



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BERRAK HÜCRELİ RENAL HÜCRELİ KARSİNOM
HASTALARINDA BAP1, PBRM1, SETD2 MUTASYONLARININ
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK KORELASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Şeyma EREN

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Serhat TOPRAK**

MALATYA-2022



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BERRAK HÜCRELİ RENAL HÜCRELİ KARSİNOM
HASTALARINDA BAP1, PBRM1, SETD2 MUTASYONLARININ
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
OLARAK KORELASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Dr. Şeyma EREN
ORCID ID: 0000-0002-2791-4676**

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Serhat TOPRAK**

**“Bu tez İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi (BAP) TCD-2021-2772
kodlu proje tarafından desteklenmiştir.”**

MALATYA-2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek ile İlgili Genel Bilgiler	3
2.1.1. Embriyoloji.....	3
2.1.2. Anatomi	5
2.1.3. Histoloji	9
2.2. Böbrek Tümörleri.....	11
2.2.1. İnsidans ve Mortalite	12
2.2.2. Etyoloji	13
2.2.3. Renal Hücreli Karsinomun Histolojik Sınıflandırması	14
2.2.4. Renal Hücreli Karsinomun Sitolojik Derecelendirmesi	16
2.2.5. Renal Hücreli Karsinom Evrelemesi ve Derecelendirmesi	17
2.3. Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinom.....	19
2.3.1. Genel özellikler	19
2.3.2. Makroskopik Bulgular	19
2.3.3. Klinik Özellikler.....	19
2.3.4. Histopatoloji	20
2.3.5. İmmünofenotip	20
2.4. Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinomun Genetik Profili.....	21
2.4.1. Von Hippel–Lindau Tümör Süpressör Geni.....	23
2.4.2. PTEN Geni ve PI3K–AKT–mTOR Yolu.....	24
2.4.3. PBRM-1 Mutasyonu.....	26
2.4.4. BAP-1 Mutasyonu	27
2.4.5. SETD-2 Mutasyonu.....	28

2.5. Ekzom Sekanslama Yöntemi	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Olgu Seçimi ve Klinikopatolojik Verilerin Elde Edilmesi	31
3.2. Ekzom Sekanslama İşlemi ve Analizi.....	32
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	32
3.2.2. Ekzom Sekanslama.....	35
3.3. İmmünohistokimyasal İnceleme	35
3.3.1. İmmünohistokimya Çalışma Prosedürü	35
3.3.2. İmmünohistokimya Değerlendirme Prosedürü.....	37
3.4. İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Klinikopatolojik Veriler	39
4.2. Genel Verilerin Değerlendirilmesi.....	40
4.3. PBRM-1 İmmünohistokimyasal Boyanmasının Değerlendirilmesi.....	41
4.4. BAP-1 İmmünohistokimyasal Boyanmasının Değerlendirilmesi.....	43
4.5. SETD2 İmmünohistokimyasal Boyanmasının Değerlendirilmesi	46
4.6. PBRM-1, BAP-1, SETD2 Mutasyonlarının Birlikteliği	47
4.7. Sağkalım Analizleri.....	48
4.8. Ekzom Sekanslama	49
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR	59
EKLER.....	64
EK-1. Ekzom Sekanslama İşlemi Öncesi Elde Edilen DNA Miktarları.....	64
EK-2. Ekzom Sekanslama Analizi Sonrası Veri Üretiminin İstatistiksel Sonuçları,.	65
EK-3. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen VHL Geni İndel Varyantları	66
EK-4. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen VHL Geninin SNP'leri....	68
EK-5. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen BAP1 SNP'leri.....	70
EK-6. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen PBRM1 SNP'leri.....	71
EK-7. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen PBRM1 İndel'leri.....	75
EK-8. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen SETD2 Geni SNPleri.....	80
EK-9. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen SETD2 Geni İndelleri.....	86
EK-10. Etik Kurul Kararı.....	89

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında bana destek olan, yol gösteren, motive eden tez hocam Dr. Öğr. Üyesi Serhat TOPRAK'a;

Uzmanlık eğitimim süresince bilgilerini ve tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Nusret AKPOLAT'a, Prof. Dr. Neşe KARADAĞ SOYLU'ya, Prof. Dr. Emine ŞAMDANCI'ya, Prof. Dr. Hasan GÖKÇE'ye, Doç. Dr. Saadet ALAN'a, Doç. Dr. Zehra BOZDAĞ'a, Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Nur AKATLI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Elif SAYMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Semra GÜRÜNLÜOĞLU'na;

Çalışmaya büyük zaman ayırması ve katkılarından dolayı Tıbbi Genetik Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet KOÇ ve doktora öğrencisi Nefsun DANIŞ'a;

Çalışmanın istatistiksel analizini gerçekleştirmemde büyük yardımı olan Prof. Dr. Harika Gözde GÖZÜKARA BAĞ ve Zeynep TUNÇ'a;

Bu çalışmanın gerçekleşebilmesi için yardımlarını esirgemeyen moleküler çalışma laboratuvarı, kesit, immünohistokimya ve arşiv ekibi başta olmak üzere tüm İnönü Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı teknik ekibine;

Zorlu ve yorucu olan patoloji uzmanlık eğitimini beraber atlattığımız asistan arkadaşlarım Merve ÖZ, Meryem ULUDAĞ TAŞÇIOĞLU, Özlem DALDA, Cansel Nagehan ŞAHİN, Şeymanur ÇITLAK, Dilara GERÇEK, Asena ÇEVİK'e;

Hayatım boyunca her alanda bana maddi manevi destek olan canım aileme;

Son olarak can yoldaşım, her zaman yanımda olan eşim Emircan EREN ile kıymetli ailesine ve hayatımı daha güzel bir hale getiren küçük kızım Deren Bilge EREN'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Dr. Şeyma EREN

Malatya-2022

ÖZET

Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinom Hastalarında BAP1, PBRM1, SETD2 Mutasyonlarının Varlığının Araştırılması ve İmmünohistokimyasal Olarak Korelasyonunun Değerlendirilmesi

Amaç: Hastaları doğru tedaviye yönlendirmek için tümör örneklerinin moleküler testi giderek önem kazanmaktadır. Bu çalışmanın amacı klinikopatolojik, histomorfolojik özellikler ile BAP1, PBRM1 ve SETD2 genlerindeki mutasyonların etkilerini ve bunların immünohistokimya ile korelasyonunu incelemek ve berrak hücreli renal hücreli karsinom hastalarının tedavisine, prognozuna ve yönetimine rehberlik etmesini araştırmaktır.

Materyal ve Metod: Çalışmaya 2015-2021 yılları arasında nefrektomi uygulanmış, İnönü üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Patoloji laboratuvarında değerlendirilmiş 80 adet ccRCC olgusu alınmıştır. Bu olgular BAP-1, PBRM-1, SETD-2 immünohistokimyasal boyanmaları ile değerlendirilmiştir. 12 olgu ise tüm ekzom dizileme yöntemiyle moleküler olarak mutasyonlar açısından araştırılmıştır.

Bulgular: 80 olgunun %41'inde PBRM-1, %17,5'inde BAP-1, %47,5'inde SETD-2 ile immünohistokimyasal olarak boyanma kaybı bulundu. PBRM-1 ve BAP-1 ile cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, evre, grade, metastaz, arasında ilişki saptanmadı. BAP-1 negatifliği kötü genel sağkalım ile ilişkili bulundu. SETD-2 negatifliği ile ileri evre ve tümör boyutu arasında korelasyon saptandı. PBRM-1 ve BAP-1 negatifliğinin birlikteliği anlamlı bulundu; PBRM1/SETD2, BAP1/SETD2 birlikteliği istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ekzom sekanslama işlemi ile 12 olgunun hiçbirinde VHL, PBRM-1, BAP-1, SETD-2 için anlamlı mutasyon saptanmadı. 7 olguda ARSD, 9 olguda SLC25A5 geninde SNP mutasyonlar saptanmıştır.

Sonuç: BAP-1 ve PBRM-1 ile immünohistokimyasal olarak boyanma oranları literatür ile benzer oranda saptanırken, SETD-2 ile oran literatüre göre daha yüksek oranda saptandı. Ekzom sekanslama ile 12 olgunun hiçbirinde her 3 gene ait anlamlı mutasyon saptanmazken ARSD ve SLC25A5 genlerinde yüksek oranda mutasyonlar izlenmiştir. Bu genlerle ilgili çalışmalar RCC'nin hem moleküler mekanizmasını hem de olası hedefe yönelik tedavileri yönlendirmeye katkı sunacaktır.

Anahtar Kelimeler: BAP-1, ekzom sekanslama, immünohistokimya, PBRM-1, renal hücreli karsinom, SETD-2

ABSTRACT

Investigation of the Presence of BAP1, PBRM1, SETD2 Mutations in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Evaluation of Immunohistochemical Correlation

Aim: Molecular testing of tumor samples is becoming increasingly important to guide patients to the right treatment. The aim of this study is to examine the effects of clinicopathological, histomorphological features and mutations in BAP1, PBRM1 and SETD2 genes and their correlation with IHC and to guide the treatment, prognosis and management of patients with clear cell renal cell carcinoma.

Materials and Methods: 80 ccRCC cases who underwent nephrectomy between 2015-2021 and evaluated in İnönü University Turgut Özal Medical Center Medical Pathology laboratory were included in the study. These cases were evaluated with BAP-1, PBRM-1, SETD-2 IHC staining. Twelve cases were investigated molecularly by whole exome sequencing.

Results: Immunohistochemical staining loss was found in 41% of 80 cases with PBRM-1, 17.5% with BAP-1, and 47.5% with SETD-2. No relationship was found between PBRM-1 and BAP-1 and gender, age, tumor localization, size, stage, grade, metastasis. BAP-1 negativity was associated with poor overall survival. A correlation was found between SETD-2 negativity and advanced stage and tumor size. The coexistence of PBRM-1 and BAP-1 negativity was significant; the association of PBRM1/SETD2, BAP1/SETD2 was not significant. No significant mutations were detected for VHL, PBRM-1, BAP-1, SETD-2 in any of the 12 cases by exome sequencing. SNP mutations were detected in ARSD in 7 and SLC25A5 gene in 9 cases.

Conclusion: IHC staining rates with BAP-1 and PBRM-1 were the same as in the literature, and the rate with SETD-2 was higher than the literature. Exome sequencing did not detect any significant mutations in all 3 genes in any of the 12 cases, while high rates of mutations were observed in ARSD and SLC25A5 genes. Studies on these genes will contribute to directing both the molecular mechanism of RCC and possible targeted therapies.

Keywords: BAP1, exome sequencing, immunohistochemistry, PBRM1, renal cell carcinoma, SETD2

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µm	: Mikrometre
AFIP	: Birleşik Devletler Silahlı Kuvvetleri Patoloji Enstitüsü
AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
BAP-1	: BRCA-1 ilişkili Protein
ccRCC	: Berrak Hücreli Renal hücreli Karsinom
chRCC	: Kromofob Renal Hücreli Karsinom
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
FFPE	: Formalin fiske parafine gömülü
HIF-1α	: Hipoksi-indüklenebilir faktör-1α
ISUP	: International Society of Urological Pathology
ISUP	: Uluslararası Ürolojik Patoloji Topluluğu
İHK	: İmmünohistokimya
PBRM-1	: Polybromo 1
pRCC	: Papiller Renal Hücreli Karsinom
RCC	: Renal Hücreli Karsinom
RNA	: Ribonükleik Asit
SETD2	: SET domain containing 2
SNV	: Tek nükleotid varyantı
VHL	: Von Hippel Lindau
YND	: Yeni nesil dizileme

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Beş haftalık embriyoda boşaltım sisteminin şematik görünümü.....	3
Şekil 2.2. Kalıcı böbreğin öncüsü olan metanefrozun gelişimi	5
Şekil 2.3. Her iki böbreğin ön yüzey komşulukları	6
Şekil 2.4. Böbreğin iç yapısı.....	7
Şekil 2.5. Nefron segmentlerini ve böbreğin bölgelerini gösteren şekil	8
Şekil 2.6. Glomerülün şematik üç boyutlu gösterimi	9
Şekil 2.7. İnsan korteksi histopatolojik görünümü.	11
Şekil 2.8. Tüm Yaş Gruplarındaki Erkeklerde En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Yüzde Dağılımları.....	12
Şekil 2.9. Berrak Hücreli Karsinomda pVHL, HIF1 α ve HIF2 α 'nın Rolü	24
Şekil 2.10. PI3K/Akt yolu	25
Şekil 3.1. Çalışmaya ait olguların histopatolojik görünümü	32
Şekil 3.2. 12 olgunun elektroforezde yürütülmesi sonucu elde edilen görüntü	34
Şekil 4.1. PBRM-1 boyanma paternleri.....	42
Şekil 4.2. PBRM-1'in boyanma dağılımı	42
Şekil 4.3. BAP-1'in boyanma dağılımı	44
Şekil 4.4. BAP-1 boyanma paternleri.....	45
Şekil 4.5. SETD-2'nin boyanma dağılımı	46
Şekil 4.6. SETD2 boyanma paterni	46

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Embriyonik ürogenital yapıların erişkin türevleri ve arta kalan kalıntıları.....	4
Tablo 2.2. 2022 DSÖ Renal hücreli tümörler sınıflaması	16
Tablo 2.3. DSÖ / ISUP derecelendirme sistemi.....	17
Tablo 2.4. AJCC 2017 Böbrek tümörlerinde TNM sınıflaması.....	18
Tablo 2.5. RCC alt tiplerinde immünohistokimyasal boyanma farklılıkları.....	21
Tablo 2.6. Yeni nesil dizileme algoritması	30
Tablo 3.1. DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA miktarları	34
Tablo 4.1. Klinikopatolojik verilere ilişkin tanımlayıcı istatistikler	39
Tablo 4.2. Tümör boyutu ve yaş ortalamaları	40
Tablo 4.3. Metastatik olguların evre, grade ve metastaz yeri dağılımı	40
Tablo 4.4. Evre ve grade'in tümör boyutu ve yaş ile ilişkisi	41
Tablo 4.5. Evre ve grade'e göre cinsiyet dağılımı	41
Tablo 4.6. PBRM-1 boyanmasının evre, grade ve metastaz ile ilişkisi	43
Tablo 4.7. BAP-1 boyanmasının evre, grade ve metastaz açısından değerlendirilmesi	45
Tablo 4.8. SETD2 boyanmasının evre, grade ve metastaz açısından değerlendirilmesi	47
Tablo 4.9. SETD-2 boyaması ile düşük ve yüksek patolojik evre karşılaştırması.....	47
Tablo 4.10. BAP-1 ve PBRM-1'in birlikteliği.....	48
Tablo 4.11. Evreye göre sağkalım oranları	48
Tablo 4.12. Metastaza göre sağkalım oranları	49
Tablo 4.13. BAP-1 sağkalım oranları	49
Tablo 4.14. Ekzom sekanslama yapılan olgular.....	50
Tablo 4.15. ARSD ve SLC25A5 mutasyonlarının özellikleri.....	51

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Renal hücreli karsinomlar (RCC) tüm kanserlerin yaklaşık %2'sini oluşturur ve proksimal tübül epitel hücrelerinden kaynaklanan sporadik veya kalıtsal karsinomları içerirler. Berrak hücreli renal hücreli karsinomlar (ccRCC'ler), bildirilen serilerde böbrek tümörlerinin %60-70'ini içeren en yaygın böbrek malignitesidir.

RCC alt tipleri, moleküler çalışmaların artması, yeni nesil dizileme gibi tüm genomu tarayan çalışmaların yaygınlaşması ile birlikte giderek daha fazla fark edilmeye başlanmıştır. RCC'ler nispeten yakın zamana kadar tek bir antite olarak kabul ediliyordu ancak yapılan çok sayıda histolojik, sitogenetik ve moleküler çalışma ile bu tümörlerin gerçekte bir grup ayrı klinikopatolojik antite oldukları kesin olarak kanıtlanmıştır. Bu grup tümörler davranış olarak da birbirinden oldukça farklılık göstermekte, hastaların sağkalımlarına etki göstermekte, tedavi seçenekleri açısından çeşitlilik sunmaktadır.

Moleküler çalışmalar normoksik durumlarda hidrosillenmiş hipoksiye indüklenebilir faktörü (HIF) hedefleme ve degrade etmek için normal von Hippel-Lindau (VHL) gen ürünü pVHL'nin gerekli olduğunu göstermiştir. VHL geni boyunca delesyonlar genellikle büyük olduğundan BRCA1 ile ilişkili protein-1 (BAP-1), Polybromo-1 (PBRM-1) ve Set domain-containing-2 (SETD-2) de bu delesyonlarla birlikte kaybolur. Bazı çalışmalarda BAP-1 veya SETD-2 mutant ccRCC'leri olan hastalar kötü genel sağkalım ile ilişkilendirilmişken, PBRM-1 mutasyonları iyi bir ccRCC tümör grubu olarak tanımlanmıştır.

Gen mutasyonu, protein ekspresyonu kaybı ve klinikopatolojik parametrelerle korelasyonlar arasındaki ilişki, böbrek tümörlerinin ilerlemesini anlamak için önemlidir. Aynı zamanda moleküler çalışmalar oldukça pahalı ve zaman alan çalışmalardır. Mutasyonları saptayıcı immünohistokimyasal çalışmalar hem zaman hem de maddi olarak daha pratik kullanım imkânı sağlar.

Tedavi kararlarını yönlendirmek için tümör örneklerinin moleküler testi giderek önem kazanmaktadır. Hastaların moleküler olarak tanımlanmış alt gruplarının tedavisi için çeşitli ilaçlar onaylanmıştır ve tanı gerektiren ajan sayısının hızla artması beklenmektedir.

SETD-2 mutasyonlarının metastatik RCC'lerde daha sık görüldüğüne dair çalışmalar vardır. Metastatik RCC kemoterapötik ajanlara dirençli olup sağkalım oranları düşüktür. Hedefe yönelik tedavilerin ve immünoterapinin mevcut metastatik RCC'lerde sağkalımı iyileştirdiği gösterilmiştir. PBRM-1 kaybının da benzer şekilde immünoterapiye yanıt verdiğine, BAP-1 eksikliği olan hücrelerin iyonize radyasyona ve PARP inhibitörü olaparibe karşı daha duyarlı olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur.

Bu çalışmanın amacı parsiyel/radikal nefrektomi yapılan ccRCC olgularının klinikopatolojik, histomorfolojik özellikler ve prognostik parametreleriyle moleküler olarak analiz edilen BAP-1, PBRM-1 ve SETD-2 genlerindeki mutasyonların etkilerini ve bunların immünohistokimya ile korelasyonunu incelemektir. Yapılan çalışma sonucunda moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılmamış ccRCC hastalarında meydana gelen mutasyonlar ile ilgili literatüre katkı sunmak ve bu mutasyonların hastaların tedavisine, prognozuna ve yönetimine rehberlik etmesine aracılık etmektir. Mutasyonların aydınlatılması ile hasta bazlı kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerinin uygulanması ccRCC hastaları için oldukça umut vericidir.

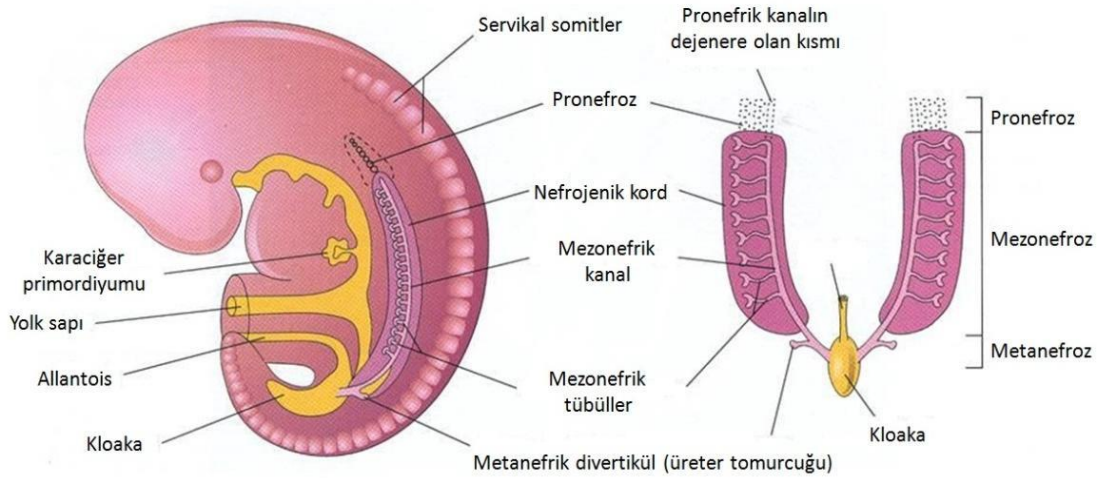
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek ile İlgili Genel Bilgiler

2.1.1. Embriyoloji

Organogenez, embriyogenezin üçüncü haftasında başlar ve ilk olarak merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemler gelişir. Ürogenital sistem, gelişen son organ sistemidir. Böbrek gelişimi sırasıyla üç aşamadan geçer: Pronefroz, mezonefroz ve metanefroz (Şekil 2.1). Her üç sistem de dorsal somitler ile lateral plaka mezoderm (LPM) arasında yer alan ve servikal bölgeden kaudal bölgeye uzanan ara mezodermden gelişir. Pronefroz ve mezonefroz, memelilerde kalıcı yapılar değildir (1).

Üriner ve genital sistem, gelişimin erken döneminde embriyolojik ve anatomik açıdan birbiriyle oldukça yakın ilişki içerisindeyler. Her iki sistem de ortak bir mezodermden gelişir. Başlangıçta ikisi de kloakaya açılırken böbrekler kraniokaudal yönde gelişimine devam ederler (2).



Şekil 2.1. Beş haftalık embriyoda boşaltım sisteminin şematik görünümü (3) Pronefroz, Mezonefroz, Metanefroz

Pronefroz

Pronefroz, embriyogenez aşamasında dördüncü haftanın başında, servikal bölgede nefrojenik kordun kranial kısmında glomus (glomerül benzeri yapı), tübüller ve duktustan oluşan ve fonksiyonu olmayan rudimenter bir organdır. Dördüncü haftanın

sonunda glomus ve tübüller dejenere olurken pronefrik duktus kaudale doğru ilerler ve mezonefrik duktus oluşur (1).

Mezonefroz

Mezonefrozlar kalıcı böbrek oluşana kadar işlevseldir. Mezonefrozlar, glomerüller ve mezonefrik tübüllerden oluşur. Tübüller original olarak pronefrik kanallar olan mezonefrik kanallara, mezonefrik kanallar kloakaya açılır. İlk trimesterin sonuna doğru mezonefrozlar dejenere olmaya başlar ancak mezonefrik tübüller testislerin efferent kanalcıklarına dönüşür ve mezonefrik kanalların erkekte birkaç işlevsel türevi bulunur (3) (Tablo 2.1).

