	0.224. 295 00 20
	<b>FAKS</b>	0.224. 295 00 29
	<b>E-POSTA</b>	uukaek@uludag.edu.tr

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	<b>SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI</b>	Doç.Dr.Berna Aytaç Vuruşkan			
	<b>SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ</b>	Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD			
	<b>YARDIMCI ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI</b>	-Prof.Dr.Ünal Egeci, Prof.Dr.Berrin tunca, Prof.Dr.Gülşah Çeçener -Doç.Dr.Hülya Öztürk Nazlıoğlu -Doç.Dr.Onur Kaygısız, Prof.Dr.Hakan Vuruşkan -YL. Öğr.Havva Tezcan, YL.Öğr.Ufuk Ünal			
	<b>YARDIMCI ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ</b>	-Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD -Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD -Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji AD -Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD			
	<b>DESTEKLEYİCİ</b>	BUÜBAP'a başvurulacaktır			
	<b>ARAŞTIRMANIN TÜRÜ</b>	Retrospektif araştırma			
	<b>ARAŞTIRMANIN YAPILIŞ AMACI</b>	Akademik amaçlı araştırma			
	<b>ARAŞTIRMANIN BAŞLAMA TARİHİ/ SÜRESİ</b>	01.04.2019 / 2 yıl +1 yıl (ek süre)			
	<b>GÖNÜLLÜ/DOSYA SAYISI</b>	150			
	<b>ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER</b>	<b>TEK MERKEZ</b>	<b>ÇOK MERKEZLİ</b>	<b>ULUSAL</b>	<b>ULUSLARARASI</b>
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

<b>DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER</b>	<b>Belge Adı</b>	<b>Tarihi</b>	<b>Dili</b>
	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN DEĞİŞİKLİK BAŞVURU FORMU	19.09.2019	Türkçe
	GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	19.09.2019	Türkçe

<b>DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER</b>	<b>Belge Adı</b>	<b>Açıklama</b>
	ARAŞTIRMA BÜTÇE FORMU	<input checked="" type="checkbox"/> Tarih: 01.10.2019
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	<input checked="" type="checkbox"/> Tarih: 01.10.2019
	PROSPEKTİF ÖZELLİKLI GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA TAAHHÜTNAME	<input type="checkbox"/>
	IKU klavuzunun okunduğuna dair taahhütname	<input checked="" type="checkbox"/> Tarih:19.09.2019
	SONUÇ ÖZET RAPORU	<input type="checkbox"/>
<b>DİĞER:</b>	<input checked="" type="checkbox"/>	Araştırma değişiklik başvuru ön yazısı (01.10.2019), tüm araştırmacılar tarafından imzalanan Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi

**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

<b>ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI</b>	<b>Berrak Hücreli Tip Renal Hücreli Karsinom Gelişiminde miRNA Ekspresyon Farklılıklarının Araştırılması ve Klinik ile İlişkinin Belirlenmesi, Retrospektif Araştırma</b>
------------------------------	---

<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>Karar No: 2019-16/19</b>	<b>Tarih: 02 Ekim 2019</b>
	<p>Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 07 Şubat 2017 tarih ve 2017-1/23 nolu kararı ile uygun buluna ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırmada yapılan değişikliklerin uygun bulunduğuna oybirliği ile karar verildi.</p> <p><b>Yapılan değişiklikler:</b></p> <p>-Araştırmaya yardımcı araştırmacı dahil edilmesi (Prof.Dr.Hakan Vuruşkan, YL.Öğr.Ufuk Ünal)</p> <p>-Araştırmaya 1(bir) yıl ek süre verilmesi</p>	

<b>ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b>	
<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
<b>BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI</b>	Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU