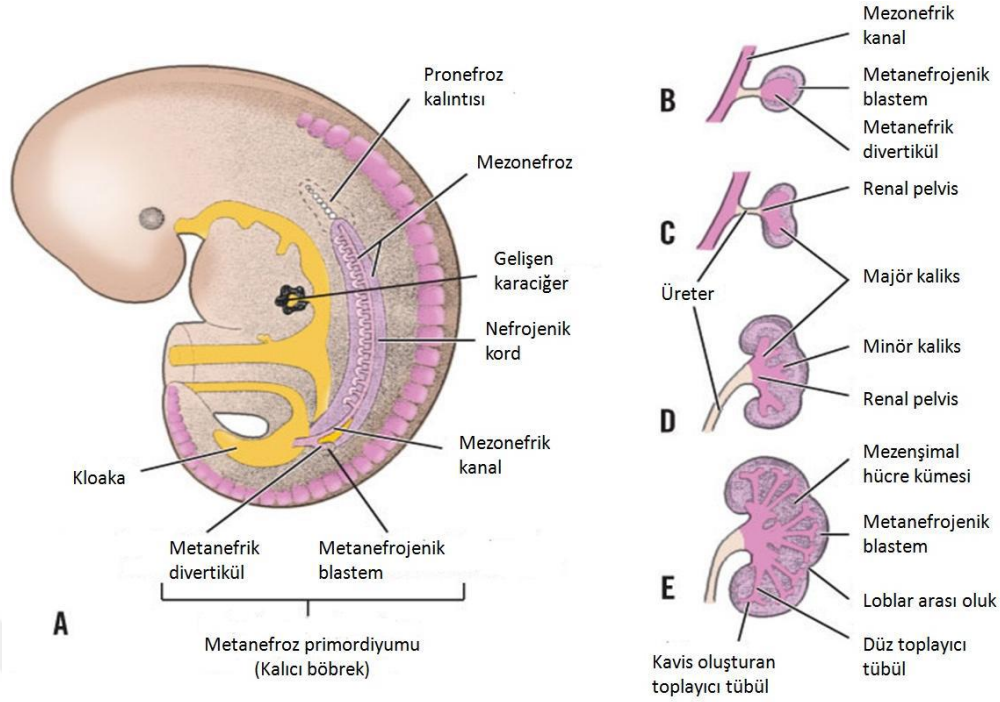
Tablo 2.1. Embriyonik ürogenital yapıların erişkin türevleri ve arta kalan kalıntıları*(3)

ERKEK	EMBRİYONİK YAPI	DIŞI
Testisin duktuli efferenti	Mezonefrik tübüller	Epoophoron
Paradidimis		Paraophoron
Epididimisin appendiksi	Mezonefrik kanal	Appendiks veziküloza
Epididimisin kanalı		Epoophoronun kanalı
<i>Duktus deferens</i>		Gartner kanalı
<i>Üreter, pelvis, kaliksler ve toplayıcı tübüller</i>		<i>Üreter, pelvis, kaliksler ve toplayıcı tübüller</i>
<i>Ejakulatuar kanal ve seminal bez</i>		
Testisin appendiksi	Paramezonefrik kanal	Morgagni hidaditi <i>Tuba uterina</i> <i>Uterus</i>

*İşlevsel türevler italik olarak gösterilmiştir

Metanefroz

Kalıcı böbreklerin ilk hali olan metanefrozlar beşinci haftanın başında gelişmeye ve yaklaşık 4 hafta sonra da işlevsellik kazanmaya başlar. İdrar, amniyon boşluğuna atılır ve amniyon sıvısıyla karışır. Son böbrekler metanefrik divertikül ve ara mezodermin metanefrik kitlesi (metanefrik blastema) olmak üzere iki kaynaktan gelişir (Şekil 2.2). Metanefrik divertikül üreter, renal pelvis, kaliksler ve toplayıcı tübüllerin öncüsüdür. Böbrekler işlevsel olarak doğum sonrasında olgunlaşır (3).



A, 5 haftalık embriyonun lateral görünümünde metanefroz primordiyumu izlenmektedir. B-E arası metanefrik divertikülün gelişimindeki ardışık evreler (5-8. haftalar arası) (3).

Şekil 2.2. Kalıcı böbreğin öncüsü olan metanefrozun gelişimi

2.1.2. Anatomi

Böbreğin makro anatomisi ve komşulukları

Böbrekler, Gerota fasyası içindeki yağ dokusu tarafından diğer organlardan ayrılmış bir çift retroperitoneal organlardır (4). Vertebral kolonun lateralinde ekstraperitoneal bağ dokusu içinde bulunurlar. Sırtüstü pozisyonda, böbrekler üstte yaklaşık 12. torakal vertebradan altta 3. lomber vertebraya uzanım gösterir, sağ böbrek karaciğer ile ilişkisi nedeniyle sola kıyasla biraz daha aşağıda yerleşim gösterir. Sağ ve sol böbrek boyut ve şekil olarak benzer olmalarına rağmen, sol böbrek daha uzun ve daha ince olup orta hatta daha yakındır (5).

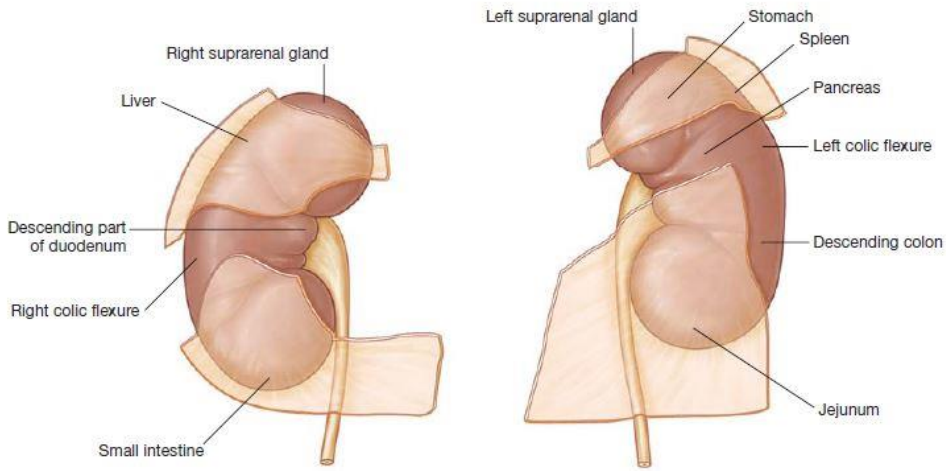
Böbrekler 1 mm'den daha ince fibröz gerçek bir kapsül ile kaplıdır. Kapsül alttaki renal kortikal parankime yapışık ancak normal böbrekten kolayca ayrılabilir. Yenidoğan böbreği aynı böbrek şekline sahip yetişkin böbreğinden daha küçüktür ve belirgin fetal lobasyonlar gösterir. Yenidoğanlarda böbrek ağırlığı 13 ila 44 g arasında olup bu yetişkinlikte erkeklerde 125-170 g'a, kadınlarda 115-155 g'a yükselir. Ağırlığın yüzey alanı ile orantılı olduğu gösterilmiştir. Ortalama bir yetişkin böbreği 11-12 cm uzunluğunda, 5-7 cm genişliğinde ve 2,5-3 cm kalınlığındadır (4).

Sağ ve sol böbreğin ön yüzeyi, bazıları bir periton tabakası ile böbrekten ayrılan ve bazıları doğrudan böbreğe komşu olan çok sayıda yapı ile ilişkilidir (Şekil 2.3). Sağ böbrek:

- Üst polün küçük bir kısmı sağ böbrek üstü beziyle örtülüdür;
- Inferiora doğru, ön yüzeyin üst kısmının geri kalanının büyük bir kısmı karaciğerden bir periton tabakası ile ayrılır;
- Medialde, duodenumun inen kısmı retroperitonealdir ve böbreğe komşudur;
- Böbreğin alt kutbu, yan tarafında, doğrudan sağ kolik flexura ile ilişkilidir ve medialde ince barsağın bir bölümü ile komşudur.

Sol böbrek:

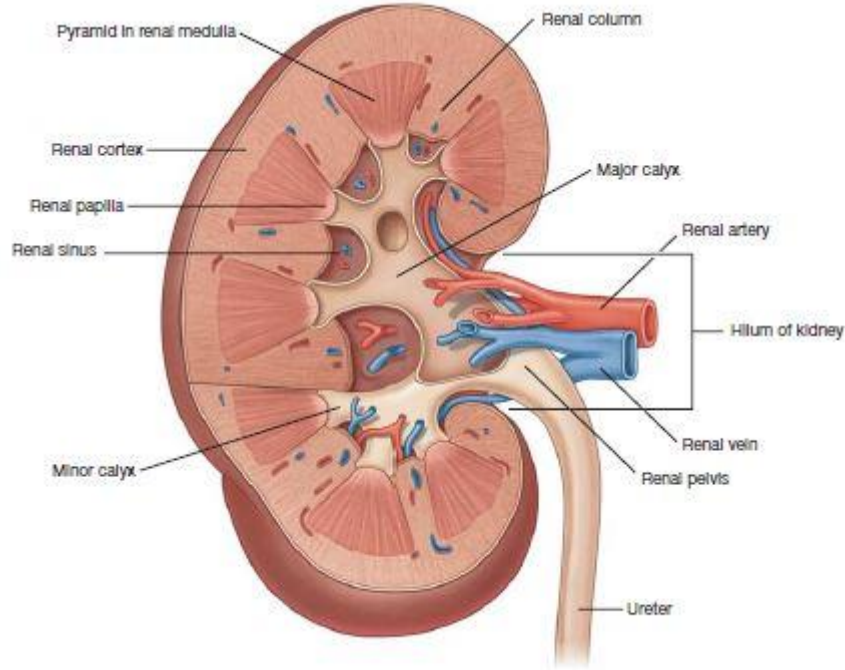
- Üst polün küçük bir kısmı, medialde sol böbreküstü bezi ile örtülüdür;
- Üst polün kalanı mide ve dalak ile komşudur;
- Inferiora doğru retroperitoneal pankreas böbreğin orta kısmını kaplar;
- Yan tarafında, böbreğin alt yarısı sol kolik fleksura ve inen kolonun başlangıcı ile ve medial tarafında jejunumun bir kısmı ile komşudur (5).



Şekil 2.3. Her iki böbreğin ön yüzey komşulukları(6)

Her iki böbreğin medial kenarında damar, lenfatik ve sinirlerin böbreğe girip çıktığı hilus bulunur. Hilusun devamı renal sinüstür. Perinefrik yağ, hilus ve sinüse doğru devam eder ve tüm yapıları çevreler.

Her iki böbrek dışta renal korteks ve içte renal medulladan oluşur. Renal korteks, medullayı çevreler. Renal korteksin uzantıları (renal kolonlar) böbreğin iç yüzüne doğru uzanır ve renal medullayı üçgen şeklindeki böbrek piramitlerine böler (5).



Şekil 2.4. Böbreğin iç yapısı (5)

Renal piramitlerin tabanları renal kortekse doğru uzanırken, her renal piramidin apeksi renal sinüse uzanım gösterir. Apikal çıkıntı (renal papilla) minör kaliks ile çevrilidir. Minör kaliksler idrar alır. Renal sinüste, birkaç minör kaliks birleşerek majör kaliksi, iki veya üç majör kaliks birleşerek renal pelvisi oluşturur (Şekil 2.4).

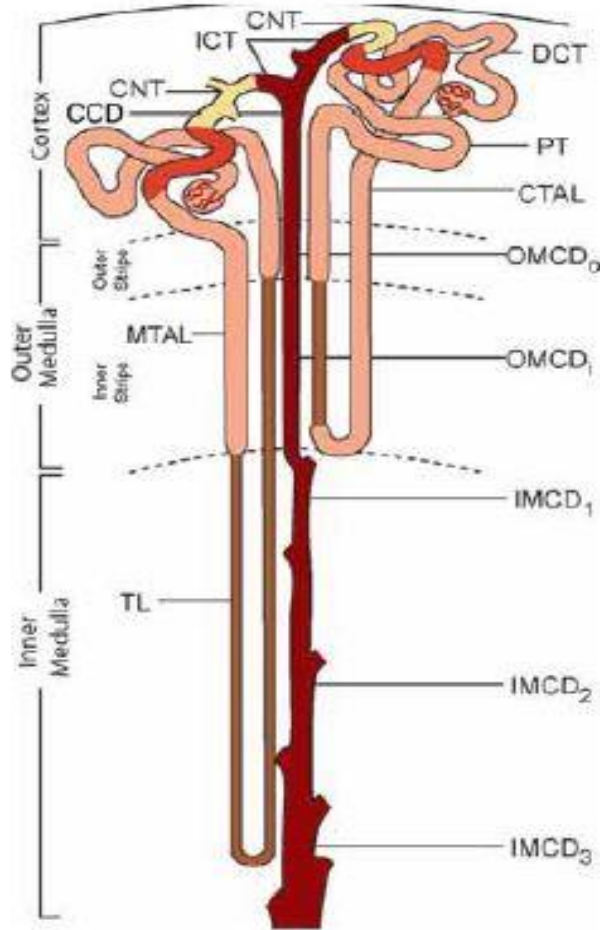
Böbreğin mikroskopik anatomisi

Böbreğin yapısal ve fonksiyonel birimi nefronudur. Nefron tümü metanefrik blastemden kaynaklanan renal korpüskül (glomerül ve Bowman kapsülü), proksimal tübül, henle kulpu ve distal tübülden oluşur. Böbrekteki toplam nefron sayısı, normal bireyler arasında farklılık gösterir. Bireyler arasında nefron sayısında 10 kat değişiklik bildirilmiş olmasına rağmen, normal aralık böbrek başına yaklaşık 600.000-1.200.000 nefronudur (1).

Korteks kortikal labirent ve medüller ışınlar olmak üzere iki bölgeye ayrılmıştır. Labirent, glomerüller, proksimal ve distal kıvrımlı tübüller, bağlantı tübülleri ve toplayıcı kanalların başlangıç kısmının yanı sıra interlobüler damarlar, arteriyoller, kılcal damarlar ve lenfatikler içerir. Labirentin esas bileşenleri proksimal tübüllerdir.

Normal kortekste, tübüller birbirine çok yakın bazal membranlarla sıkıca paketlenir. İnterstisyel alan çok azdır. Peritübüler kılcak pleksus ve çok az sayıda interstisyel fibroblast ve retikulum hücresi içerir. Medüller ışın, toplayıcı kanallardan ve medulladan aşağı ve yukarı doğru uzanan proksimal ve distal düz tübüllerden oluşur. Tek bir medüller ışının toplayıcı kanallarına boşalan nefronlar, böbreğin fonksiyonel birimi olan bir renal lobül içerir.

Medulla, bir dış şerit ve bir iç şeritten oluşan bir dış medulla ve iç medulla veya papillaya bölünmüştür. Dış şerit proksimal tübülün düz kısımlarını, Henle kulpunun kalın çıkan kolunu ve toplayıcı kanalları içerir. İç şerit, Henle kulpunun ve toplayıcı kanalların ince inen ve kalın çıkan kollarını içerir. İç medulla, Henle kulpunun ve Bellini'nin toplayıcı kanallarının ince inen ve çıkan kollarını içerir (4, 7) (Şekil 2.4).



(PT, proksimal tübül; TL, Henle kulpunun ince halkası; MTAL, medüller kalın çıkan kol; CTAL, kortikal kalın çıkan kol; DCT, distal kıvrımlı tübül; CNT, bağlantı tübülü; ICT, toplayıcı tübülün ilk kısmı; CCD, kortikal toplayıcı kanal; OMCD_o, dış medullanın dış şeridinde toplayıcı kanal; OMCD_i, dış medullanın iç şeridinde toplayıcı kanal; IMCD₁, iç medüller toplayıcı kanalının dış üçte birlik kısmı; IMCD₂, iç medüller toplayıcı kanalının orta üçte biri; IMCD₃, iç medullanın iç üçte biri toplayıcı kanalı)

Şekil 2.5. Nefron segmentlerini ve böbreğin bölgelerini gösteren şekil (1).

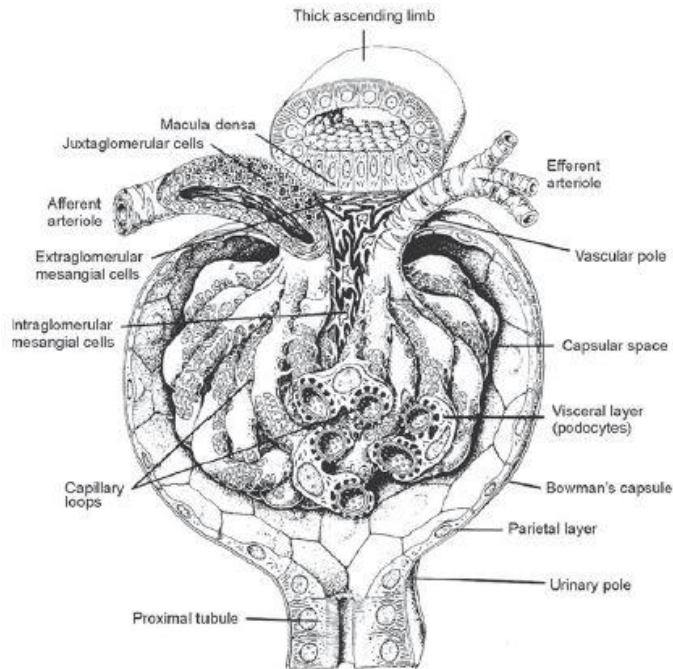
2.1.3. Histoloji

Renal korpüskül ve kanın süzülmesi

Her renal korpüskül çapı 200 µm'dir ve iki tabakalı epitelden oluşan bir kapsül olan Bowman kapsülü ile sarılı glomerülden oluşur. Kapsülün iç tabakası (viseral tabaka) glomerül kapillerlerini dışarıdan sarar. Dış tabaka renal korpüskülün dış taraftaki sınırını oluşturur ve Bowman kapsülünün pariyetal tabakası olarak adlandırılır. Bu iki tabaka arasında kapiller duvarlardan ve visceral tabakadan süzülen sıvının toplandığı idrar boşluğu bulunmaktadır. Böbrek korpüskülünde afferent arteriyollerin girdiği ve efferent arteriyollerin çıktığı bir damar kutbu ve proksimal tübüllerin başladığı bir idrar kutbu bulunur (8).

Bowman kapsülünün pariyetal tabakası ince bir retiküler lif tabakası ve bazal lamina ile desteklenen tek katlı yassı epitelden oluşur. İç tabakadaki hücrelerin gövdelerinden birincil uzantı şekillenir ve podosit adını alır. Her bir primer uzantı pedisel denen glomerülün kapillerlerini saran çok sayıda ikincil uzantı oluşturur (8).

Endotel hücreleri ve podosit ayaklarının yanı sıra glomerüler kapillerlerin duvarlarına tutunan mezengiyal hücreler vardır. Mezengiyal hücreler kasılma yeteneğine sahip hücrelerdir ve anjiyotensin reseptörleri içerirler (8).



Şekil 2.6. Glomerülün şematik üç boyutlu gösterimi (1)

Proksimal Kıvrımlı Tübüller

Renal korpskölün idrar kutbu, Bowman kapsölünün pariyetal yaprağının tek katlı yassı epiteli kübik ya da alçak prizmatik epitelle döşeli proksimal kıvrımlı tübüller ile devam eder. Proksimal kıvrımlı tübüllerin hücreleri çok sayıdaki uzamış mitokondriyumları nedeniyle asidofilik sitoplazmaya sahiptir (Şekil 2.6). Hücrenin tepesinde fırçamsı kenarı oluşturan yaklaşık 1 mm uzunluğunda, çok sayıda mikrovillus bulunur. Hücrelerin büyük olması nedeniyle her enine kesitte, üç- beş adet küre biçiminde çekirdek bulunur. Renal korpskölde oluşan süzöntü proksimal kıvrımlı tübüllere geçer. Proksimal kıvrımlı tübüller süzöntüdeki glikoz ve aminoasitlerin tümünü, suyun ve sodyum klorürün %85'ini ve ayrıca fosfat ve kalsiyumu geri emer (8).

Henle Kulpu

Bir kalın inen kol, bir ince inen kol, bir ince çıkan kol ve bir kalın çıkan koldan oluşan U şeklinde bir yapıdır. Nefronun bu bölümünün lümeni geniştir, duvar epitelinin çekirdekleri çok hafif şekilde lümene doğru çıkıntı yapan yassı epitel hücrelerinden oluşur (8).

Bütün nefronların yaklaşık 1/7'si kortikomeduller sınırın yakınında bulunur, bu yüzden jukstamedüller nefronlar adını alırlar. Diğer nefronlara ise kortikal nefronlar denir. Jukstamedüller nefronların henle kulpu çok uzundur, medullanın derinliklerine dek inerler ve hipertonic gradyanı sağlarlar. Hipertonic idrar üretiminin temeli burada oluşur, inen ince kısım suya geçirgen olmasına karşın çıkan bölümün tümü su geçirmez. Çıkan kalın kolda sodyum klorür aktif olarak tübülden dışarı atılır ve medüller hipertonsite gradyanı sağlanmış olur (8).

Distal Kıvrımlı Tübül

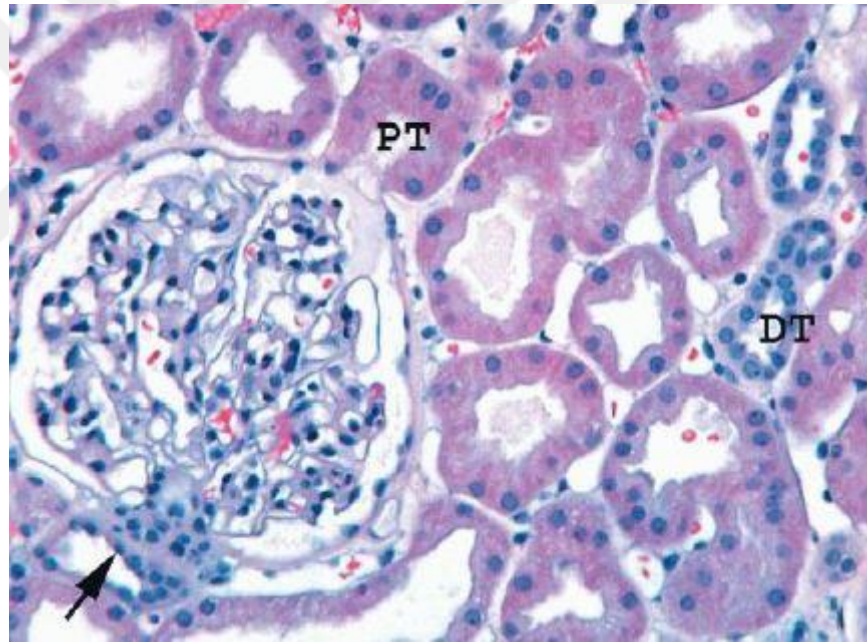
Bu tübül tek katlı kübik epitelle döşelidir. Distal kıvrımlı tübüller proksimal kıvrımlı tübüllerden fırçamsı kenarlarının ve apikal kanallarının olmaması ve hücrelerin daha küçük olması ile ayrılır (Şekil 2.7). Proksimal tübül hücrelerine göre daha düz ve daha küçük olduğu için histopatolojik kesitlerde proksimal tübüle göre daha fazla çekirdek görülür (8).

Distal kıvrımlı tübüller izledikleri yol boyunca kendi nefronlarına ait renal korpskölün damar kutbu ile temas halindedir. Bu yakın temas noktasında distal tübül afferent arteriyole benzer. Distal kıvrımlı tübül hücreleri bu jukstaglomerüler bölgede

genellikle prizmatik hale dönüşür ve çekirdekler bir araya toplanır. Çekirdeklerin yakın yerleşimi yüzünden daha koyu görünen distal tübül segmenti maküla densa olarak adlandırılır. Maküla densa hücreler klorür iyon içeriğine ve su hacmine duyarlıdır, renin salgısını başlatan sinyaller üretirler (8).

Toplayıcı Tübül ve Kanallar

Distal kıvrımlı tübüllerden geçen idrar, birbirlerine bağlanarak daha büyük, düz toplayıcı kanalları oluşturan toplayıcı tübüllere boşalır. Bu kanallar meduller piramidin ucuna yaklaştıkça genişler. Küçük toplayıcı tübüller kübik epitelle döşelidir, medullanın derinliklerine doğru indikçe prizmatik epitele dönüşürler. Medullada idrar yoğunlaştırmada en önemli rol toplayıcı kanallarındır. Toplayıcı kanalların epiteli arka hipofiz tarafından salgılanan arginin vazopressin ya da antidiüretik hormona duyarlıdır (8).



Makula densa (ok) ve bitişik ekstraglomerüler mezengiyal hücreler soldadır; proksimal tübülün (PT) ağzı sağdadır. Bowman kapsülünü döşeyen parietal epitel düzleşir ve idrar kutbunda kolumnar proksimal tübül epitele dönüşür. Çoğu tübül proksimaldir, ancak iki distal tübül (DT) mevcuttur (H&E, ×200) (4).

Şekil 2.7. İnsan korteksi histopatolojik görünümü.

2.2. Böbrek Tümörleri

İlk böbrek tümörü yaklaşık 200 yıl önce rapor edilmiştir. 1953'te, bir cerrahi patoloji ders kitabında yaklaşık sekiz böbrek tümörü tanımlanmıştır. Uzun yıllar boyunca sayısız araştırmacının katkıları ile Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) böbrek

neoplazmaları sınıflandırması, yaklaşık 50 iyi tanımlanmış ve ayırt edici böbrek tümörünün yanı sıra çeşitli ve metastatik tümörleri içerir (7).

2.2.1. İnsidans ve Mortalite

Renal pelvis ve üreter kanseri hariç, böbrek kanseri dünya çapında en yaygın yedinci malignitedir. 2012'de yeni tanı konulan tüm kanserlerin %3,3'ünü oluşturmaktadır (7). Küresel Kanser İnsidansı, Mortalitesi ve Prevalansı (GLOBOCAN) verilerine göre 2020 yılında dünya çapında 431.288 yeni vaka tespit edilmiş, 179.368 hasta böbrek tümörü sebebiyle ölmüştür. Türkiye'de ise 5.125 yeni vaka tespit edilmiş olup bunların 1.965'i ölümlle sonuçlanmıştır (9).

T.C. Sağlık Bakanlığı'nın 2017 yılında yayınlamış olduğu kanser istatistikleri raporuna göre tüm yaş gruplarında erkeklerde böbrek kanseri görülme oranı %2,9 ile tüm kanserler içinde 6. sırada yer almaktadır (Şekil 2.7) (10).

Tahmini yeni vakaların %34'ü Avrupa'da ve %19'u Kuzey Amerika'da olmak üzere, yeni vakaların yaklaşık %70'i yüksek ve çok yüksek sosyoekonomik gelişmişlik düzeyine sahip ülkelerde meydana gelmiştir. RCC erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür (yaklaşık 1,5:1) ve çocuklarda oldukça nadir izlenir. En yüksek insidans oranları Çek Cumhuriyeti'nde bulunurken kuzey ve doğu Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya'da da yüksek oranda bulunur. Düşük oranların Afrika'nın çoğunda ve Doğu Asya'da olduğu tahmin ediliyor.



Şekil 2.8. Tüm Yaş Gruplarındaki Erkeklerde En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Yüzde Dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2017) (10)

2.2.2. Etyoloji

Fazla kilo, özellikle obez olmak hem kadınlarda hem de erkeklerde böbrek kanseri için risk faktörüdür (11). Böbrek kanseri için diğer risk faktörleri sigara, hipertansiyon, böbrek nakli, ailede hastalık öyküsü ve belirli toksinlere maruz kalmadır (12).

Kanser için potansiyel bir risk faktörü olarak diyabetin önemi klinik ve otopsi çalışmalarında gösterilmiştir (13).

Renal Hücre Neoplazisinin Kalıtsal Yönleri

Kalıtsal böbrek tümörleri, her biri bir kalıtsal böbrek tümörü sendromuna özgü olan germline mutasyonlarının geçişi yoluyla kalıtılan neoplazmlardır. Bilateral ve multifokal olması ile erken başlangıç yaşı kalıtsal böbrek tümörlerinin tipik özellikleridir. İyi karakterize edilmiş örnekler aşağıdaki durumları içerir:

- Von Hippel-Lindau (VHL) sendromunda ve konstitüsyonel kromozom 3 translokasyon sendromunda berrak hücreli renal hücreli karsinom (ccRCC);
- Kalıtsal PRCC sendromu, herediter leiomyomatozis ve renal hücreli karsinom (HLRCC) sendromu (PRCC), ailesel papiller tiroid karsinomu sendromu, hipertiroidizm-çene tümörü sendromu ve Birt-Hogg-Dube sendromunda papiller renal hücreli karsinom (PRCC);
- Hipertiroidizm-çene tümörü sendromunda onkositoma;
- Birt-Hogg-Dube sendromunda kromofob RCC ve hibrit kromofob onkositoma (7).

2022 yılında yayınlanan DSÖ kitabında belirgin leiomyomatöz stromaya sahip RCC'ler sıklıkla TSC1, TSC2, MTOR ve/veya ELOC'de (TCEB1) mutasyonlar barındırır. Bu tümörlerin, ccRCC'ler ve berrak hücreli papiller tümörler ile önemli ölçüde morfolojik örtüşmeye sahip olduğu görülmüştür. ELOC (TCEB1) ile mutasyona uğramış RCC'lerin, orijinal olarak "RCC benzeri böbrek anjiyomiyoadenomatöz tümörü" veya "tüberoskleroz ile ilişkili papiller tip RCC" olarak tanımlanan, kalıtsal tüberoskleroz ile ilişkili RCC'lerin bir alt kümesiyle aynı ve ayırt edilemez olduğu hipotezini destekler. ELOC (TCEB1) mutasyonuna uğramış RCC'nin net bir teşhisi ancak karmaşık moleküler analizlerle yapılabilir. Bu nedenle DSÖ bu antiteyi moleküler olarak tanımlanmış RCC'ler kategorisine almıştır. Buna karşılık, hemen hemen tüm

metanefrik adenomlar, adenofibromlar ve metanefrik stromal tümörlerde BRAF p.V600E mutasyonları tanımlansa da, yine de bu tümörler morfolojik olarak tanımlanmış neoplazmalar olarak kabul edilirler (14).

2.2.3. Renal Hücreli Karsinomun Histolojik Sınıflandırması

Birleşik Devletler Silahlı Kuvvetleri Patoloji Enstitüsü'nde (AFIP) 1975'te yayınlanan Tümör Patolojisi Atlası, böbrek tümörleri fasikülünde, renal hücreli karsinomu iki ana kategoride sınıflandırdı: berrak hücreli karsinom ve granüler hücreli karsinom. Bu fasikülün yayınlanmasından bu yana geçen elli yıla yakın süreçte renal hücreli karsinom morfolojik alt tiplerine yönelik büyük bir ilgi oldu. Bu süreçte, her biri farklı karakteristik histolojik özelliklere ve benzersiz immünoprofillere farklı moleküler değişikliklere sahip çok sayıda morfolojik alt tip tanımlanmıştır. Böbrek tümörlerinin histolojik alt tiplendirmesinin prognostik öneme sahip olduğu yapılan çok merkezli ve çok sayıda araştırmalarla netleşmiştir. RCC'nin alt tiplerini belirlemek hastalarda tedaviye yön vermek için öngörücü öneme sahiptir.

RCC'nin histolojik sınıflandırması geliştikçe, alt tiplerini belirtmek için kullanılan terminoloji, tümörleri tanımlayıcı veya karakteristik özelliklerine atıfta bulunarak yapılmıştır. Alt tipler, baskın sitoplazmik özellikler ve boyama özellikleri (örn. berrak hücreli ve kromofob RCC'ler), mimari özellikler (örn. papiller renal hücreli tümör), hücre tipi (örn. renal onkositoma) ve bu özelliklerin kombinasyonları (örn. berrak hücreli papiller renal hücreli tümör) kullanılarak isimlendirilmiştir. Böbrek tümörlerini isimlendirmeye yönelik diğer yaklaşımlar, metanefroz (örneğin metanefrik adenom), tümörlerin anatomik yerleşimi (örneğin, toplayıcı kanal ve renal medüller karsinomlar) gibi embriyolojik yapılarla benzerliklerine ve arka plandaki böbrek hastalığı ile bir korelasyona (örneğin edinilmiş kistik hastalıkla ilişkili RCC) dayanmaktadır. RCC alt tipleri için barındırdıkları moleküler değişikliklere atıfta bulunan isimler de kullanılmıştır (11, 14).

2022 yılı DSÖ sınıflamasında böbrek tümörleri ana hatlarıyla:

- Renal hücreli tümörler
- Metanefrik tümörler
- Mikst epitelyal ve stromal tümörler
- Renal mezenkimal tümörler

- Böbreğin embriyonal neoplazileri
- Çeşitli tümörler (Germ hücreli tümörler)

olarak sınıflandırılmıştır.

Nöroendokrin tümörler tüm genitoüriner tümörler için tek ve ortak bir bölüm olarak belirtilmiştir.

2022 yılında yayınlanan DSÖ sınıflamasında birtakım değişiklikler yapılmıştır fakat RCC'ler için tamamen moleküler bir sınıflanmaya geçme zamanının henüz gelmediği belirtilmiştir. DSÖ'nun üriner ve erkek genital tümörleri sınıflandırmasının önceki baskılarının aksine, bu baskıda yayın kurulu, RCC'yi morfolojik ve moleküler olarak tanımlanmış RCC'lere ayırmaya karar vermiştir. Moleküler olarak tanımlanmış RCC'ler arasında TFE3 re-arranjmanlı RCC'ler, ALK re-arranjmanlı RCC'ler, TFEB re-arranjmanlı RCC, ELOC (önceden TCEB1) mutasyonuna uğramış RCC, SMARCB1 (INI1) eksik RCC ve diğerleri bulunur (14). Onkositik tümörler grubuna diğer onkositik tümörler grubu eklenmiş, onkositom veya kromofob RCC olarak sınıflandırılmayan, arada kalmış tümörler bu gruba alınmıştır.

Berrak hücreli papiller renal hücreli karsinomun terminolojisi iyi davranış göstermesinden ötürü berrak hücreli papiller renal hücreli tümör olarak değiştirilmiştir. Papiller renal hücreli karsinomda tip1 ve tip2 kavramları ortadan kaldırılmıştır. Eozinofilik solid ve kistik renal hücreli karsinom yeni tanımlanmış bir gruptur. Meduller renal karsinom, SMARCB1 (INI1) eksikliği olan renal meduller karsinom olarak değiştirilmiştir. Fumarat hidrataz eksik RCC eski DSÖ'de herediter leiomyomatozis ve RCC sendromu ilişkili RCC'leri kapsar. TFE3 re-arranjmanlı renal hücreli karsinom ve TFEB re-arranjmanlı renal hücreli karsinom MiT ailesi traslokasyon karsinomları içerisinde yer alır. ALK re-arranjmanlı renal hücreli karsinom ve ELOC mutasyonu içeren renal hücreli karsinom sınıflamaya yeni eklenen tümörlerdir (14) (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. 2022 DSÖ Renal hücreli tümörler sınıflaması (14)

Renal hücreli tümörler
Berrak hücreli renal hücreli tümörler
Berrak hücreli renal hücreli karsinom
Düşük malign potansiyele sahip multiloküler kistik renal neoplazm
Papiller renal hücreli tümörler
Renal papiller adenom
Papiller renal hücreli karsinom
Onkositik kromofob renal tümörler
Böbreğin onkositomu
Kromofob renal hücreli karsinom
Böbreğin diğer onkositik tümörleri
Toplayıcı kanal tümörleri
Toplayıcı duktus karsinomu
Diğer renal tümörler
Berrak hücreli papiller renal hücreli tümörler
Müsinöz tübüler ve içsi hücreli karsinom
Tubulokistik renal hücreli karsinom
Edinilmiş kistik hastalıkla ilişkili böbrek hücre karsinomu
Eozinofilik solid ve kistik renal hücreli karsinom
Renal hücreli karsinom, sınıflandırılmamış
Moleküler tanımlanmış renal hücreli karsinomlar
TFE3 re-arranjmanlı renal hücreli karsinom
TFEB re-arranjmanlı renal hücreli karsinom
ELOC mutasyonu içeren renal hücreli karsinom
Fumarat hidrataz eksikliği olan renal hücreli karsinom
Süksinat dehidrogenaz eksikliği olan renal hücreli karsinom
SMARCB1 eksikliği olan renal meduller karsinom
ALK re-arranjmanlı renal hücreli karsinom
Metanefrik Tümörler
Metanefrik adenom
Metanefrik adenofibrom
Metanefrik stromal tümör
Mikst epitelyal ve stromal renal tümörler
Böbreğin mikst epitelyal ve stromal tümörü

2.2.4. Renal Hücreli Karsinomun Sitolojik Derecelendirmesi

Sitolojik derecelendirmenin RCC'nin biyolojik davranışını tahmin etmede önemli olduğu uzun süredir kabul gören bir durumdur (7). Renal hücre neoplazisi için çeşitli derecelendirme sistemleri önerilmiştir; ancak bunlar, yakın zamanda tarif edilen renal

hücreli karsinomun birçok morfortipi için doğrulanmamıştır (11). Nükleer ve nükleoler özellikleri değerlendiren Fuhrman derecelendirme sistemi, uzun zamandır uluslararası kullanımdadır. Kanıtlanmış prognostik faydası olmasına rağmen, geçerliliği ve tekrarlanabilirliği ile ilgili sorunlar vardır (11, 15). 2012 ISUP (Uluslar Arası Ürolojik Patoloji Topluluğu) Vancouver konferansının ardından yeni bir DSÖ/ISUP derecelendirme (grade) sistemi tanıtıldı ve DSÖ tarafından kullanılması tavsiye ediliyor (15) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. DSÖ / ISUP derecelendirme sistemi (15)

Grade 1	Nükleol yok ya da belirsiz ve 400x büyütmede bazofiliktir
Grade 2	Nükleol belirgin ve 400x büyütmede eozinofiliktir, 100x büyütmede belirgin değil ancak görülebilir
Grade 3	Nükleol 100x büyütmede belirgin ve eozinofiliktir
Grade 4	Belirgin nükleer pleomorfizm, multinükleer dev hücreler ve/veya sarkomatoid ve / veya rabdoid diferansiyasyon

Bu sistem, derece 1–3'ü belirlemek için nükleol belirginlik derecesi ve derece 4'ü tanımlayan oldukça atipik pleomorfik hücrelerin ve/veya sarkomatoid veya rabdoid morfolojinin mevcudiyeti ile dört dereceli bir sistemdir. Grade'leme en baskın grade'e göre değil en yüksek grade'e göre yapılır (15).

DSÖ/ISUP derecelendirme sistemi sadece berrak hücreli ve papiller RCC'ler için doğrulanmıştır, çünkü prognostik faydası diğer tümör tipleri için doğrulanmamıştır (15-17). Diğer RCC alt tipleri için derecelendirme doğrulanmamış olsa da, önerilen yaklaşım, DSÖ/ISUP derecelendirme kriterlerine dayalı açıklamalarla birlikte tüm RCC'ler için derecelendirmeyi raporlamaktır (14).

2.2.5 Renal Hücreli Karsinom Evrelemesi ve Derecelendirmesi

Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) tümör-lenf nodu-metastaz (TNM) evrelemesi, kanser için en yaygın kullanılan ve evrensel olarak kabul edilen evreleme sistemidir (18) (Tablo 2.4). RCC için ilk TNM sınıflaması 1974'te önerilmiş ve sonraki yıllarda birkaç kez revize edilmiştir (19). Aslında literatürden elde edilen kanıtlar, sınıflama sistemi klinik olarak uygulandığında önceki her TNM baskısının kansere özgü sağkalımı tahmin etmek için yeterli doğruluğa sahip olmadığı yönündedir (20). Ayrıca, son birkaç yılda, mikrovasküler invazyon, tümör nekrozu ve performans durumunu

sınıflamaya dahil eden, RCC için yeni klinik ve patolojik prognostik parametreler tanımlanmıştır. Bu nedenle, son zamanlarda bazı yazarlar UCLA Entegre Evreleme Sistemi, Mayo Clinic'in SSIGN skoru ve Karakiewick ve Sorbellini'nin monogramları gibi RCC için yeni entegre evreleme modelleri önerdiler. Bu modeller TNM sınıflandırması yanısıra diğer prognostik değişkenleri içerir ve tek başına TNM sınıflandırmasına kıyasla kansere özgü sağkalımı tahmin etmede daha doğru oldukları kanıtlanmıştır (19, 21-23).

Tablo 2.4. AJCC 2017 Böbrek tümörlerinde TNM sınıflaması (7)

TNM Sınıflandırması			
T- Primer Tümör			
TX: Primer tümör değerlendirilemez			
T0: Primer tümör kanıtı yok			
T1: Böbrekte sınırlı, ≤ 7 cm			
T1a: Tümör ≤ 4 cm			
T1b: Tümör > 4 cm, ≤ 7 cm			
T2: Böbrekte sınırlı, > 7 cm			
T2a: Tümör ≤ 10 cm			
T2b: Tümör > 10 cm			
T3: Tümör majör venlere veya perinefrik dokulara uzanır ancak ipsilateral adrenal beze uzanmaz ve Gerota fasyasını aşmamıştır			
T3a: Renal vene veya onun segmental dallarına uzanım mevcut veya pelvikalsiyal sisteme invazyon mevcut veya tümör perirenal ve/veya renal sinüs yağ dokusunu invaze eder			
T3b: Diyaframın altındaki vena kava içine uzanım mevcut			
T3c: Diyaframın üzerinde vena kava içine büyük ölçüde uzanım veya vena kava duvarına invazyon mevcut			
T4: Tümör gerota fasyasını aşmıştır (ipsilateral adrenal beze uzanım dahil)			
N- Bölgesel Lenf Nodu			
NX: Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemez			
N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok			
N1: Bölgesel lenf nodu metastazı var			
M- Uzak Metastaz			
M0: Uzak metastaz yok			
M1: Uzak metastaz mevcut			
Evreleme			
Evre I:	T1	N0	M0
Evre II:	T2	N0	M0
Evre III:	T1-2	N1	M0
	T3	Herhangi N	M0
Evre IV:	T4	Herhangi N	M0
	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.3. Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinom

2.3.1. Genel özellikler

Berrak hücreli renal hücreli karsinom, berrak veya eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşan morfolojik olarak heterojen özellikler gösteren malign bir neoplazi grubudur. Bu neoplaziler, tipik damar formasyonuna ve VHL'nin inaktivasyonu ve hipoksi ile indüklenebilir faktörün upregülasyonu ile karakteristik bir moleküler karakterizasyona sahiptir. Eskiden renal berrak hücreli adenokarsinom, Grawitz tümörü, hipernefroma olarak adlandırılmışlardır. CcRCC, tüm böbrek kanserlerinin %65-70'ini oluşturur (11). CcRCC'nin proksimal tübüler epitel hücrelerinden kaynaklandığı sıklıkla belirtilmesine rağmen, diğer nefron segmentlerine ait epitel hücre tiplerinin de bazı ccRCC vakalarına yol açabileceğine dair kanıtlar vardır (24, 25). Çocuklar da dahil olmak üzere her yaşta insanı etkileyebilmesine rağmen, bu tümörlerin çoğu, 40 yaşın üzerindeki hastalarda görülür ve erkeklerde kadınlara göre 1.5 kat daha sıktır (26).

2.3.2. Makroskopik Bulgular

Makroskopik olarak, ccRCC birkaç milimetre ile çok büyük boyutlar arasında değişir ve birkaç kilogram ağırlığa kadar ulaşabilir; ortalama boyut yaklaşık 7 cm'dir. Genellikle unilateral ve unisentriktir; bilateralite veya multifokalite, kalıtsal ccRCC'nin özellikleridir. Çoğunlukla kortikal yüzeyden çıkıntı yapan kitle oluşturur. Kesit yüzeyi, tümör hücreleri içindeki kolesterol, fosfolipidler ve nötral lipidlerin bolluğu nedeniyle kısmen karakteristik parlak altın sarısı bir renge sahip olmakla birlikte tipik olarak gri beyaz fibrozis ve yeni veya eski kanama alanları ile alacalı görünümündedir. Genellikle genişleyen, itici büyüme modeline sahiptir ve komşu normal böbrekten kalınlığı değişken bir fibröz psödokapsül ile iyi bir şekilde ayrılmıştır; bazı durumlarda komşu renal parankimi infiltre ediyormuş gibi görünebilir. Kistik değişiklik ve kalsifikasyon alanları, özellikle nekroz alanlarında yaygın olarak bulunur (7).

2.3.3. Klinik Özellikler

Böbrek kanserlerinin yaklaşık %60-80'i tesadüfen ultrason, BT veya MRI'da saptanır. Böbrek kanserinin en sık görülen semptomları hematüri ve yan ağrısıdır. Kilo kaybı ve ateş geç evrelerde ortaya çıkar. CcRCC'ler en yaygın olarak renal sinüs damarları, renal venler ve vena kava yoluyla hematogen olarak metastaz yapar ve pulmoner metastaz gelişimine yol açar. Renal venlerden lomber venlere uzanım, üstte

düşük basınçlı paravertebral venöz pleksusa ve altta pelvik venlere yayılmasını kolaylaştırır, merkezi sinir sistemi, baş ve boyun, merkezi ve periferik kemik metastazını kolaylaştırır. Lenfatik metastazlar hiler, aortik ve kaval lenf nodlarını tutabilir ve torasik duktusa girebilir veya direkt olarak torasik nodları tutabilir. Bu çeşitli metastatik yollar, ccRCC'nin olağandışı bölgelere metastaz yapmasını sağlar (11).