ÜYELER						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişki	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mustafa HACIMUSTAFAOĞLU Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Elif BAŞAĞAN MOĞOL Başkan Yardımcısı	Anesteziyoloji	U.Ü.T.F. Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mehmet CANSEV Üye	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji AD.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Alpaslan TÜRKKAN Üye	Halk Sağlığı	U.Ü.T.F. Halk Sağlığı AD.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	Raporlu
Doç.Dr.Pınar VURAL Üye	Psikiyatri	U.Ü.T.F. Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Hilal ÖZKAN Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Hasan ARI Üye	Kardiyoloji	Bursa Yüksek İhtisas EAH Kardiyoloji Kliniği	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Kağan HUYSAL Üye	Biyokimya	Bursa Yüksek İhtisas EAH Biyokimya	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doktor Öğretim Üyesi Çiğdem Mine YILMAZ Üye	Hukuk	U.Ü.Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doktor Öğretim Üyesi Engin SAĞDİLEK Üye	Biyofizik	U.Ü.T.F. Biyofizik AD.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doktor Öğretim Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp Tarihi ve Etik	U.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik AD.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Selen MİĞAL Üye	Sağlık mesleği mensubu olmayan üye	Serbest Meslek	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı

\*:Toplantıda Bulunma

## 9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilimsel ve manevi desteğini gördüğüm; bilgisi, karakteri ve yardımseverliği ile bana çok şey öğrettiğine inandığım, eğitime ve bilime önem veren, bilgi ve tecrübeleriyle yetişmemi sağlayan her zaman sevgi ve saygı ile anacağım çok değerli hocam, danışmanım Prof. Dr. Gülşah Çeçener'e, eğitimime katkı sağlayan, karşılaştığım her türlü sorunda benden, hoşgörü ve sabrını esirgemeyerek bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktaran, yakın ilgisini her zaman gördüğüm ve bana çok şey öğrettiğine inandığım değerli hocam Prof. Dr. Ünal Egeli'ye, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, emek, hoşgörü ve sabrını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Berrin TUNCA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda emeği geçen, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli hocam Doç. Dr. Berna Aytaç Vuruşkan ve Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hakan Vuruşkan'a teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan her zaman onur duyduğum, zorluklara birlikte göğüs gerdiğimiz, birçok sıkıntılı andan hoşluklar yaratmaya çalıştığımız; destek ve dostluklarını her zaman minnetle anacağım çok değerli çalışma arkadaşlarım doktora öğrencisi Havva Tezcan Ünlü'ye, uzman moleküler biyolog Ecem Efendi Erdem ve ayrıca desteklerini her daim hissettiğim tüm bölüm arkadaşlarım Melis Mutlu, Dilara Kamer Çolak, Çağla Tekin ve tezimin kaynaklar kısmında yer alan tüm araştırmacı ve yazarlara teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca birbirimize karşı saygı, sevgi ve yardımlarımızı hiçbir zaman esirgemediğimiz, bana verdikleri destek ve dostluklarını minnetle anacağım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm personeline teşekkür ederim.

Tez sürecinde her konuda hem maddi hemde manevi tüm yardımlarını esirgemeyen her durumda desteğini hissettiğim hayat arkadaşım Zeynep Kavasoglu'na teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde destekçilerim olan, beni yetiştirip maddi ve manevi her sıkıntıda yardımına yetişen, hayatımın bugününü onlara borçlu olduğum babaannem Asiye Ünal, dedem Hayrettin Ünal ve tüm sevgili aileme, sonsuz teşekkür ederim.

Tez projeme (OUAP(T)2017/3) kaynak oluşturan Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimine teşekkür ve saygılarımı sunarım.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

18 Mart 1993 yılında Bursa ilinde doğmuştur. İlk ve orta öğrenimini Bursa Yahya Kemal Beyatlı İlköğretim Okulu'nda 2007 yılında tamamlamıştır. Lise öğrenimini Bursa Atatürk Anadolu Lisesi'nde Onur Öğrencisi ödülü ile 2011 yılında tamamlamıştır. 2011 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başlamıştır ve 2015 yılının Mayıs ayında mezun olmuştur. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Başarı Ödülüne layık görülmüştür. Hacettepe üniversitesi eğitim katkı bursuna üst üste iki yıl layık görülmüştür. 2018 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp-Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır ve eğitimine halen devam etmektedir.