2.3.4. Histopatoloji

CcRCC'nin mikroskopik görünümü, çeşitli yapısal paternleri içerir; tümör hücreleri, ince duvarlı kan damarlarıyla ayrılmış, kompakt yuvalar, alveolar, asiner, solid tabaka benzeri ve kistik paternlerin değişen oranlarda kombinasyonundan oluşur. Kistik alanlar ekstrasöz eritrositler veya eozinofilik sıvı ile doldurulur (26).

Klasik ccRCC hücresi, sitoplazmik lipidlerin ve glikojenin kaybı nedeniyle farklı hücre membranına ve mikroskopik olarak berrak sitoplazmaya sahiptir. Bazı ccRCC vakalarında, granüler eozinofilik sitoplazmalı hücreler izlenebilir; bu tür hücreler daha çok yüksek dereceli kanserde veya kanama, nekroz alanlarına yakın yerlerde görülür (7).

CcRCC'de heterotopik kemik oluşumu, hücre içi ve hücre dışı hiyalin globüller, bazofilik sitoplazmik inklüzyonlar, multinükleer dev hücreler, sarkoidoz benzeri granülomlar, miyosferüloz dahil olmak üzere çok sayıda yaygın olmayan histolojik değişiklik tanımlanmıştır. Bu nadir bulguların önemi bilinmemektedir (7).

Dereceye bağlı olarak, nükleoller belirsiz, küçük veya büyük ve belirgin olabilir. Bizar nükleuslar veya nükleol içermeyen çok büyük çekirdekler bazen mevcut olabilir. Sarkomatoid ve rabdoid değişikliklerin her biri, tümörlerin yaklaşık %5'inde meydana gelir ve daha kötü prognoz ile ilişkili olduğuna dair çalışmalar vardır. Çoğu ccRCC'ler çok az inflamatuvar yanıt ile ilişkilidir; nadiren yoğun bir lenfositik veya nötrofilik infiltrat mevcuttur (11).

2.3.5. İmmünofenotip

48 kDa'lık bir transkripsiyon faktörü olan PAX8, hemen hemen tüm ccRCC'lerde ve ayrıca diğer renal epitelyal neoplazmlarda nükleer olarak boyanır.

PAX2, PAX8'e benzer boyanma gösterir, ancak PAX8 daha sensitiftir.

Karbonik anhidraz IX, karbondioksit taşınmasında ve pH regülasyonunda rol oynar. Yüksek dereceli tümörler azalmış ekspresyon sergileyebilmesine rağmen, ccRCC'lerin %75-100'ünde yaygın bir membranöz dağılımda karakteristik olarak yoğun boyanma görülür. CcRCC'nin karbonik anhidraz IX boyama modeli, berrak hücreli papiller renal hücreli tümörde gözlenen bazolateral pozitiflikten farklı olarak membranözdür (11) (Tablo 2.5).

CcRCC, sitokeratin AE1 / AE3, CAM5.2 ve EMA gibi epitelyal belirteçleri ekspresse eder.

CK7 ekspresyonu nadirdir ve yüksek dereceli tümörlerde ve kistik bileşenleri olan tümörlerde izole hücreler veya hücre kümeleriyle sınırlıdır. Kromofob RCC yaygın CK7 pozitifliği gösterir ve ccRCC'yi kromofob RCC'den ayırt etmek için kullanılır.

Proksimal tübül belirteci olan CD10, ccRCC'de membranöz boyanma gösterir. Vimentin ccRCC'de pozitifdir, yüksek dereceli alanlarda daha yoğun boyanır (11).

CK20, müsin 1 (MUC1), parvalbumin, a-metilaçil-koenzim A rasemaz (AMACR), böbreğe spesifik kaderin ve CD117 ile immün boyanmalar çoğu durumda negatiftir (7).

Tablo 2.5. RCC alt tiplerinde immünohistokimyasal boyanma farklılıkları (11)

	PAX8	CAIX	CK7	AMACR	c-kit	Diğer
Berrak hücreli RCC	+	+	-	-	-	
Papiller RCC	+	-	+/-	+	-	
Kromofob RCC	+	-	+	-	+	Hale'in koloidal demiri+, Vimentin-
Onkositom	+	-	-/fokal +	-	+	Vimentin-
Berrak hücreli papiller renal hücreli tümör	+	+	+	-	-	

2.4. Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinomun Genetik Profili

RCC'nin en yaygın türü olan ccRCC, hem sporadik hem de ailesel formlarda hipoksi ile indüklenebilir faktörlerin (HIF1A ve HIF-2a, ayrıca HIF1A ve EPAS1 olarak da bilinir) stabilizasyonuna yol açan VHL gen mutasyonları ile yakından

ilişkilidir (27). ccRCC tümörlerinin kapsamlı genetik profilinin tanımlanması, yalnızca tümörögenез mekanizmaları hakkında fikir vermekle kalmaz, aynı zamanda nüks veya metastaz gösteren hastaların tanımlanması ve potansiyel prognostik biyobelirteçler için fayda sağlar (28).

CcRCC, intra-tümöral heterojenitesi ile iyi bilinir ve morfolojik, immünohistokimyasal ve genetik farklılıklar primer tümör ile metastazları (inter-tümöral heterojenite) arasında da mevcuttur. Yaygınlıklarına göre somatik mutasyonlar; her yerde bulunan, paylaşılan ve özel mutasyonlar olarak sınıflandırılır. Her tümör hücresinde her yerde bulunan mutasyonlar mevcuttur. Paylaşılan ve özel mutasyonlar, daha küçük alt klonlarda bulunur. Önemlerine göre mutasyonlar, sürücüler (driver) ve yolcular (passenger) olarak sınıflandırılır. Sürücü mutasyonlar, tümörün başlaması ve ilerlemesinde rol oynayanları içerir. Her yerde bulunan mutasyonlar mutlaka sürücü mutasyonları değildir. Aslında, normal DNA replikasyonu süreci sırasında edinilen ve sonuçta ilk tümör klonuyla sonuçlanan seçilmemiş mutasyonlar, her yerde bulunan yolcuları temsil eder. Yalnızca bir mutasyon alt kümesi (muhtemelen 10'dan az protein kodlayan gen mutasyonu) itici güçtür. Ayrıca, paylaşılan ve özel mutasyonlar arasında sürücü mutasyonları bulunabilir (29). Tümör oluşumu sürecinde erken edinilen mutasyonlar her yerde bulunurken, çok geç aşamalarda edinilenler özeldir ve aralarında paylaşılan mutasyonlar vardır. VHL ve PBRM1 mutasyonları erken kazanılabilirken, BAP-1 ve SETD-2 mutasyonları daha sonra ortaya çıkabilir. PBRM1 ve BAP1 mutasyonlarının büyük ölçüde özel olduğu ve bu mutasyonlara sahip tümörlerin farklı biyoloji sergilediği ve belirgin şekilde farklı genel sağkalım ile ilişkili olduğu bulgusu, sporadik ccRCC'nin ilk moleküler genetik sınıflandırmasının temelini oluşturur (30).

Büyük ölçüde paralel sekanslama teknolojilerini kullanan son çalışmalar, birkaç yeni sürücü genini içeriyor. VHL wild-tip tümörlerde, VHL'ye bağlanan ve işlevi için gerekli olan bir protein olan Elongin C'yi kodlayan TCEB1'de mutasyonlar keşfedildi (29).

Büyük ölçekli genomik dizileme çalışmaları, 3p lokusunun en az dört ek ccRCC tümör baskılayıcı gen barındırdığını göstermiştir: Histon 3 lisin demetilaz genleri KDM6A (UTX olarak da adlandırılır) ve KDM5C (JARID1C olarak da adlandırılır), histon 3 lisin metiltransferaz geni SETD2 ve SWI/SNF kromatin yeniden modelleme kompleksi geni PBRM1. CcRCC'ler ayrıca kromatin remodellinginde rol oynayan BAP1 geninde fonksiyon kaybı mutasyonlarını barındırır (11). PBRM1, SETD2 ve

BAP1, VHL'nin bulunduğu 3p25 lokusunun yakınında, 3p21 lokusunda yakın bir yerde bulunur. Bu nedenle, ccRCC'lerin %90'ından fazlasında görülen karakteristik tek kopya 3p kaybı fonksiyonel olarak bağlantılı olabilecek dört tümör baskılayıcıyı aynı anda bozar (31). Ayrıca mTORC1 yolu, ccRCC'lerin yaklaşık %20'sinde MTOR, TSC1, PIK3CA ve PTEN'deki mutasyonlar tarafından deregüle edilir. TSC1'deki ve muhtemelen diğer genlerdeki mutasyonlar, mTORC1 inhibitörlerine duyarlılığı öngörebilir. Bu keşifler, ccRCC gelişimine dair öngörü sağlar ve hastalığın ilk moleküler genetik sınıflandırmasının temelini oluşturarak alt tipe özgü tedavilerin yolunu açar (29).

Intratümöral heterojenite, tümörden alınan tek biyopsi örneklerinden tanımlanan genomik değişikliklerin hafife alınmasına yol açabilir ve kişiselleştirilmiş ilaç ve biyobelirteç geliştirmede büyük zorluklar ortaya çıkarabilir (32).

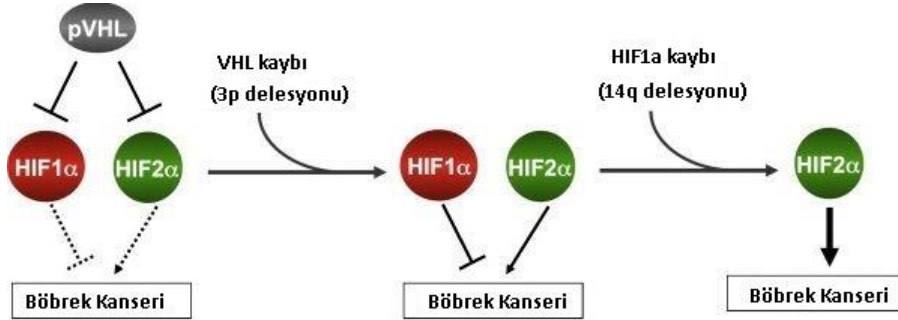
2.4.1. Von Hippel–Lindau Tümör Süpressör Geni

En sık görülen ailesel renal karsinom sendromu, otozomal dominant VHL sendromudur. VHL hastalığı, merkezi sinir sistemi ve retina kapiller hemanjiyoblastomları, feokromositoma, pankreas ve iç kulak tümörlerinin gelişimi ile karakterizedir. Tipik böbrek belirtileri böbrek kistleri ve ccRCC olup VHL hastalarında başka RCC tipleri gelişmez. VHL sendromlu hastalardan alınan makroskopik olarak normal böbrek dokusunun histopatolojik incelemesinde, ccRCC'nin öncü lezyonları gibi görünen genellikle binlerce küçük berrak hücreli tümör ve kist odakları olduğu gösterilmiştir (25).

VHL, iki vuruşlu bir tümör baskılayıcı genidir ve tipik olarak, bir alel, bir intragenik mutasyon yoluyla etkisiz hale getirilir ve ikincisi, büyük delesyon işleminin bir parçası olarak silinir. VHL geni, kromozom 3p25.3 üzerindedir ve bu bölgedeki, genellikle kromozom 3'ün tüm kısa kolunu içeren delesyonlar, ccRCC'nin yaklaşık %90'ında gözlenir. Bazen bir VHL mutasyonu 3p delesyonu olmadan bulunur. Bununla birlikte, kalan kromozomal bölgenin kopyalanmasının eşlik ettiği ve kopya nötr heterozigosite kaybı (LOH) ile sonuçlanan bir silme meydana gelmiş olabilir.

VHL proteini, Elongin B, Elongin C, Cul2 ve Rbx1 ile bir E3 ubiquitin ligazı olarak işlev gören, en belirgin şekilde HIF (hipoksi ile indüklenebilir faktör) transkripsiyon faktörlerinin α alt birimlerine karşı bir kompleks oluşturur (29). Düşük oksijen koşullarında (veya kusurlu pVHL'li hücrelerde) HIFa, pVHL tarafından

tanınmaz, HIF β ile dimerize olur ve birçoğunun düşük oksijen ortamına adaptasyonu desteklediğine inanılan 100-200 geni transkripsiyonel olarak aktive eder (Şekil 2.9) (33). Mutasyon veya DNA metilasyonu nedeniyle VHL'nin inaktivasyonu, ccRCC'de HIF- β ile dimerize olan ve çekirdeğe yer değiştiren transkripsiyon faktörü HIF-a'nın birikmesine yol açan erken bir olaydır. Ortaya çıkan HIF- α -HIF- β kaynaklı aşağı akış genlerinin yukarı regülasyonu, hücre çoğalmasını, glikoz alımını, glikoliz ve anjiyogenezi teşvik eder (34). CcRCC, anjiyogenezi düzenleyen HIFa hedeflerinin kontrolsüz aktivasyonu nedeniyle oldukça vaskülerdir. Böylece, anti-VEGF/VEGFR ajanları, metastatik ccRCC için etkili, birinci basamak tedavidir (35). VHL'deki birçok mutasyon protein ekspresyonunu bozar, ancak yanlış anlamlı mutasyonlar genellikle VHL ve Elongin C arasındaki arayüzde kümelenir. İlginç bir şekilde, Elongin C geni (TCEB1 olarak adlandırılır) ccRCC'lerin %0.5-5'inde mutasyona uğrar (29).



pVHL kaybı, berrak hücreli karsinogenez üzerinde zıt etkileri olan hem HIF1a hem de HIF2a'nın birikmesine yol açar. HIF1 α 'yı aşağı regüle etmek için seçim baskısına yol açar.

Şekil 2.9. Berrak Hücreli Karsinomda pVHL, HIF1 α ve HIF2 α 'nın Rolü (33)

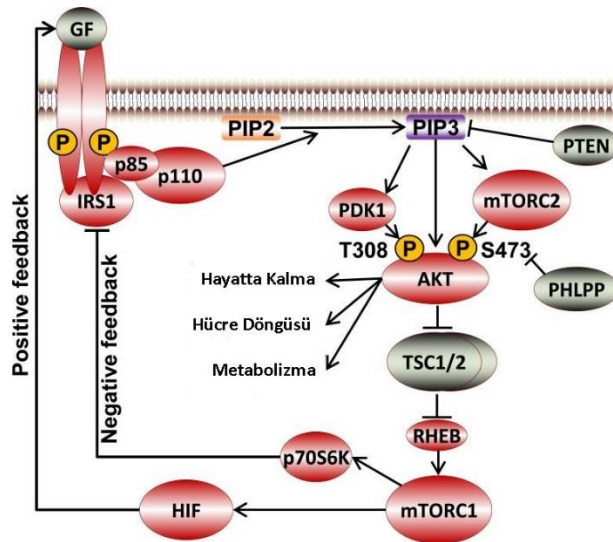
Mevcut kanıtlar, ccRCC gelişiminde VHL'nin rolünün, yalnızca diğer mutasyonların varlığıyla ortaya çıktığını, dolayısıyla pVHL'nin fonksiyonel inaktivasyonunun böbrek kanseri ilerlemesi için gerekli ancak yeterli olmadığını göstermektedir (36).

2.4.2. PTEN Geni ve PI3K-AKT-mTOR Yolu

PI3K/Akt yolu, hücrel stres sırasında hayatta kalmanın kilit noktasıdır. Tümörler, doğası gereği stresli bir ortamda var olduklarından (sınırlı besin ve oksijen kaynağı ve düşük pH), bu yolun kanserdeki rolü çok önemli görünmektedir. PI3K/Akt/mTOR yolunun aktivasyonu, hücre büyümesi ve hayatta kalma kontrolünün derin bir şekilde bozulmasına neden olur, bu da sonuçta rekabetçi bir büyüme avantajına, metastaz olasılığının artışı, anjiyogenez ve tedavi direncine yol açar. Bu

nedenle, bu yol, antikanser tedavi ajanlarının gelişimi için en cazip hedeflerden biri olarak dikkate alınmıştır (37).

PI3K, plazma zarındaki fosfatidilinositol (PtdIns) lipidlerinin inositol halkasının 3-hidroksil grubunu fosforile eden bir lipid kinaz ailesidir. PI3K, farklı yapılarına ve lipid substrat tercihlerine göre üç sınıfa (sınıf I, II ve III) ayrılır. Sınıf I PI3K, kanserde önemli bir rol oynadığı için en çok çalışılan ve en iyi anlaşılan gruptur. Sınıf I PI3K'ler, bir düzenleyici alt birim (p85) ve 110 kDa'lık bir katalitik alt birimin (p110) heterodimerleridir. Farklı genlerden üretilen dört p110 izoformu (p110 α , p110 β , p110 γ ve p110 δ), alternatif başlangıç kodonları ve farklı genlerin bir kombinasyonu tarafından üretilen yedi düzenleyici alt birim (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ , p50 α , p101 ve p87) vardır. Düzenleyici alt birimler, PI3K protein heterodimerlerini stabilize eden, bazal koşullar altında kinaz aktivitesini inhibe eden ve PI3K'yı aktivasyon için yukarı akış düzenleyicilere yönlendiren p110 katalitik alt birimlerine bağlanır (38).



Şekil 2.10. PI3K/Akt yolu (38)

PI3K aktivasyonu, RAS mutasyonu, fosfatase ve tensin homoloğu (PTEN) kaybı yoluyla veya epidermal büyüme faktörü reseptörü gibi büyüme faktörü reseptörlerinin artan ekspresyonu ile gerçekleşebilir. PI3K yolu ile anjiyogenez arasında bir bağlantı vardır (39). PI3K dört izoformdan oluşur: PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD ve PIK3CG. PI3K'nın aktivasyonu, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfatı (PIP2) fosforile ederek fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3) üretir (40). Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3), çeşitli sinyal iletim yollarında hayati bir rol oynayan PI3K tarafından üretilen önemli bir lipid ikinci habercidir. PIP3, serin/treonin kinazları PDK1 ve AKT'yi aktive

eder. PTEN geni, PI3K'nın hareketine karşı çıkan bir fosfatı kodlar ve böylece aktive edilmiş AKT seviyesini düşürür. AKT, rapamisin'in memeli hedefinin (mTOR) fosforilasyonuna yol açarak protein sentezini ve hücre büyümesini kontrol eder (39). mTOR, işlevsel olarak farklı iki protein kompleksini kapsayan 289 kDa'lık bir serin/treonin kinazdır: mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2). PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu düzensizliği, RCC'li hastalarda sıklıkla tanımlanır (40).

2.4.3. PBRM-1 Mutasyonu

PBRM1, VHL ile aynı kromozom kolundadır ve ikinci alel sıklıkla VHL ile kodlanır (35). PBRM1, ccRCC'nin yaklaşık %50'sinde mutasyona uğrar ve bir SWI/SNF nükleozom remodelling kompleksinin kromatin hedefleme alt birimi olan protein BAF180'i kodlar (41). Bu protein, çeşitli DNA onarım mekanizmalarında yer alır ve aynı zamanda genomik stabiliteyi sürdürmek için gerekli olan sentromerler arasındaki kohezyon için de önemlidir (42). Nükleozomlar, tipik olarak etrafına 147 bp DNA'nın sarıldığı dört kanonik histon proteininin (H2A, H2B, H3 ve H4) her birinin iki kopyasından oluşan histon oktameleridir. DNA'nın histonlara bağlanması, transkripsiyon faktörlerine ve RNA polimerazlarına erişimini sınırlar. DNA erişilebilirliği, nükleozomları açan, yeniden konumlandıran ve çıkaran remodellerler tarafından düzenlenir (29). Şu anda dört farklı kromatin remodeling kompleksi ailesi vardır. Dördü de histon-DNA temaslarını değiştirmek ve benzer bir ATPaz alanını paylaşmak için ATP hidrolizini kullanır. Bununla birlikte, dördü de katalitik ATPazların da bulunan benzersiz alanlar ve ayrıca benzersiz ilişkili alt birimleri tarafından verilen belirli amaçlar ve biyolojik bağlamlar için uzmanlaşmıştır. SWI/SNF (geçişli kusurlu/sükrozu fermente etmeyen) aile remodellerleri başlangıçta *Saccharomyces cerevisiae*'den saflaştırılmıştır ve 8 ila 14 alt birimden oluşmaktadır (43). SWI/SNF kromatin remodelling kompleksleri, nükleozomları yeniden modellemek ve transkripsiyonu modüle etmek için ATP hidrolizinin enerjisini kullanır. Artan kanıtlar, birkaç SWI/SNF alt birimindeki inaktive edici mutasyonların son zamanlarda çeşitli kanserlerde yüksek bir frekansta tanımlandığı için, bu komplekslerin tümör baskılanmasında yaygın bir rolü olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bu komplekslerdeki mutasyonların tümör oluşumuna neden olduğu mekanizmalar belirsizdir. SNF5 (SMARCB1, INI1 ve BAF47 olarak da bilinir), ARID1A (BAF250A ve SMARCF1 olarak da bilinir), BAF180 (PBRM1 olarak da bilinir) ve BRM/SWI2

dahil olmak üzere SWI/SNF kromatin remodelling komplekslerinin alt birimlerinde spesifik inaktive edici mutasyonlar gen 1 (BRG1; ayrıca SMARCA4 olarak da bilinir) alt birimleri, çeşitli kanser türlerinde yüksek sıklıkta ortaya çıkar (44). Rafal Pawłowski ve ark. yaptığı çalışmada PBRM1 kaybının, RCC'nin berrak hücre alt tipinde baskın olduğu (~ %70) ve ileri tümör evresi ($p < 0.0001$) ve daha kötü hasta sonucu ($p = 0.025$) ile ilişkili olduğu bulunmuştur (36).

CcRCC, böbrek kanserinin en yaygın histolojik alt tipidir ve uzun bir süreden beri immünojenik tümörler oldukları kabul edilmektedir. Bununla birlikte, hastaların çoğunda, içsel veya adaptif direnç nedeniyle immün kontrol noktası blokajına (ICB) karşı kalıcı bir yanıt elde edememektedir. ICB ile tedavi edilen biyolojik olarak heterojen ccRCC hastalarında yanıtın itici güçlerini belirlemek acil klinik ihtiyaç içindedir. PBRM1 kaybının bağışıklık tepkisi üzerindeki etkisine ilişkin şimdiye kadarki veriler tutarsızdır. Son zamanlarda, PBRM1 mutasyonlarının, daha önce antianjiyogenik tedavi görmüş ccRCC hastalarında anti-PD-1 tedavisinden elde edilen klinik fayda ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, PBRM1 kaybının immünoterapiye yanıt üzerindeki etkisini tam olarak daha fazla karakterize etmek için RCC'ye özgü klinik verilere ihtiyaç vardır (45).

Metastatik RCC öldürücüdür ve geleneksel kemoterapötik ajanlara dirençlidir. Hedefli tedavilerin ve bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin mevcut metastatik RCC uygulamasına dahil edilmesi, en yaygın alt tip olan, ancak nadir olmayan böbrek kanseri olan ccRCC hastalarının medyan genel sağkalımını önemli ölçüde iyileştirmiştir (46).

2.4.4. BAP-1 Mutasyonu

BAP1 (BRCA1 ilişkili pretein), VHL ve PBRM1 genleri arasında kromozom 3p üzerinde bulunan iki vuruşlu bir tümör baskılayıcı gendir (29). ccRCC'nin ~%15'inde BAP1 mutasyona uğrar (30). BAP1 proteini, birkaç kromatin remodelling kompleksi için bir iskele görevi gören bir protein olan konakçı hücre faktörü-1 (HCF-1) ile etkileşime girer. BAP1 mutasyonu tipik olarak protein kaybıyla ilişkilidir (29). BAP1, hücre döngüsü, hücrel farklılaşma, hücre ölümü, glukoneogenez ve DNA hasar yanıtı dahil olmak üzere temel hücrel yolları düzenleyen çoklu protein kompleksleri ile ilişkili bulunan bir deubikuitilazdır (47). BAP-1 ilk olarak BRCA1 ile etkileşimine dayanarak tanımlandı ve yakın zamanda mezotelyoma, uveal melanom ve böbrek kanseri gibi birçok kanser türünde mutasyona uğradığı bulundu. Bununla birlikte, BAP1

eksikliği olan hücrelerin iyonize radyasyona ve PARP inhibitörü olaparibe karşı daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (48). PBRM1 mutasyonlarının ccRCC'deki BAP1 mutasyonları ile korelasyon gösterme eğiliminde olduğu ve PBRM1 ve BAP1 mutasyonlu tümörlerin farklı biyoloji sergilediği ve belirgin şekilde farklı sonuçlarla ilişkili olduğu keşfedilmiştir (30).

2.4.5. SETD-2 Mutasyonu

SETD2, 2 vuruşlu bir tümör baskılayıcı genidir ve ccRCC'de sıklıkla silinen bir alan olan 3p kromozomu üzerinde bulunur. Bazı çalışmalar bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gören SETD2'deki mutasyonların ccRCC vakalarının %3-12'sinde meydana geldiğini ve kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (49, 50) SETD2 mutasyonları, ccRCC tümörlerinin ~%10'unda gözlenir ve metastatik ccRCC hasta örneklerinde frekans dramatik bir şekilde ~%30'a yükselir, böylece bu genetik değişikliğin ccRCC'nin metastatik ilerlemesini yönlendirmede bir rolü olduğunu düşündürür (51). Önemli bir histon metiltransferaz olarak SETD2, histon H3K36'yı katalize edebilen ve onu trimetillenmiş H3K36'ya (H3K36me3) dönüştürebilen korunmuş bir SET alanı içerir. Ek olarak, H3K36me3, spesifik hedef genlerin transkripsiyonel uzamasında veya eklenmesinde yer alan hiperfosforile RNA polimeraz II ile ilişkilidir ayrıca transkripsiyonel aktivasyonu, DNA onarımını ve hücre döngüsü düzenlemesini etkileyebilecek kromatin yapısını değiştirebilir (52).

2.5. Ekzom Sekanslama Yöntemi

Mutasyon, genetik dizinin normal yapısının değişmesidir. Bu, dizideki gerçek değişim (tek nükleotid değişikliği, delesyon vb.), konum değişikliği ya da dizi miktarındaki değişiklik şeklinde meydana gelebilir. Somatik mutasyon, sonradan kazanılmış mutasyonlar olup germline mutasyonlar ise kalıtsal ve germ hücrelerinde de bulunan mutasyonlardır (53).

Yeni nesil dizilemenin (YND) ve genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının ortaya çıkışı, sistematik genetik çalışmalara ve RCC de dahil olmak üzere birçok farklı kanserin kapsamlı moleküler karakterizasyonunu tanımlamaya olanak sağlamıştır. Genomik çalışmalar, heterojen moleküler değişiklikler temelinde, yatkınlık yaratan genetik varyantları ve ortaya çıkarılan tümör alt tiplerini başarıyla tanımladı ve bu, ilgili moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağladı. RCC'li hastalar her zaman standart tedavilere yanıt vermez ve bazıları terapötik direnç geliştirir ve sonunda

hastalıktan ölür. Hasta sonuçlarını iyileştirmek amacıyla, hastalığın ilerlemesi riski altındaki bireyleri belirlemek ve RCC'yi önleme ve tedavi etmek için yeni yollar bulmak için genomik yaklaşımları kullanmak için güçlü bir motivasyon vardır (34).

Ekzom dizileme, genom boyunca protein kodlayan genlerin varyantlarını kapsamlı bir şekilde tanımlamak ve tipllemek için DNA zenginleştirme yöntemlerini ve büyük ölçüde paralel nükleotit dizilemesini kullanır. Birkaç yöntem mevcut olmasına rağmen, hepsi benzer bir ilke kullanır: bir genomik DNA örneğini, genomun protein kodlayan bölgeleri (ekzonlar) için zenginleştirilmiş olana indirgemek, ardından ekzonla zenginleştirilmiş örneğin çok yüksek verimli dizilimini sağlamak. Bu; yanlış anlamlı, anlamsız, küçük delesyon veya insersiyon mutasyonları dahil olmak üzere protein kodlayan mutasyonları hızla tanımlamak için bir yöntemdir (54).

İkinci nesil sekanslama platformları ve birinci nesil Sanger sekanslaması arasındaki temel fark; her bir reaksiyon için kapiller başına bir amplifiye DNA segmentinden sinyal üretmek yerine, çoğaltılarak elde edilen amplifiye DNA sekanslarını yoğun bir şekilde paralel olarak okuma ya da örneklemeye olanak sağlayan çalışmalardır. YND uygulamasının ilk aşaması mutasyonların saptanması ya da genomların bir araya getirilmesi için non-modifiye DNA moleküllerinin sekanslanmasıdır. DNA, moleküllerinin uçlarına özgül sekans adaptörlerinin eklenmesi yoluyla sekanslama kütüphaneleri oluşturulur ve YND uygulamaları tarafından ilk sekanslama tepkimelerinde kullanılır. Bir sekanslayıcıdan ham okumalar yapıldıktan sonra, kalitesi sık kullanılan Phred skoru (Q) ile ölçülür. Bu skor hata olasılığı ile ilişkili logaritmik bir ölçek kullanan Sanger bazlı sekanslayıcılar tarafından üretilen verilerin kalitesini belirtmek için ortaya çıkarılmıştır. Genel olarak bugünkü YND uygulamalarında okuma düzeyinde üretilen verilerin %90'ının Q skoru 30 (hata olasılığı 1000'de 1) ya da daha yüksektir. Rastgele sekanslamadaki hatalar aynı bölgenin birden fazla okunması ile aşılr. YND teknolojileri tarafından eş zamanlı olarak tespit edilebilen varyant tipleri; yapısal değişiklikler, tek nükleotid varyantları (SNV'ler) ve kısa indeller olmak üzere üç kategoriye ayrılır. SNV'ler ve kısa indellerin algılanması diğerlerine göre daha kolaydır. Buna karşın, kopya sayısı varyasyonları (KSV'ler) ve translokasyonlar gibi yapısal değişiklikler, üretilen veri türüne bağlı olarak ortaya çıkarılabilir. Bu aşamaların en büyük sıkıntısı veri üretme ve sekanslamadan ziyade verileri analiz etmektir. YND verilerini anlamlı bilgi haline dönüştürmek dört adımdan oluşur: elde edilen sinyalin DNA sekanslarına ya da dizilerine dönüştürülmesi,

sekanslama dizilerinin bir referans genomla karşılaştırılması, genomik varyantların isimlendirilmesi ve bu varyantların yorumlanması (55) (Tablo 2.6).

Dizi varyantlarının açıklaması, bir dizi varyantının yanlış mı yoksa doğru mu olduğunu ve bu varyantın işlevsel yorumunun gen (protein) işleviyle ilgili olup olmadığını belirler. Yanlış varyantlar, dokunun kendisinde bulunmayan ve değerlendirme öncesi işlem sırasında veya saklanma koşullarına bağlı olarak ortaya çıkan varyantlardır. Yanlış dizi varyantlarının üç ana sebebi vardır: DNA deaminasyon artefaktları, amplifikasyon hataları ve dizileme hataları. Formaldehit fiske parafine gömülü (FFPE) dokudaki yanlış varyantların başlıca nedeni, amplifikasyon sırasında sitozin:guanin> timin:adenin değişimiyle sonuçlanan sitozin bazlarının deaminasyonundan kaynaklanmaktadır. Hidrolitik deaminasyon doğal olarak meydana gelir, bu nedenle daha eski numuneler bu tür hatalara daha yatkınlık gösterir, ek olarak formalin fiksasyonu da bu süreci oldukça etkiler (56).

Tablo 2.6. Yeni nesil dizileme algoritması

Materyal eldesi → DNA izolasyonu → Hedef bölge seçimi → DNA kütüphanesi oluşturma → DNA parçalarını çoğaltma → Dizileme → Ham veri oluşturma → Haritalama → Varyant çağırma → Doğrulama → Patojenik varyantların belirlenmesi → Raporlama

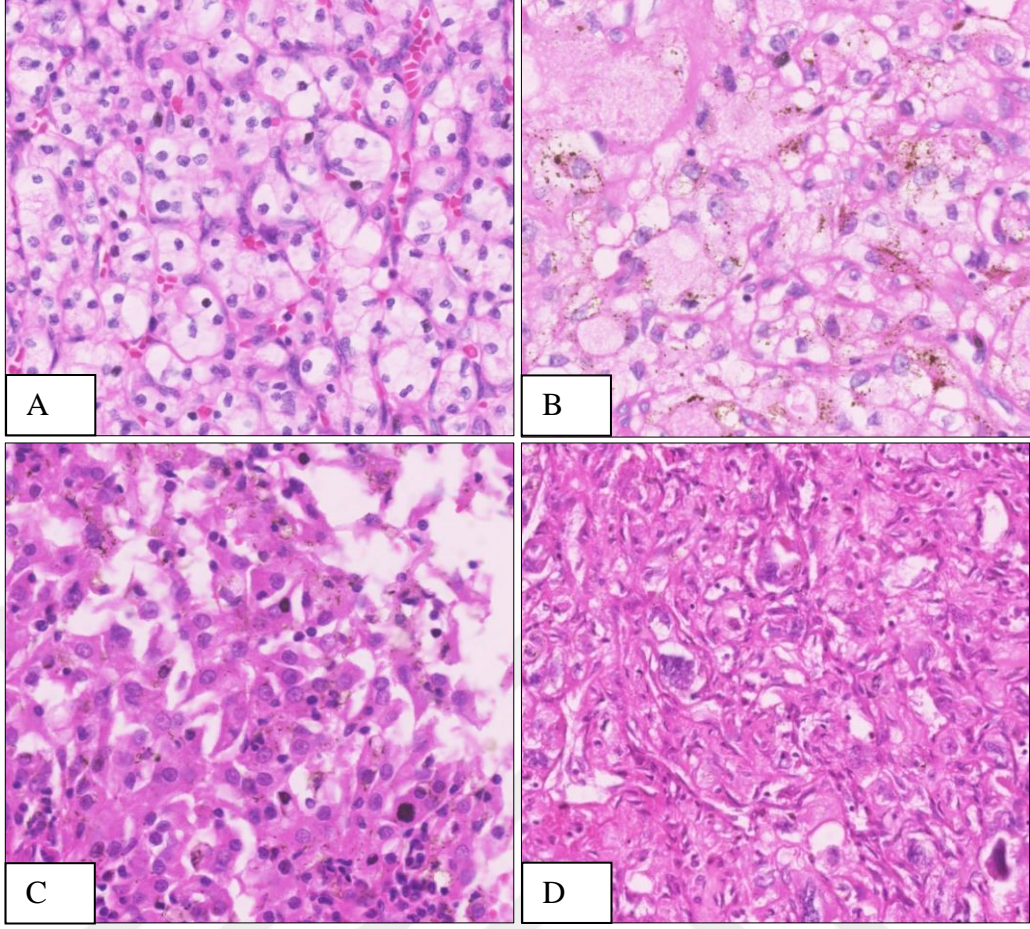
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi ve Klinikopatolojik Verilerin Elde Edilmesi

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilimdalı laboratuvarı arşivinden retrospektif tarama ile 2015-2021 yılları arasına ait, histomorfolojik ve immünohistokimyasal bulgular ile tanı almış ccRCC olguları tespit edildi. Bu olguların tüm lamları yeniden değerlendirilerek WHO/ISUP sınıflamasına göre 40 adet yüksek grade'li (25 adet grade 3, 15 adet grade 4), 40 adet düşük grade'li (8 adet grade 1, 32 adet grade 2) olgu çalışmaya dahil edildi ve yeterli tümör alanı içeren FFPE bloklar tespit edildi. Bu olgulardan 14 tanesi retroperiton, sternum, sürrenal, iliak kanat, akciğer, vertebra, kot, femur, karaciğer, humerus gibi farklı alanlara metastaz yapmıştır.

80 olgunun tümü için immünohistokimya çalışılırken 6'sı düşük grade'li, 6'sı yüksek grade'li olmak üzere 12 olgu ekzom sekanslama için seçildi. Metastatik ve non-metastatikler arasında moleküler değişiklikler açısından farklılık olup olmadığını değerlendirmek adına olguların 6'sı farklı alanlara metastaz yapmış olgulardan seçildi.

Hastaların yaşı, olguların metastaz yapıp yapmadığı, hastaların sağkalımı ile ilgili veriler hastane bilgi yönetim sistemi aracılığıyla elde edildi.



Şekil 3.1. Çalışmaya ait olguların histopatolojik görünümü A: Grade1 (x20), B: Grade2 (x20), C: Grade3 (x20), D: Grade4 (x10)

3.2. Ekzom Sekanslama İşlemi ve Analizi

3.2.1. DNA İzolasyonu

İzolasyon işlemi için seçilen 12 olgunun H&E boyalı lamaları değerlendirilerek tümörden zengin alanlar işaretlendi. Her bir örnek için İnönü Üniversitesi Tıbbi Patoloji laboratuvarına ait mikrotom cihazı ile 6 µ kalınlıkta 6'şar kesit alındı. Hazırlanan lamalar deparafinizasyon işlemi için sırasıyla 10 dakika 65°C'de etüve alındı. Ardından 10 dk ksilen, 10 dk. %100 alkol ve 10 dakika distile su ile yıkama işlemlerine tabi tutuldu. Parafinden arındırılan kesitlerdeki ilgili tümör alanları, işaretli H&E lamaları kılavuzluğu eşliğinde bistüri ucu ile lam üstünden makrodisekte edildi ve ependorf tüplere alındı. Diseksiyon işlemi olası yorum farkı ihtimalini ortadan kaldırmak adına tek kişi tarafından yapıldı. Dokulara ardından QIAamp DNA FFPE Tissue ekstraksiyon kiti kullanılarak kit protokolü uygulandı:

DNA İzolasyonu

Dokular 180 µl “ATL buffer” ve 20 µl proteinaz K ile karıştırılıp, vortekslendi.

1 saat ısı blok üzerinde 56 °C’de bekletildi.

1 saat ısı blok üzerinde 96 °C’de bekletildi.

Tüpler ısı bloktan alınıp kısaca santrifüj edildi.

Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra 2 uL RNase A (100mg/mL) eklendi ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

Tüplere 200uL AL tampon eklendi ve vorteks edildi.

Daha sonra 200uL etanol eklendi ve vorteks edildi.

Tüm lizat kısa bir santrifüjden sonra QIAmp MinElute kolonlara aktarıldı.

Fitreli tüpler 6000g’de (8000rpm) 1 dk santrifüj edildi ve alttaki 2mL collection tüpler atıldı, yerine temiz tüp konuldu.

Her tüpe doğrudan filtreye eklenecek şekilde 500uL AW1 tampon eklendi.

Fitreli tüpler 6000g’de (8000rpm) 1 dk santrifüj edildi ve alttaki 2mL collection tüpler atıldı, yerine temiz tüp konuldu.

Her tüpe doğrudan filtreye eklenecek şekilde 500uL AW2 Buffer eklendi.

Fitreli tüpler 6000g’de (8000rpm) 1 dk santrifüj edildi ve alttaki 2mL collection tüpler atıldı, yerine temiz tüpler konuldu.

20000g’de (14000 rpm) 3 dk santrifüj edilip, membranlar tamamen kurutuldu.

QIAmp filtreler temiz 1,5 mL ependorflara alındı. 50uL ATE buffer eklenip oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

20000g’de (14000 rpm) 1 dk santrifüj edildi. Filtreler atıldı.

DNA’nın Nitel ve Nicel Analizleri

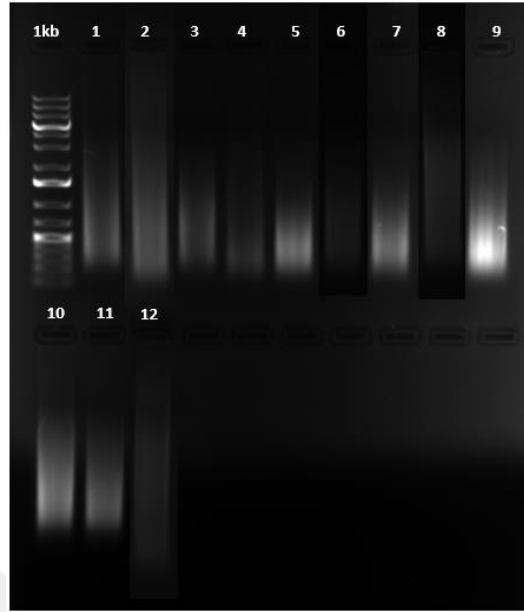
Parafin dokulardan kit yardımı ile elde edilen genomik DNA’ların miktarı ve saflığı spektrofotometre ile ölçüldü. OD260/OD280 değerleri belirlendi.

DNA’ların miktar ve kalite tayini için % 1’ lik (ağırlık/hacim) jel hazırlandı. 80V’da 50 dakika yürütüldü.

Marker olarak 1kb ladder kullanıldı.

Elektroforez sonrasında UV ışık altında bantlar gözlemlendi (Şekil 3.2) (Tablo 3.1).

Elde edilen DNA'lar çalışılncaya kadar -20°C'de saklandı.



Şekil 3.2. 12 olgunun elektroforezde yürütülmesi sonucu elde edilen görüntü

Tablo 3.1. DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA miktarları

Örnek adı	Konsantrasyon (ng/uL)	Hacim (uL)
1	142	40uL
2	280	40uL
3	123	40uL
4	120	40uL
5	165	40uL
6	152	40uL
7	99	40uL
8	206	40uL
9	130	40uL
10	181	40uL
11	148	40uL
12	144	40uL

3.2.2. Ekzom Sekanslama

Barkotlanan DNA, ekzom bölgeleri yakalama işlemine tabi tutuldu (Ek.1). İnsan genomu ekzomuna ait yaklaşık olarak 60 Mb ekzom (CDS, RefSeq ve Gencode veritabanları ve ClinVar varyantlarının >%99 kadarını kapsayan) zenginleştirildi. Hazırlanan DNA kütüphaneleri yeni nesil DNA dizileme teknolojisi ile sekanslandı. Bu test ile hedeflenen ekzom bölgesinin >%95'i, %99 hassasiyetle dizilendi (Ek.2).

Ham okumalar, referans genoma (Hg19) haritalanarak variant çağırma işlemi en az 10X derinliğinde olanlar arasından tespit edildi. Belirlenen varyantlar arasında patojenite ve global minor allele frequency (MAF) <%5 gibi parametreler kullanılarak eliminasyon yapıldı. Bu örnek için, InDel ve SNP (single nükleotid polimorfizm) varyant listeleri elde edilerek yukarıda belirtilen veritabanları ile atıflandırmaya tabi tutuldu. Biyoinformatik analizler ile filtrasyona ve atıflandırmaya tabi tutulan varyantlar teker teker incelenerek, ClinVar (class 1), MAF (<%0.5) ve ExAc (<%1) kriterlerine göre değerlendirildi. Bu kapsamda, ekzonlar ve +/-20 ekzon-intron sınırında olan bölgeler 2X derinliğinde incelendi. Yalnızca, patojenik ve olası patojenik olan varyantlar bu test kapsamında değerlendirildi.

3.3. İmmünohistokimyasal İnceleme

3.3.1. İmmünohistokimya Çalışma Prosedürü

İmmünohistokimyasal değerlendirme için BAP-1 (C4, MC0136, Medaysis) PBRM-1(D4L9X, Q86U86, Cell Signaling) SETD-2 (E4W8Q, Q9BYW2, Cell Signaling) antikorları kullanıldı.

İmmünohistokimya çalışılacak olan blokların her birinden en az %80 oranında tümör içeren 5 mm çapındaki alanlardan örnekler alındı. 8 tümör dokusu ve 1 dış kontrol böbrek dokusu tek parafin bloğa gömülerek mikrodizin oluşturuldu. 80 olgu için 10 blok hazırlandı. Parafin bloklardan 3 mikronluk kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Bir saat 62 °C 'de etüvlendi. İmmünohistokimya boyaması, Dako Omnis tam otomatik immünohistokimya boyama cihazında gerçekleştirildi. Cihazdaki işlem basamakları PBRM-1 için aşağıdaki gibidir;

- Deparafinizasyon: Cihazda 25 °C' de Clearify Celaring Agent ile iki aşamalı devaks işlemi gerçekleştirir, ardından distile suda 1 dakika bekletilir.

- Retrieval aşaması: EnV FLEX TRS, High solüsyonu içerisinde 97 °C' de 30 dakika kaynatma aşamasının ardından distile su içerisinde bekletilir.
- Yıkama aşaması: 2 kez yıkama tamponunda 2 dakika bekletilir.
- Endojen enzim bloklama: EnV FLEX Peroksidaz-Blocking Reagent ile 3 dakika inkübasyon yapılır.
- Boyama aşaması: PBRM-1 1/800 dilüsyonda hazırlanır. 35 dakika primer antikör ile muamele edilir.
- Yıkama aşaması: 10 kez yıkama tamponunda 2 dakika bekletilir.
- İkincil reaktif ile muamele: EnV FLEX+Rabbit LINKER ile 15 dakika inkübasyon yapılır.
- Yıkama aşaması: 10 kez yıkama tamponunda 2 dakika bekletilir
- İkincil reaktif ile muamele: EnV FLEX/HRP ile 20 dakika inkübasyon yapılır.
- Yıkama aşaması: 10 kez yıkama tamponunda 2 dakika bekletilir.
- Yıkama aşaması: 10 kez yıkama tamponunda 2 dakika bekletilir.
- Yıkama aşaması: Distile suda 31 saniye bekletilir.
- Yıkama aşaması: 10 kez yıkama tamponunda 2 dakika bekletilir.
- Substrat kromojen: EnV FLEX Substrate Working Solution ile 5 dakika inkübasyon yapılır.
- Yıkama aşaması: 10 kez yıkama tamponunda 2 dakika bekletilir.
- Yıkama aşaması: Distile suda 31 saniye bekletilir.
- Yıkama aşaması: 10 kez yıkama tamponunda 2 dakika bekletilir.
- Karşıt boyama: Hematoksilen ile 10 dakika inkübasyon yapılır.
- Yıkama Aşaması: 10 kez distile suda 2 dakika inkübasyon yapılır.
- Yıkama aşaması: 10 kez yıkama tamponunda 2 dakika bekletilir.

- Kapatma: Preparatlar %70, %85 ve %100 alkol serilerinden geçirilir. İki ksilol serisinde bekletildikten sonra entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirilir.

BAP-1 için:

PBRM-1 ie aynı işlem basamakları takip edildi, antikor ve ikincil reaktif adımlarında;

- Boyama aşaması: Bap-1 1/120 dilüsyonda hazırlandı. 35 dakika primer antikor ile muamele edildi.
- İkincil reaktif ile muamele: EnV FLEX+Mouse LINKER ile 10 dakika inkübasyon yapıldı.

SETD2 için:

PBRM1 ve BAP-1'deki deparafinizasyon ve retrieval aşamalarından sonra;

- Yıkama aşaması: 2 kez yıkama tamponunda 2dk 40 sn dakika bekletilir.
- Boyama aşaması: SETD2 1/500 dilüsyonda hazırlanır. 50 dakika primer antikor ile muamele gerçekleşir.
- Yıkama, endojen enzim bloklama ve tekrar yıkama aşamalarının ardından
- İkincil reaktif ile muamele: EnV FLEX+rabbit LINKER ile 10 dakika inkübasyon yapılır.
- Kalan aşamalar PBRM-1 ve BAP-1 ile aynıdır.

3.3.2. İmmünohistokimya Değerlendirme Prosedürü

İmmünohistokimyasal olarak boyanan preparatlar bir uzman patolog (ST) ve bir araştırma görevlisi (ŞE) tarafından ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Dış kontrolde tübül ve glomerüllerde boyanma varlığı pozitif olarak yorumlandı. İç kontrol olarak inflamasyon hücrelerinde boyanma varlığı pozitif olarak kabul edildi. BAP-1 ve PBRM-1 için tümörler, negatif (0), zayıf boyanma (1) orta derecede boyanma (2) kuvvetli boyanma (3) olarak sınıflandırdı. Tümör hücreleri, nükleer PBRM-1 veya BAP-1 boyanması diffüz kayıp gösterdiğinde, PBRM-1 veya BAP-1 negatif olarak kategorize edildi. Daha önceki çalışmalarda olduğu gibi zayıf, orta ve kuvvetli boyanan hücreler tümör alanının %5'ten fazlasında ekspresyon gösteriyorsa PBRM-1 ve BAP-1 pozitif

olarak kabul edildi. Dış kontrol olarak normal böbrek dokusunda tübüllerde ve glomerüllerde saptanan boyamanın yoğunluğu, kuvvetli boyama için referans kabul edildi.

SETD-2 immünohistokimyasal boyanması diğer iki boyanmaya göre daha zayıf olduğundan hiç boyanma görülmemesi durumunda tümörler negatif, %5'ten fazla hücrede boyanma görülmesi durumunda pozitif olarak yorumlandı.

3.4. İstatistiksel Analiz

Veriler sayı (yüzde), ortalama \pm standart sapma ve medyan (minimum-maksimum) ile verildi. Normal dağılıma uygunluk için Shapiro Wilk testi kullanıldı. İstatistik analizlerde, Mann Whitney U testi, bağımsız örneklerde t testi, Pearson ki kare testi, Yatesin düzeltilmeli ki kare testi ve Fisher kesin ki kare testi uygun olan yerlerde kullanıldı. Genel sağkalım ve sağkalıma etki eden faktörler durumunda sağkalım analizleri için ise Kaplan Meier yöntemi kullanıldı. İlgili analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analizlerde IBM SPSS Statistics 26.0 programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Klinikopatolojik Veriler

Çalışmaya dahil ettiğimiz 80 olgunun 40'ı yüksek grade'li (15'i Grade4, 25'i Grade3), 40'ı düşük grade'li (8'i Grade1, 32'si Grade2) olgulardır. Hastaların yaş aralığı 32-89 olup, ortalama yaş 58; tümör çapı 1,1cm ve 17,4 cm arasında değişmekte olup ortalama 6,34 cm'dir (Şekil 4.1). Olguların 26'sı kadın, 54'ü erkek; 38 olgu sağ radikal/parsiyel, 42 olgu sol radikal/parsiyel nefrektomi operasyonu geçirmiştir. 43 olgu pT1, 9 olgu pT2, 27 olgu pT3, 1 olgu pT4 evrelerindedir. Bu olgulardan 14'ü en sık akciğere olmak üzere farklı alanlara metastaz yapmıştır (Tablo 4.1, 4.2, 4.3).

Tablo 4.1. Klinikopatolojik verilere ilişkin tanımlayıcı istatistikler

Kategoriler		Sayı (yüzde%)
Evre	pT1	43 (53,8%)
	pT2	9 (11,3%)
	pT3	27 (33,8%)
	pT4	1 (1,3%)
Cinsiyet	Erkek	54 (67,5%)
	Kadın	26 (32,5%)
Ameliyat şekli	Sağ radikal/parsiyel	38 (47,5%)
	Sol radikal/parsiyel	42 (52,5%)
Grade	1	8 (10,0%)
	2	32 (40,0%)
	3	25 (31,3%)
	4	15 (18,8%)
Metastaz	Var	14 (17,5%)
	Yok	66 (82,5%)
Ex	Ex	19 (23,7%)
	Hayatta	61 (76,2%)

Tablo 4.2. Tümör boyutu ve yaş ortalamaları

Değişken	Sayı	Art. Ort.± std. Sapma	Ortanca (min-max)
Yaş (yıl)	80	58±11	58 (32-89)
Tümör boyutu (cm)	80	6,34±3,08	5,5 (1,1-17,4)

Tablo 4.3. Metastatik olguların evre, grade ve metastaz yeri dağılımı

	Evre	Grade	Metastaz yeri
1	pT1	2	Retroperiton
2	pT3	2	Sternum
3	pT3	2	Sürrenal
4	pT2	2	İliak kanat
5	pT3	3	Akciğer
6	pT3	3	Vertebra
7	pT1	3	Kot
8	pT1	3	Femur
9	pT2	3	Vertebra
10	pT1	3	Karaciğer
11	pT1	4	Akciğer
12	pT3	4	Akciğer
13	pT3	4	Akciğer
14	pT3	4	Humerus

4.2. Genel Verilerin Değerlendirilmesi

Evre, grade, yaş, tümör boyutu, tümör lateralizasyonu, cinsiyet, metastaz parametreleri birbirleri ile karşılaştırıldı (Tablo 4.4). Yüksek evre (evre 3+4) ve tümör boyutu arasında beklenildiği gibi anlamlı bir ilişki bulundu ($p<0.001$). Metastaz ile tümör boyutu arasında korelasyon mevcuttu ($p=0,03$). Metastatik olguların tümör boyutu ortalaması 7,4 cm iken, non-metastatik olguların tümör boyutu ortalaması 6,1 cm'dir. Erkek hastalarda yüksek grade'li tümörlerin daha sık olduğu görüldü ($p=0,042$). Diğer parametrelerin birbiri ile ilişkisi saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.4. Evre ve grade'in tümör boyutu ve yaş ile ilişkisi

		Tümör boyutu (cm)		Yaş (yıl)		p
		Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	
Evre	pT1/2	5,03	2,1	56	12	p<0,001, p=0,116
	pT3/4	8,78	3,15	61	10	
Grade	1/2	5,98	3,3	57	10	p=0,111, p=0,704
	3/4	6,71	2,84	58	12	

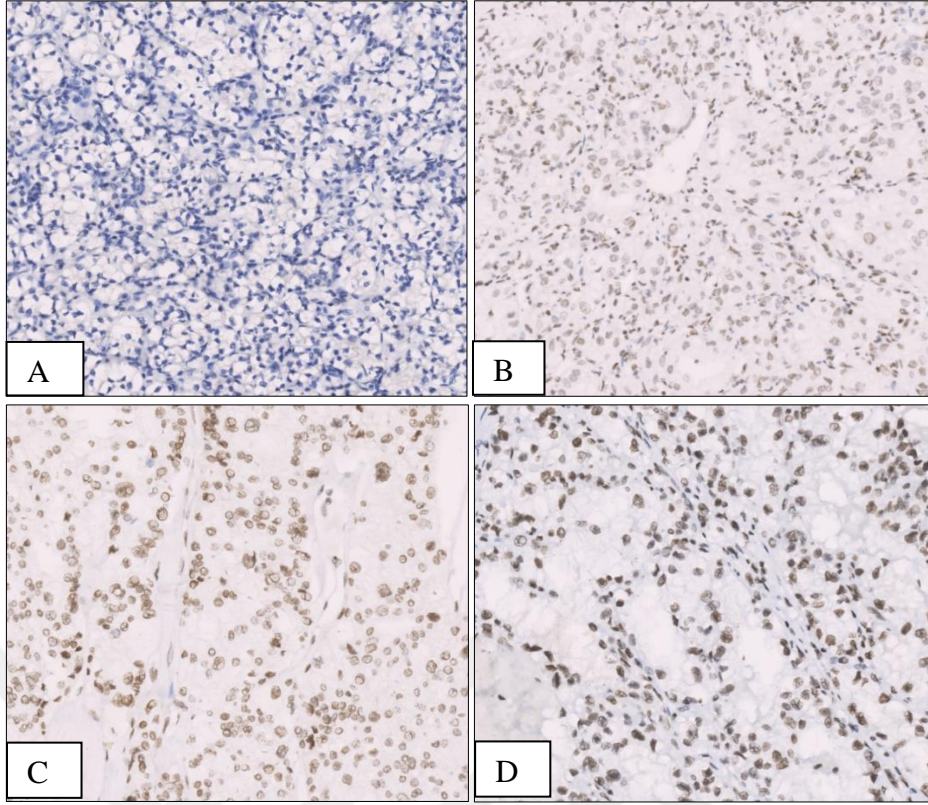
Tablo 4.5. Evre ve grade'e göre cinsiyet dağılımı

		Erkek		Kadın		p
		Sayı	Yüzde %	Sayı	Yüzde %	
Evre	pT1	32	59,3%	11	42,3%	0,101
	pT2	3	5,6%	6	23,1%	
	PT3	18	33,3%	9	34,6%	
	pT4	1	1,9%	0	0,0%	
Grade	1	6	11,1%	2	7,7%	0,042
	2	18	33,3%	14	53,8%	
	3	22	40,7%	3	11,5%	
	4	8	14,8%	7	26,9%	

4.3. PBRM-1 İmmünohistokimyasal Boyanmasının Değerlendirilmesi

Çalışmaya katılan 80 olguda nükleer boyanma yoğunlukları değerlendirildi. 33 olgu negatif, 26 olgu 1+, 14 olgu 2+, 7 olgu 3+ olarak değerlendirildi (Şekil 4.1). Pozitiflik saptanan olgular bir grup, negatiflik saptanan olgular bir grup olarak yorumlandı.

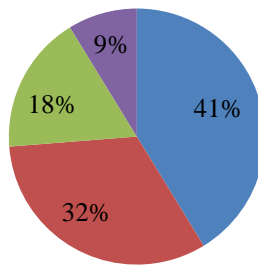
80 olgunun 33'ünde PBRM-1 ile boyanma kaybı saptanırken bu oran olguların %41,25 ini oluşturmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. PBRM-1 boyanma paternleri (x10) A: Negatif B: 1+, C: 2+, D:3+

PBRM1

■ Negatif ■ 1+ ■ 2+ ■ 3+



Şekil 4.2. PBRM-1'in boyanma dağılımı

Negatiflik saptanan olguların 14 ü kadın hasta, 19'u erkek hasta, 15 olgu düşük grade'li (4 olgu grade 1, 11 olgu grade 2) 18 olgu yüksek grade'li (11 olgu grade 3, 7 olgu grade 4) hastalardan oluşmaktadır.

Negatiflik saptanan olguların 21 'i düşük evre (16 olgu evre 1, 5 olgu evre 2) 12'si yüksek evre (11 olgu evre 3, 1 olgu evre 1) hastalardan oluşmaktadır. Metastatik olguların 3'ünde PBRM-1 ile negatiflik saptandı (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. PBRM-1 boyanmasının evre, grade ve metastaz ile ilişkisi

Değişken	PBRM-1				p	
	Negatif		Pozitif			
	Sayı	Yüzde%	Sayı	Yüzde%		
Evre	pT1	16	48,5%	27	57,4%	0,479
	pT2	5	15,2%	4	8,5%	
	pT3	11	33,3%	16	34,0%	
	pT4	1	3,0%	0	0,0%	
Grade	1	4	12,1%	4	8,5%	0,768
	2	11	33,3%	21	44,7%	
	3	11	33,3%	14	29,8%	
	4	7	21,2%	8	17,0%	
Metastaz	Yok	30	90,9%	36	76,6%	0,174
	Var	3	9,1%	11	23%	

İstatistiksel açıdan PBRM-1 negatifliği ile evre (p=0,479), grade (p=0,768) ve metastaz (p=0,174) arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.

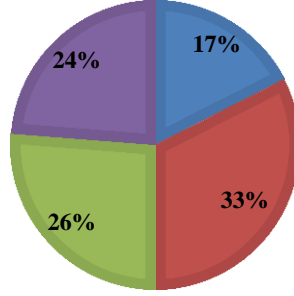
Ayrıca yaş (0,769), tümör boyutu (p=0,18), cinsiyet (p=0,178) ile de istatistiksel açıdan anlamlılık saptanmadı.

4.4. BAP-1 İmmünohistokimyasal Boyanmasının Değerlendirilmesi

BAP-1 immünohistokimyasal boyanması için nükleer boyanma yoğunluğu dikkate alınarak değerlendirme yapıldı. 80 olgunun 14'ü negatif olarak yorumlandı. 26 olgu 1+, 21 olgu 2+, 19 olgu 3+ olarak saptandı (Şekil 4.3). Pozitiflik saptanan olgular bir grup, negatiflik saptanan olgular bir grup olarak kategorize edildi.

BAP 1

■ Negatif ■ 1+ ■ 2+ ■ 3+

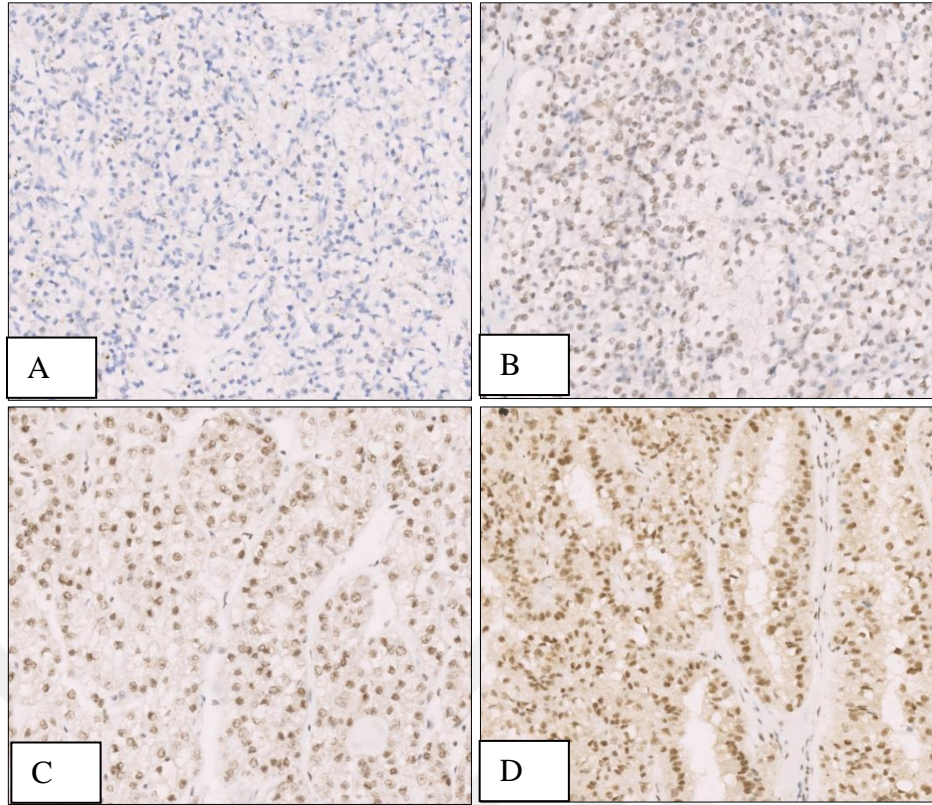


Şekil 4.3. BAP-1'in boyanma dağılımı

Negatiflik saptanan olguların oranı %17,5 olup 8'i kadın, 6'sı erkek; 9'u düşük evre (6 olgu evre 1, 3 olgu evre 2), 5'i yüksek evre (tamamı evre 3) hastalardan oluşmaktadır. 6 olgu düşük grade'li (3 olgu grade1, 3 olgu grade2), 8 olgu yüksek grade'li (6 olgu grade 3, 2 olgu grade 4) olguları temsil etmektedir.

İstatistiksel açıdan evre ($p=0,538$), grade ($p=0,204$) ve metastaz ($p=0,703$) ile BAP-1 negatifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. (Tablo 4.7)

Ayrıca yaş ($p=0,883$), tümör boyutu ($p=0,239$), cinsiyet ($p=0,056$) ile de anlamlılık saptanmadı.



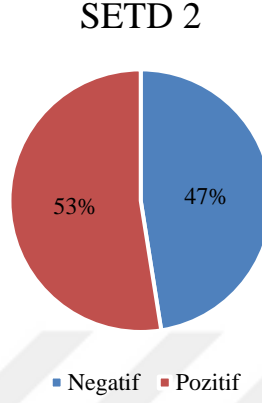
Şekil 4.4. BAP-1 boyanma paternleri (x10) A: Negatif B: 1+, C: 2+, D:3+

Tablo 4.7. BAP-1 boyamasının evre, grade ve metastaz açısından değerlendirilmesi

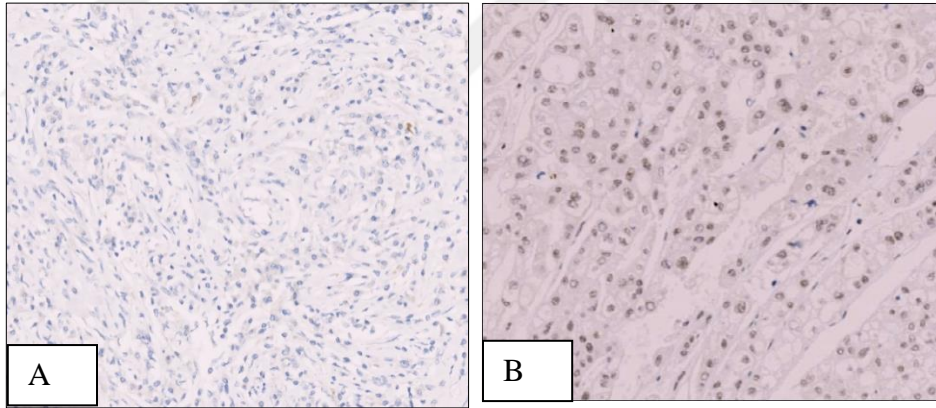
Değişken	BAP1				P	
	Negatif		Pozitif			
	Sayı	Yüzde%	Sayı	Yüzde%		
Evre	pT1	6	42,9%	37	56,1%	0,538
	pT2	3	21,4%	6	9,1%	
	pT3	5	35,7%	22	33,3%	
	pT4	0	0,0%	1	1,5%	
Grade	1	3	21,4%	5	7,6%	0,204
	2	3	21,4%	29	43,9%	
	3	6	42,9%	19	28,8%	
	4	2	14,3%	13	19,7%	
Metastaz	Yok	11	78,6%	55	83,3%	0,703
	Var	3	21,4%	11	16,7%	

4.5. SETD2 İmmünohistokimyasal Boyanmasının Değerlendirilmesi

SETD2 immünohistokimyasal boyanmasının değerlendirmesinde nükleer boyanmanın varlığı veya yokluğuna göre 80 olgunun 38'i negatif, 42'si pozitif olarak yorumlandı (Şekil 4.5, 4.6)



Şekil 4.5. SETD-2'nin boyanma dağılımı



Şekil 4.6. SETD2 boyanma paterni (x10) A: Negatif B: Pozitif

Bu olguların 25'i erkek, 13'ü kadın; 20 olgu düşük evre (16 olgu pT1 1, 4 olgu pT 2), 18 olgu yüksek evre (17 olgu pT3, 1 olgu pT4); 17 olgu düşük grade (3 olgu grade 1, 14 olgu grade 2), 21 olgu yüksek grade (11 olgu grade 3, 10 olgu grade 4) hastalardan oluşmaktadır. 14 metastatik olgunun 8'inde negatiflik mevcutken, 6 olguda immünohistokimyasal olarak pozitif saptandı (Tablo 4.8).

SETD2 negatifliği patolojik evrelerin ayrı ayrı değerlendirilmesiyle anlamsız bulunurken (p=0,135), düşük patolojik evre (pT 1+2) ile yüksek patolojik evre (pT 3+4) karşılaştırmasında yüksek patolojik evre olgularda daha fazla olduğu ve istatistiksel

olarak anlamlı olduğu bulundu ($p=0.049$) (Tablo 4.9). Aynı zamanda SETD2 negatifliği yüksek tümör boyutu ile de ilişkili bulundu ($p=0.03$). SETD2 immünohistokimyasal boyanmasının cinsiyet ($p=0,943$), yaş ($p=0,702$), metastaz ($p=0,616$) ve grade ($p=0,418$) ile ilişkisi bulunamadı.

Tablo 4.8. SETD2 boyanmasının evre, grade ve metastaz açısından değerlendirilmesi

Değişken	SETD2				p	
	Negatif		Pozitif			
	Sayı	Yüzde%	Sayı	Yüzde%		
Evre	pT1	16	42,1%	27	64,3%	0,135
	pT2	4	10,5%	5	11,9%	
	pT3	17	44,7%	10	23,8%	
	pT4	1	2,6%	0	0,0%	
Grade	1	3	7,9%	5	11,9%	0,418
	2	14	36,8%	18	42,9%	
	3	11	28,9%	14	33,3%	
	4	10	26,3%	5	11,9%	
Metastaz	Yok	30	78,9%	36	85,7%	0,616
	Var	8	21,1%	6	14,3%	

Tablo 4.9. SETD-2 boyaması ile düşük ve yüksek patolojik evre karşılaştırması

Evre	Düşük evre (pT1+2)	SETD2		Toplam	p
		Negatif	Pozitif		
	Düşük evre (pT1+2)	Sayı	20	32	52
		Yüzde%	38,5%	61,5%	100,0%
	Yüksek evre (pT3+4)	Sayı	18	10	28
		Yüzde%	64,3%	35,7%	100,0%
Toplam		Sayı	38	42	80
		Yüzde%	47,5%	52,5%	100,0%

4.6. PBRM-1, BAP-1, SETD2 Mutasyonlarının Birlikteliği

PBRM1 negatif 33 olgunun 10 tanesi BAP-1 ile de negatif olup her iki antikorun birlikte negatifliği istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,026$) (Tablo 4.10).

PBRM-1 negatif 33 olgunun 12'sinde SETD-2 negatifken ($p=0,149$), SETD2 negatif 38 olgunun 10'u BAP1- ile negatiftir ($p=0,093$) ve istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

80 olgudan her üç antikor ile negatif 6 vaka mevcut olup bu sayı olguların %7,5'ini oluşturmaktadır.

Tablo 4.10. BAP-1 ve PBRM-1'in birlikteliği

		PBRM1		p
		Negatif	Pozitif	
BAP1	Negatif	10	4	0,026
	Pozitif	23	43	

4.7. Sağkalım Analizleri

Olguların en kısa takip süresi 2,6 ay iken en uzun takip süresi 77,4 ay olarak belirlendi. Medyan takip süresi 37,2 aydır. 80 olgunun 19'u ex olurken sağkalım oranı %76,3 olarak belirlendi. Ortalama sağ kalım süresi 60,2 ay olarak hesaplandı. Patolojik evre ve sağ kalım arasında anlamlı bir ilişki bulundu ($p<0.001$). Patolojik evre arttıkça sağ kalım oranları düşmektedir (Tablo 4.11). Grade ile sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0.457$).

Tablo 4.11. Evreye göre sağkalım oranları

Evre	Toplam	Ex	Sağ	Yüzde	p
pT1	43	2	41	95,3%	p<0.001
pT2	9	4	5	55,6%	
pT3	27	12	15	55,6%	
pT4	1	1	0	0,0%	
Toplam	80	19	61	76,3%	

Metastatik olgularda sağkalım oranı %50 olarak bulunmuş olup genel sağ kalım süresi 48 aydır. Bu oran non-metastatiklere göre daha kısadır ($p=0,045$) (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Metastaza göre sağkalım oranları

Metastaz	Toplam	Ex	Sağ	Yüzde	p
Yok	66	12	54	81,8%	p=0,045
Var	14	7	7	50,0%	
Toplam	80	19	61	76,3%	

BAP-1 negatif olgularda sağkalımın düşük (%57,1) ve istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü (p=0,039) (Tablo 4.13). PBRM-1 (p=0.207) ve SETD-2 (p=0.543) ile sağkalım arasında anlamlı bir ilişki görülmedi.

Tablo 4.13. BAP-1 sağkalım oranları

BAP-1	Toplam	Ex	Sağ	Yüzde	p
Negatif	14	6	8	57,1%	p=0.039
Pozitif	66	13	53	80,3%	
Toplam	80	19	61	76,3%	

4.8. Ekzom Sekanslama

6'sı düşük grade'li, 6'sı yüksek grade'li olmak üzere 12 olgu ekzom sekanslama için seçildi. Bu olguların 6'sı kadın hasta, 6'sı erkek hasta; 6'sı farklı alanlara metastaz yapmış olgulardı. 4 olgu evre 1, 2 olgu evre 2, 6 olgu evre 3 hastalardan oluşmaktadır (Tablo 4.11).

Moleküler çalışma için gönderilen 12 olguda VHL, PBRM-1, BAP-1 ve SETD2 genleri ile ilgili nokta mutasyonları, geniş delesyon ve insersiyonları ve gen kopya sayısı değişiklikleri incelendi. Ayrıca genel tarama yapılarak ortak mutasyonlar saptanmaya çalışıldı.

12 olgunun hiçbirinde VHL, PBRM-1, BAP1, SETD2 genlerine ait anlamlı patojen, indel varyant saptanmadı (Ek. 3-9). İmmünohistokimyasal olarak bu olguların 5'inde PBRM-1 ile negatiflik mevcutken, SETD-2 ile 6 olguda negatiflik izlendi. BAP-1 ile tüm olgular pozitif saptandı (Tablo 4.14).

Yapılan taramalarda olguların 7'sinde ARSD geni ile ilgili SNV tipi mutasyon saptanırken, 9 olguda SLC25A5 geni ile ilgili SNV tipi mutasyon izlendi (Tablo 4.15).

Tablo 4.14. Ekzom sekanslama yapılan olgular (PBRM-1 BAP-1, SETD-2: +: İHK'sal olarak pozitif, -: İHK'sal olarak negatif olgular;
Metastaz: +: Metastaz var, - : Metastaz yok)

Evre	Cinsiyet	Tm boyutu	Yaş	Grade	PBRM1	BAP1	SETD2	Metastaz
1	pT3	8	54	2	+	+	+	+
2	pT3	12	50	4	+	+	-	+
3	pT2	9	55	2	+	+	-	+
4	pT1	3	48	2	+	+	+	+
5	pT1	5,5	53	3	-	+	+	+
6	pT2	9,5	45	3	-	+	+	-
7	pT3	6	73	2	+	+	-	-
8	pT1	5	72	3	+	+	+	-
9	pT3	8,5	77	4	-	+	-	-
10	pT3	14	67	2	-	+	-	-
11	pT3	11	63	2	-	+	+	-
12	pT1	6,5	61	4	+	+	-	+

***2,3,4,5,6,10,11 no'lu olgularda ARSD mutasyonu saptanırken 2,3,4,5,6,7,9,10,12 nolu olgularda SLC25A5 mutasyonu izlendi.

Tablo 4.15. ARSD ve SLC25A5 mutasyonlarının özellikleri

Gen	Kromozom Lokasyonu	Zigozite	Mutasyon Tipi	NM kodu	Nt Değişimi	Aa Değişimi	dbSNP ID	PolyPhen	CADD
ARSD	X-2833638	Het	SNV	NM_001669	c.G959A	p.G320D	rs370769167	0,99	24,4
	X-2836181				c.T527A	p.M176K	rs73632975	0,25	20,3
	X-2836184				c.G524A	p.G175D	rs73632976	0,88	27,2
SLC25A5	X-118603742	Het	SNV	NM_001152	c.A230C	p.N77T	rs148294496	0,99	25,1
	X-118603747				c.A235T	p.I79F	rs141428607	0,83	25,7
	X-118603729				c.G217A	p.G73S	rs143413528	0,98	29,1

5. TARTIŞMA

Berrak hücreli renal hücreli karsinomlar tüm tümörlerin yaklaşık %3'ünü oluşturmaktadır. Bizim vaka serimizde tümör boyutu ile beklenildiği gibi patolojik evre ve metastaz açısından anlamlı farklılık izlendi. Erkek hastalarda kadınlara göre yüksek grade'li tümör görülmesi istatistiksel olarak anlamlı saptandı. Ayrıca patolojik evre arttıkça ve metastaz varlığında sağkalım oranları önemli derecede azalma gösterdi. Bu bulgular literatür ile uyumlu olup yüksek patolojik evre ve metastaz varlığı kötü sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (23). Teng ve ark. 378 hasta ile yaptığı çalışmada yüksek grade'li hastalarda sağkalım oranı düşük bulunurken bizim çalışmamızda grade ile sağkalım arasında ilişki saptanmadı (57). Bu durum fokal yüksek dereceli alanlar içerebilen RCC'lerde örneklemeyle ilgili gelişmiş olabilir. Aron ve ark. yaptığı bir çalışmada 35.336 hastadan oluşan olgu serisinde cinsiyetin RCC'ye etkisi araştırılmış ve erkeklerde daha büyük, daha yüksek evreli ve daha yüksek grade'li tümörler görülmüştür (58).

Literatürde ccRCC olgularında VHL mutasyonu veya metilasyonu vakaların yaklaşık %90'ında bulunan somatik bir olaydır. VHL mutasyonlarına yine kromozom 3'ün kısa kolunda bulunan BAP-1, PBRM-1, SETD2 mutasyonları eşlik edebilir.

IHC skorlamasındaki "altın standart", şimdiye kadar sadece 3 belirtecin değerlendirilmesi için tanımlanmıştır: Her2/neu, östrojen (ER) ve progesteron (PR) (59). Literatür taramasında immünohistokimyasal boyamayı yorumlamak için farklı kriterler kullanılmış olsa da PBRM-1, BAP-1 ve SETD-2 için çoğu makalede hesaplamalar, tümörleri negatife karşı pozitif veya düşük ve yüksek ekspresyona göre gruplandırarak yapılmıştır ve negatiflik için cut-off değeri %5 olarak kabul edilmiştir (60-62). Bu çalışmada 80 olguda yapılan immünohistokimyasal boyanmalar sonucunda 33 olguda PBRM-1 ile negatiflik saptandı. Bu oran olguların %41'ini oluşturmaktaydı. Ho ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 187 berrak hücreli karsinom vakasını çalışılan bir makalede 80 olguda negatiflik izlenmiş olup bu oran %43 olarak raporlanmıştır (63). Bu oran 2022 yılı DSÖ üriner ve erkek genital sistem kitabında yaklaşık %50 olarak belirtilmiştir (14). Literatür incelendiğinde PBRM-1'deki negatifliğin yapılan çalışmalarla benzer olduğu görülmüştür.

BAP-1 immünohistokimyasal incelemesinde 80 olgunun 14'ünde boyanma kaybı saptanmış olup vakaların %17,5'ini oluşturmaktadır. Pozitif ve negatif olgularla cinsiyet, tümör lokalizasyonu, patolojik evre, grade, tümör boyutu, yaş ve metastaz açısından anlamlı bir fark görülmemiştir. BAP-1 negatif vakalarda sağkalım daha düşük saptanmıştır. DSÖ üriner ve erkek genital sistem kitabında BAP-1 negatif tümörlerin oranı yaklaşık %15 olarak belirtmiştir (14). Joseph ve ark. yaptığı bir çalışmada BAP-1 negatif tümörlerin oranı %10,5 olarak bulunmuş, BAP1 negatif ve pozitif tümörü olan hastalar arasında yaş, cinsiyet açısından fark saptanmamıştır. BAP1-negatif olan tümörlerin daha büyük bir tümör boyutuna, TNM evresine, nükleer dereceye sahip oldukları görülmüştür (64). Literatür taramasında BAP-1 mutasyonlarının daha agresif seyrettiğine dair çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışma BAP1 mutasyonunun, PBRM1 mutasyonundan önemli ölçüde daha kötü bir genel sağkalım ile ilişkili olduğunu gösterdi (30). Kapur ve ark. yaptığı çalışmada BAP-1 negatif tümörü olan hastaların sağkalımında genel sağkalıma göre anlamlı derecede azalma saptandı (62). Bizim çalışmamızda da BAP-1 negatifliği ile genel sağkalım açısından literatür ile benzer bulgular mevcuttur. 2022 yılında yayınlanan bir derlemede BAP-1 kaybının kötü prognoz ile ilişkili olduğu söylenmiş olup BAP-1 kaybı ve PDL-1 ekspresyonu arasında ilişki olduğu, BAP-1 negatif ccRCC'lerin PDL-1 pozitif olma olasılığının daha yüksek olduğu belirtilmiştir (65). Bu durum BAP-1 negatif olgularda immünoterapinin tedavide kullanılması ile ilgili hastalar adına umut verici bir seçenektir.

Gad ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tümör evresi ile PBRM-1 negatifliği arasında ilişki saptanmıştır. PBRM-1 negatif tümörlerin daha yüksek evreye sahip olduğu ancak tümör grade'i ile ilişkili olmadığı saptanmıştır (66). Başka bir çalışmada PBRM-1 negatif olguların ileri yaş, artmış tümör boyutu, yüksek nükleer grade, ileri evre ve kötü genel sağkalım ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Yine bu çalışmada PBRM-1 negatifliğinin düşük evreli grupta kötü prognozu gösterdiği, sağkalım süresinde kısalmaya neden olduğu görülmüştür (67). Kim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada BAP1 ve PBRM1 kaybının herhangi bir prognostik rolü olmadığı gösterilmiştir. (68) Bizim çalışmamızda PBRM-1 negatifliği ile cinsiyet, tümör lokalizasyonu, evre, grade, tümör boyutu, yaş, metastaz ve sağkalım açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Çalışmaya dahil ettiğimiz olgulardan biri pT4 olmak üzere 28 hasta yüksek patolojik evrede saptanmıştır. Hasta dağılımındaki asimetrik dağılım istatistiksel sonucu etkileyen faktörlerden biri olabilir.

Kapur ve ark. yaptığı bir çalışmada tümörlerdeki BAP1 ve PBRM1 mutasyonlarının büyük ölçüde birbirini dışladığını ve PBRM1 kaybının değil BAP1 kaybının yüksek tümör derecesi ile ilişkili olduğu bulundu (69). Başka bir çalışmada BAP-1 mutasyonlu 24 numunenin sadece 3'ünde PBRM-1 mutasyonu saptanmıştır. BAP-1 ve PBRM-1 ters korelasyon göstermektedir. (48) Bihir ve ark. yaptığı çalışmada PBRM1 negatif tümörlerin %88'i BAP1 için de negatiftir ve birbirleri arasında korelasyon izlenmektedir (60). Peña-Llopis ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada PBRM1 ve SETD2'deki mutasyonların, tümörlerde beklenenden daha yüksek bir sıklıkta birlikte meydana geldiğini ve bu mutasyonların tümörjenezde işbirliği yapabileceğini göstermektedir (41). Bizim çalışmamızda BAP1 negatif 14 olgunun 10'unda PBRM-1 ile immünohistokimyasal olarak negatiflik saptandı, BAP-1 ile PBRM-1 arasında korelasyon mevcuttur. BAP-1/SETD-2, PBRM-1/SETD-2 arasında korelasyon izlenmedi. Çalışmamız bu mutasyonların birlikteliği ile ilgili literatürdeki farklı yorumlara katkı sağlayacaktır.

Olguların 38'inde SETD-2 ile immünohistokimyasal olarak negatiflik saptanmış olup oran %47,5'tir. DSÖ üriner ve erkek genital sistem kitabında bu oranı yaklaşık %20 olarak belirtmiştir (14). Çalışmamızda SETD2 negatifliğinin yüksek patolojik evre olgularda daha fazla olduğunu ve yüksek tümör boyutu ile de ilişkili olduğunu saptadık. SETD2 mutasyonu ile cinsiyet, tümör lokalizasyonu, grade, yaş, metastaz ve sağkalım açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bihir ve ark. yaptığı çalışmada SETD-2 negatifliği %47 oranında izlenmiş olup yüksek nükleer grade ve ileri tümör evresi ile yüksek oranda ilişkili bulunmuştur (60). Liu ve ark. yaptığı bir çalışmada SETD2 ekspresyonu düşük olan hastalar, büyük tümör boyutuna, ileri pT evresine ve kötü genel sağkalıma sahip olmaya eğilimli bulunmuştur (49). CcRCC hastalarında SETD-2 ile saptanan mutasyonların oranı literatürde oldukça geniş bir aralıkta saptanmıştır. Çalışmamız bu mutasyonun aydınlatılması adına literatüre katkı sağlayacaktır.

2012 yılında yapılan bir çalışmada 25 numune immünohistokimyasal olarak BAP-1 ile negatifti ve 22'sinde BAP1 mutasyonları vardı. Western blot ile bir IHK'sal olarak negatif ancak BAP1 wild tip örneğinin analizi, saptanabilir BAP1 proteinini ortaya çıkarmada başarısız oldu ve bu da BAP1'i etkisiz hale getirmek için başka mekanizmaların var olduğunu düşündürdü. Yine bu çalışmada 176 ccRCC olgusunda immünohistokimyasal olarak saptanan PBRM-1 negatif olguların yaklaşık %90'ında mutasyon izlenmiştir (48). Bizim çalışmamızda mutasyon analizi yapılan 12 olgunun

hiçbirinde BAP-1 ile immünohistokimyasal olarak kayıp saptanmadı. Bu olgularda ekzom sekanslama ile BAP-1 mutasyonu da görülmedi. 12 olgunun 5'inde PBRM-1 ile immünohistokimyasal olarak negatiflik saptandı fakat bu durum ekzom sekanslama ile doğrulanamadı. 12 olgunun hiçbirinde PBRM-1 mutasyonu saptanmadı. Yine 12 olgunun 6'sında SETD-2 ile immünohistokimyasal olarak negatiflik saptanmış olup ekzom sekanslama ile bu negatiflik doğrulanamamıştır. Bu durum genel olarak İHK ve mutasyon korelasyonunu değerlendirirken DNA dizisinde değişiklik oluşturmadan gen ifadesini değiştiren durumların, DNA dizisini değiştirip gen ifadesini değiştirmeyen durumların, DNA ve protein dizisini değiştirdiği halde ifade edilen protein seviyesini değiştirmeyen durumlar ve epigenetik faktörlerin ccRCC gelişimine neden olması açısından araştırılması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca olgulara ait DNA'nın tamamının FFPE dokulardan elde edilmesi, vakaların uzun süre arşivde parafin içinde bekletilmesi, dokuların laboratuvara geldikten sonra formaldehite maruz kalma sürelerinde uzama olması ihtimallerinden ötürü elde edilen DNA'da yapısal değişiklikler olması ihtimali de göz önünde bulundurulmalıdır. Yine olgu sayısının az olması da bu durumu etkileyen faktörlerden biri olabilir.

CcRCC'lerde intratümöral heterojenite oldukça fazladır. Yapılan bir çalışmada ccRCC olgusunda tümörün farklı yerlerinden alınan 9 örnekte mutasyonlar araştırılmıştır. Nefrektomi örneğinde tanımlanan somatik mutasyonların sadece %37'si tüm bölgelerde her yerde saptanabilmiştir (32). Çalışmamızda mutasyon analizi tümörden alınan tek örnek üzerinden yapılmıştır. Bu durumun intratümöral heterojenitesi fazla olan ccRCC'de mutasyonların saptanmasını zorlaştırdığı söylenebilir.

VHL geni hem mutasyon hem de hipermetilasyon ile inaktive olabilir. Nickerson ve ark. yaptığı bir çalışmada 205 ccRCC olgusunun %82,4'ünde somatik mutasyon, %8,3 ünde hipermetilasyon saptanmıştır. Hipermetile olan olguların hepsinin mutasyon negatif olduğu kanıtlanmıştır (70). Başka bir çalışmada DNA hipometilasyonunun SETD-2 ile ilişkili olduğu bulunmuştur (27). Bizim çalışmamızda immünohistokimyasal olarak PBRM-1 negatif 5 olguda ve SETD-2 negatif 6 olguda promoter metilasyon analizi yapılamadığından ileri yorum yapılamamıştır.

Ekzom sekanslama ile 7 olguda ARSD geninde, 9 olguda SLC25A5 geninde SNP mutasyonlar saptanmıştır.

ARSD (Arilsülfataz D), sülfataz gen kümesi içinde Xp22.3'te bulunur (71). ARSD geni tarafından kodlanan protein, iskelet ve kıkırdak büyümesi için gerekli bir element olan sülfataz ailesinin bir üyesidir. Bu proteinin yüksek ekspresyonunun sfingolipid-lipid metabolizması ile ilişkili olduğu ve kronik lenfositik lösemi ve akut myeloid lösemi gelişimi ile ilişkili olabileceğine dair çalışmalar vardır (72). Yine başka bir çalışmada luminal alt tip meme kanserinin üçlü negatif meme kanserinden önemli ölçüde daha yüksek ARSD ekspresyonuna sahip olduğunu ve ARSD ekspresyonunun meme kanseri hastalarında klinik sonuçlarla yüksek oranda korele olduğu bulunmuştur (71). Literatürde ARSD geni ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlı olup ccRCC'lerde ARSD geni ile ilgili bir çalışma saptanmadı. Çalışmamızda 12 olgunun 7'sinde mutasyon saptanması bu genin büyük vaka gruplarında ccRCC ile ilişkisini araştırmaya değer bulmuştur.

SLC25A5 X kromozomu üzerinde yer alan çözünen taşıyıcı protein genlerinin mitokondriyal taşıyıcı alt ailesinin bir üyesidir. Bu genin ürünü, ADP'yi sitoplazmadan mitokondriyal matrikse ve ATP'yi mitokondriyal matriksten sitoplazmaya aktaran kapılı bir gözenek olarak işlev görür. Protein, iç mitokondri zarına gömülü bir homodimer oluşturur. Bu genin bastırılmış ifadesinin apoptozu indüklediği ve tümör büyümesini engellediği gösterilmiştir (73). Çeşitli kanser hücrelerinde SLC taşıyıcılarının farklı ekspresyonunun iyi anlaşılması, kanser tedavisi için yeni stratejilerin geliştirilmesi için bir temel sağlayabilir. Kang ve ark. yaptığı bir çalışmada SLC ailesinin berrak hücreli renal hücreli karsinomlarda prognostik önemi olduğu bulunmuştur (74). SLC ailesinin birçok üyesi vardır. Bu üyelerden biri olan SLC25A5 bizim çalışmamızda 12 olgunun 9'unda mutasyon göstermiştir. Bu durum ccRCC'lerde bu geni araştırmaya değer kılmaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Berrak hücreli renal hücreli karsinomlarda artmış tümör boyutu yüksek evre ve metastaz ile ilişkili bulundu. Evre arttıkça sağkalım oranı düşerken metastatik olgularda da sağkalım belirgin derecede düşük saptandı. Erkek hastalarda yüksek grade'li tümörlerin oranı kadınlara göre anlamlı derecede daha fazla izlendi.
- PBRM-1 ve BAP-1 ile immünohistokimyasal olarak boyanma kaybı literatür ile uyumlu şekilde sırasıyla %41 ve %17,5 olarak bulundu.
- SETD-2 ile boyanma kaybı literatürde farklılıklar göstermekte olup bizim serimizde %47,5 olarak saptandı.
- PBRM-1 ve BAP-1 ile cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, evre, grade, metastaz arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.
- PBRM-1 ile sağkalım arasında ilişki izlenmezken BAP-1 negatifliği kötü genel sağkalım ile ilişkili bulundu.
- SETD-2 negatifliği ile ileri evre ve tümör boyutu arasında korelasyon saptandı; cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, grade, metastaz, sağkalım arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.
- PBRM-1 ve BAP-1 negatifliğinin birlikteliği anlamlı bulundu; PBRM1/SETD2, BAP1/SETD2 birlikteliği istatistiksel olarak anlamlı değildi.
- Ekzom sekanslama işlemi ile 12 olgunun hiçbirinde VHL, PBRM-1, BAP-1, SETD-2 için anlamlı mutasyon saptanmadı.
- Ekzom sekanslama yapılan olguların hiçbirinde BAP-1 ile de immünohistokimyasal olarak boyanma kaybı görülmezken PBRM-1 ile 5 olguda, SETD-2 ile 6 olguda boyanma kaybı izlendi.
- Ekzom sekanslama ile 7 olguda ARSD, 9 olguda SLC25A5 geninde SNP mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonların büyük vaka kohortunda

araştırılması ccRCC'nin moleküler mekanizmasını aydınlatmak adına katkı sağlayacaktır.

- Ekzom sekanslama için sayıca daha fazla hastada araştırma yapmak ve mutasyon saptanmayıp immünohistokimyasal olarak negatif olgularda promotor metilasyonu bakmak çalışmaların güvenli sonuç vermesi adına daha uygun olacaktır.
- Yapılan çalışmalarda tümörün farklı alanlarından daha çok örnekleme yapılarak mutasyon saptanma ihtimali artırılabilir. İntratümöral heterojenite klinisyenler açısından mutasyon odaklı ilaç kullanımını da etkileyen bir durumdur. CcRCC olgularında terapötik yaklaşımlara faydalı olmak adına intratümöral heterojenite göz önünde bulundurulmalıdır.
- Formaldehit fiksasyonu ile akıllarda soru işareti kalmaması adına DNA izolasyonunun taze dokulardan yapılması daha sağlıklı sonuç verecektir.

KAYNAKLAR

1. Mills SE. Histology for pathologists. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health - Lippincott Williams&Wilkins;2012.
2. Sadler ve Langman- Langman's medical embryology.pdf. 2012
3. Keith L. Moore, T.V.N. Persaud, Mark G. Torchia; eds; Sevda Müftüoğlu, Figen Kaymaz, Pergin Atilla. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri / Before We Are Born. 7. bs.
4. Wolters Kluwer; Heptinstall's pathology of the kidney. 7th ed. Philadelphia: 2015.
5. Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM, Gray H. Gray's Anatomy for students. 4th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2010. 1103 s.
6. Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM, Gray H. Grays Anatomy for Students With Student Consult Online Access, 2e.pdf.
7. Cheng L, MacLennan GT, Bostwick DG, eds. Urologic surgical pathology. Fourth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020. 965 s.
8. Junqueira LCU, Carneiro J, Aytekin Y, Solakoglu S. Temel histoloji: Konu & Atlas. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri; 2009.
9. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, vd. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.
10. 2017 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri, <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2017-turkiye-kanser-i-istatistikleri.html> (30 Ocak 2022).
11. Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer, eds. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: International agency for research on cancer; 2016. (World health organization classification of tumours).
12. Habib SL, Prihoda TJ, Luna M, Werner SA. Diabetes and Risk of Renal Cell Carcinoma. J Cancer. 24 December 2011; 3:42-8.

13. Lindblad P, Chow WH, Chan J, Bergström A, Wolk A, Gridley G, vd. The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia*. Ocak 1999;42(1):107-12.
14. World Health Organization, *Urinary and Male Genital Tumours s.1*, 2022
15. Warren AY, Harrison D. WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World J Urol*. 2018;36(12):1913-26.
16. Delahunt B, Sika-Paotonu D, Bethwaite PB, William Jordan T, Magi-Galluzzi C, Zhou M, vd. Grading of clear cell renal cell carcinoma should be based on nucleolar prominence. *Am J Surg Pathol*. August 2011;35(8):1134-9.
17. Sika-Paotonu D, Bethwaite PB, McCredie MRE, William Jordan T, Delahunt B. Nucleolar grade but not Fuhrman grade is applicable to papillary renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. September 2006;30(9):1091-6.
18. Swami U, Nussenzveig RH, Haaland B, Agarwal N. Revisiting AJCC TNM staging for renal cell carcinoma: quest for improvement. *Ann Transl Med*. March 2019;7(Suppl 1): S18.
19. Billia M, Volpe A, Terrone C. The current TNM staging system of renal cell carcinoma: are further improvements needed? *Arch Esp Urol*. December 2011;64(10):929-37.
20. Lam JS, Klatte T, Breda A. Staging of renal cell carcinoma: Current concepts. *Indian J Urol IJU J Urol Soc India*. 2009;25(4):446-54.
21. Karakiewicz PI, Briganti A, Chun FKH, Trinh QD, Perrotte P, Ficarra V, vd. Multi-institutional validation of a new renal cancer-specific survival nomogram. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 April 2007;25(11):1316-22.
22. Sorbellini M, Kattan MW, Snyder ME, Reuter V, Motzer R, Goetzl M, vd. A postoperative prognostic nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma. *J Urol*. January 2005;173(1):48-51.
23. Volpe A, Patard JJ. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol*. June 2010;28(3):319-27.

24. Wallace AC, Nairn RC. Renal tubular antigens in kidney tumors. *Cancer*. 1972;29(4):977-81.
25. Frew IJ, Moch H. A clearer view of the molecular complexity of clear cell renal cell carcinoma. *Annu Rev Pathol*. 2015; 10:263-89.
26. Divatia MK, Ozcan A, Guo C, Charles C, Ro JY. *Kidney Cancer Recent Advances in Surgical and Molecular Pathology* Cham: Springer International Publishing; 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-28333-9>
27. Creighton CJ, Morgan M, Gunaratne PH, Wheeler DA, Gibbs RA, Gordon Robertson A, vd. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. July 2013;499(7456):43-9.
28. Chen M, Ye Y, Yang H, Tamboli P, Matin S, Tannir NM, vd. Genome-wide profiling of chromosomal alterations in renal cell carcinoma using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *Int J Cancer J Int Cancer*. 15 November 2009;125(10):2342-8.
29. Brugarolas J. Molecular genetics of clear-cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 July 2014;32(18):1968-76.
30. Brugarolas J. PBRM1 and BAP1 as novel targets for renal cell carcinoma. *Cancer J Sudbury Mass*. August 2013;19(4):324-32.
31. Gossage L, Murtaza M, Slatter AF, Lichtenstein CP, Warren A, Haynes B, vd. Clinical and pathological impact of VHL, PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A, and JARID1c in clear cell renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(1):38-51.
32. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, vd. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med*. 08 March 2012;366(10):883-92.
33. Shen C, Kaelin WG. The VHL/HIF Axis in Clear Cell Renal Carcinoma. *Semin Cancer Biol*. February 2013;23(1):18-25.
34. Riazalhosseini Y, Lathrop M. Precision medicine from the renal cancer genome. *Nat Rev Nephrol*. November 2016;12(11):655-66.

35. Nargund AM, Pham CG, Dong Y, Wang PI, Osmangeyoglu HU, Xie Y, vd. The SWI/SNF Protein PBRM1 Restrains VHL Loss-Driven Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep.* 21 March 2017;18(12):2893-906.
36. Pawłowski R, Mühl SM, Sulser T, Krek W, Moch H, Schraml P. Loss of PBRM1 expression is associated with renal cell carcinoma progression. *Int J Cancer.* 2013;132(2): E11-7.
37. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol.* 14 Nisan 2014; 4:64
38. Guo H, German P, Bai S, Barnes S, Guo W, Qi X, vd. The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *J Genet Genomics.* 20 July 2015;42(7):343-53.
39. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2011;4:51.
40. Fan D, Liu Q, Wu F, Liu N, Qu H, Yuan Y, vd. Prognostic significance of PI3K/AKT/ mTOR signaling pathway members in clear cell renal cell carcinoma. *PeerJ.* 01 June 2020;8: e9261.
41. Peña-Llopis S, Christie A, Xie XJ, Brugarolas J. Cooperation and antagonism among cancer genes: the renal cancer paradigm. *Cancer Res.* 15 July 2013;73(14):4173-9.
42. Carril-Ajuria L, Santos M, Roldán-Romero JM, Rodríguez-Antona C, de Velasco G. Prognostic and Predictive Value of PBRM1 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancers.* 19 December 2019;12(1):16.
43. Clapier CR, Cairns BR. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78:273-304.
44. Wilson BG, Roberts CWM. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer.* 09 Haziran 2011;11(7):481-92.
45. Liu XD, Kong W, Peterson CB, McGrail DJ, Hoang A, Zhang X, vd. PBRM1 loss defines a nonimmunogenic tumor phenotype associated with checkpoint inhibitor resistance in renal carcinoma. *Nat Commun.* 01 May 2020;11(1):2135.

46. Casuscelli J, Vano YA, Fridman WH, Hsieh JJ. Molecular Classification of Renal Cell Carcinoma and Its Implication in Future Clinical Practice. *Kidney Cancer*. 01 January 2017;1(1):3-13.
47. Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and Cancer. *Nat Rev Cancer*. March 2013;13(3):153-9.
48. Peña-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, Leng N, Pavía-Jiménez A, Wang S, vd. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet*. 10 June 2012;44(7):751-9.
49. Liu W, Fu Q, An H, Chang Y, Zhang W, Zhu Y, vd. Decreased Expression of SETD2 Predicts Unfavorable Prognosis in Patients With Nonmetastatic Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 13 November 2015;94(45): e2004.
50. Hakimi AA, Ostrovnaya I, Reva B, Schultz N, Chen YB, Gonen M, vd. Adverse Outcomes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma with Mutations of 3p21 Epigenetic Regulators BAP1 and SETD2: a Report by MSKCC and the KIRC TCGA Research Network. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 June 2013;19(12):3259-67.
51. González-Rodríguez P, Engskog-Vlachos P, Zhang H, Murgoci AN, Zerdes I, Joseph B. SETD2 mutation in renal clear cell carcinoma suppress autophagy via regulation of ATG12. *Cell Death Dis*. 27 January 2020;11(1):69.
52. Xiang W, He J, Huang C, Chen L, Tao D, Wu X, vd. miR-106b-5p targets tumor suppressor gene SETD2 to inactive its function in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 24 February 2015;6(6):4066-79.
53. Sadioğlu A. Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında yeni kuşak DNA dizi belirlenimi (next generation sequencing – NGS) yöntemi ile kanser hücrelerindeki dna değişikliklerinin saptanması, dökümlenmesi ve klinikopatolojik veriler ile karşılaştırılması, Tıp fakültesi, Tıbbi patoloji anabilim dalı, Tıpta uzmanlık tezi, Ankara: Gazi üniversitesi, 2020.
54. Singleton AB. Exome sequencing: a transformative technology. *Lancet Neurol*. 01 October 2011;10(10):942-6.

55. Bartlett JMS, Shaaban A, Schmitt F, editörler. Molecular pathology: a practical guide for the surgical pathologist and cytopathologist. Cambridge: Cambridge University Press; 2015. 396 s.
56. Deans ZC, Costa JL, Cree I, Dequeker E, Edsjö A, Henderson S, vd. Integration of next-generation sequencing in clinical diagnostic molecular pathology laboratories for analysis of solid tumours; an expert opinion on behalf of IQN Path ASBL. *Virchows Arch.* 2017;470(1):5-20.
57. Teng J, Gao Y, Chen M, Wang K, Cui X, Liu Y, vd. Prognostic value of clinical and pathological factors for surgically treated localized clear cell renal cell carcinoma. *Chin Med J (Engl).* 05 May 2014;127(9):1640-4.
58. Aron M, Nguyen MM, Stein RJ, Gill IS. Impact of Gender in Renal Cell Carcinoma: An Analysis of the SEER Database. *Eur Urol.* 01 June 2008;54(1):133-42.
59. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagn Pathol.* 29 November 2014; 9:221.
60. Bihl S, Ohashi R, Moore AL, Rüschoff JH, Beisel C, Hermanns T, vd. Expression and Mutation Patterns of PBRM1, BAP1 and SETD2 Mirror Specific Evolutionary Subtypes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Neoplasia.* 01 February 2019;21(2):247-56.
61. Joseph RW, Kapur P, Serie DJ, Parasramka M, Ho TH, Cheville JC, vd. Clear Cell Renal Cell Carcinoma Subtypes Identified by BAP1 and PBRM1 Expression. *J Urol.* 01 January 2016;195(1):180-7.
62. Kapur P, Christie A, Raman JD, Then MT, Nuhn P, Buchner A, vd. BAP1 Immunohistochemistry Predicts Outcomes in a Multi-Institutional Cohort with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Urol.* March 2014;191(3):603-10.
63. Ho TH, Kapur P, Joseph RW, Serie DJ, Eckel-Passow JE, Parasramka M, vd. Loss of PBRM1 and BAP1 expression is less common in non-clear cell renal cell carcinoma than in clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 01 January 2015;33(1):23.e9-23.e14.

64. Joseph RW, Kapur P, Serie DJ, Eckel-Passow JE, Parasramka M, Ho T, vd. Loss of BAP1 protein expression is an independent marker of poor prognosis in patients with low-risk clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2014;120(7):1059-67.
65. Kapur P, Rajaram S, Brugarolas J. The expanding role of BAP1 in clear cell renal cell carcinoma. *Hum Pathol*. 03 August 2022; S0046-8177(22)00206-4.
66. Gad S, Le Teuff G, Nguyen B, Verkarre V, Duchatelle V, Molinie V, vd. Involvement of PBRM1 in VHL disease-associated clear cell renal cell carcinoma and its putative relationship with the HIF pathway. *Oncol Lett*. December 2021;22(6):835.
67. Nam SJ, Lee C, Park JH, Moon KC. Decreased PBRM1 expression predicts unfavorable prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 01 August 2015;33(8): 340.e9-340.e16.
68. Kim SH, Park WS, Park EY, Park B, Joo J, Joung JY, vd. The prognostic value of BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, and Ki-67 tissue markers in localized renal cell carcinoma: A retrospective study of tissue microarrays using immunohistochemistry. *PLOS ONE*. 27 June 2017;12(6): e0179610.
69. Kapur P, Peña-Llopis S, Christie A, Zhrebker L, Pavía-Jiménez A, Rathmell WK, vd. Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: a retrospective analysis with independent validation. *Lancet Oncol*. 01 February 2013;14(2):159-67.
70. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, vd. Improved Identification of von Hippel-Lindau Gene Alterations in Clear Cell Renal Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 01 August 2008;14 (15): 4726-34.
71. Lin Y, Li C, Xiong W, Fan L, Pan H, Li Y. ARSD, a novel ER α downstream target gene, inhibits proliferation and migration of breast cancer cells via activating Hippo/YAP pathway. *Cell Death Dis*. 02 November 2021;12(11):1-14.

72. Trojani A, Di Camillo B, Tedeschi A, Lodola M, Montesano S, Ricci F, vd. Gene expression profiling identifies ARSD as a new marker of disease progression and the sphingolipid metabolism as a potential novel metabolism in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Biomark*. 01 January 2011;11(1):15-28.
73. SLC25A5 solute carrier family 25 member 5 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/292>.
74. Kang W, Zhang M, Wang Q, Gu D, Huang Z, Wang H, vd. The SLC Family Are Candidate Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *BioMed Res Int*. 02 May 2020;2020: e1932948.



EKLER

EK-1. Ekzom Sekanslama İşlemi Öncesi Elde Edilen DNA Miktarları

No.	Örnek	Kütüphane	NükleikAsidID	Kons(ng/µl)	Vol.(µl)	Amt.(µg)	Conclusion	Not
1	MA1	WES	A1:SampA1	85.368	30	2.56104	D	Severelydegraded
2	MA2	WES	A2:SampA2	132.749	30	3.98247	D	Severelydegraded
3	MA3	WES	A3:SampA3	63.716	30	1.91148	D	Severelydegraded
4	MA4	WES	A4:SampA4	41.342	9	0.37208	D	Severelydegraded
5	MA5	WES	A5:SampA5	107.696	30	3.23088	D	Severelydegraded
6	MA6	WES	A6:SampA6	96.626	30	2.89878	D	Severelydegraded
7	MA7	WES	A7:SampA7	67.38	30	2.0214	D	Severelydegraded
8	MA8	WES	A8:SampA8	111.755	30	3.35265	D	Severelydegraded
9	MA9	WES	A9:SampA9	73.196	30	2.19588	D	Severelydegraded
10	MA10	WES	A10:SampA1	117.414	30	3.52242	D	Severelydegraded
11	MA11	WES	A11:SampA1	103.022	30	3.09066	D	Severelydegraded
12	MA12	WES	A12:SampA1	73.581	30	2.20743	A	None
13	MAY1	WES	B1:SampB1	84.392	30	2.53176	D	Severelydegraded
14	MAY2	WES	B2:SampB2	63.183	30	1.89549	D	Severelydegraded

EK-2. Ekzom Sekanslama Analizi Sonrası Veri Üretiminin İstatistiksel Sonuçları, Sıralamadan Sonra, Ham Okumalar Filtrelendi. Veri Filtreleme, Adaptör Dizilerini Kaldırma, Kontaminasyonu ve Ham Okumalardan Düşük Kaliteli Okumaları İçerir. *2 Olgu Yedek Olarak Kullanıldı

Örnek	Kütüphane	Ham Okumalar	Temizlenmiş okumalar	Ham base (G)	Temiz Base (G)	Efektif oran(%)	Hata oranı (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC İçeren (%)
MA4	FDHE22H001534-1a-7UDI1215-5UDI1215	11,822,602	10,059,242	3.55	3.02	85.08	0.03	97.00	91.91	52.36
MA6	FDHE22H001534-1a-7UDI1216-5UDI1216	19,754,991	18,943,911	5.93	5.68	95.89	0.03	96.73	91.36	54.23
MAY1	FDHE22H001534-1a-7UDI1226-5UDI1226	23,147,151	22,091,895	6.94	6.63	95.44	0.03	96.69	91.28	54.38
MAY2	FDHE22H001534-1a-7UDI1227-5UDI1227	18,410,987	16,844,123	5.52	5.05	91.49	0.03	96.74	91.44	54.54
MA1	FDHE22H001535-1a-7UDI1211-5UDI1211	15,054,553	14,661,471	4.52	4.40	97.39	0.03	96.31	90.55	54.57
MA3	FDHE22H001535-1a-7UDI1214-5UDI1214	19,407,490	18,684,291	5.82	5.61	96.27	0.03	96.72	91.38	55.31
MA9	FDHE22H001535-1a-7UDI1222-5UDI1222	15,082,546	14,135,329	4.52	4.24	93.72	0.03	96.67	91.33	53.81
MA10	FDHE22H001535-1a-7UDI1223-5UDI1223	29,721,606	28,355,130	8.92	8.51	95.40	0.03	96.75	91.45	54.55
MA2	FDHE22H001536-1a-7UDI1212-5UDI1212	17,941,338	17,064,653	5.38	5.12	95.11	0.03	96.48	91.03	53.52
MA8	FDHE22H001536-1a-7UDI1217-5UDI1217	24,623,277	24,017,769	7.39	7.21	97.54	0.03	96.48	90.97	52.78
MA11	FDHE22H001536-1a-7UDI1224-5UDI1224	17,183,121	16,428,698	5.15	4.93	95.61	0.03	96.22	90.45	53.93
MA12	FDHE22H001536-1a-7UDI1225-5UDI1225	28,013,012	26,924,527	8.40	8.08	96.11	0.03	96.76	91.51	51.42

EK-3. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen VHL Geni İndel Varyantları

Kromozom	Pozisyon	Tip	Referans	Allel	Zigozite	Gen	rsNum	Transkript ID, Aminoasitve Nükleotit Değişimleri
3	10184025^10184026	Insertion	-	-	Het	VHL		
3	10184025^10184026	Insertion	-	TTT	Het	VHL		
3	10170128..10170130	Deletion	AAG	-	Hom	BRK1x3bVHL		
3	10183869..10183871	MNV	GAG	GAG	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon1:c.338_340del;p.G114del, VHL: NM_198156:exon1:c.338_340del;p.R113_V114delinsL
3	10183869..10183871	Deletion	GAG	-	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon1:c.338_340del;p.G114del, VHL:NM_198156:exon1:c.338_340del;p.R113_V114delinsL
3	10183874..10183879	MNV	ACGGGC	ACGGGC	Het	VHL		
3	10183874..10183879	Deletion	ACGGGC	-	Het	VHL		
3	10188011	Deletion	C	-	Hom	VHL	rs35286098	
3	10188011	Deletion	C	-	Hom	VHL	rs35286098	
3	10188214..10188215	MNV	CA	CA	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon2:c.357_358del;p.F119Lfs*12
3	10188214..10188215	Deletion	CA	-	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon2:c.357_358del;p.F119Lfs*12
3	10188275..10188279	MNV	CTCAA	CTCAA	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon2:c.418_422del;p.L140Cfs*2
3	10188275..10188279	Deletion	CTCAA	-	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon2:c.418_422del;p.L140Cfs*2
3	10188011	SNV	C	C	Het	VHL	rs35286098	
3	10188011	Deletion	C	-	Het	VHL	rs35286098	
3	10188011	Deletion	C	-	Hom	VHL	rs35286098	
3	10183858^10183859	Insertion	-	-	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon1:c.327_328insCACAC:p.S111Tfs*22, VHL:NM_198156:exon1:c.327_328insCACAC:p.S111Tfs*23
3	10183858^10183859	Insertion	-	CACA	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon1:c.327_328insCACAC:p.S111Tfs*22, VHL:NM_198156:exon1:c.327_328insCACAC:p.S111Tfs*23
3	10184025^10184026	Insertion	-	-	Het	VHL		
3	10184025^10184026	Insertion	-	TTT	Het	VHL		
3	10183853..10183854	MNV	CG	CG	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon1:c.322_323del;p.R108Hfs*23, VHL:NM_198156:exon1:c.322_323del;p.R108Hfs*24
3	10183853..10183854	Deletion	CG	-	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon1:c.322_323del;p.R108Hfs*23, VHL:NM_198156:exon1:c.322_323del;p.R108Hfs*24
3	10184026	Deletion	T	-	Hom	VHL		
3	10188011	SNV	C	C	Het	VHL	rs35286098	

3	10188011	Deletion	C	-	Het	VHL	rs35286098
3	10189787^10189788	Insertion	-	-	Het	VHL	
3	10189787^10189788	Insertion	-	A	Het	VHL	
3	10188011	Deletion	C	-	Hom	VHL	rs35286098
3	10186180^10186181	Insertion	-	-	Het	VHL	rs34512214
3	10186180^10186181	Insertion	-	T	Het	VHL	rs34512214
3	10188011	Deletion	C	-	Hom	VHL	rs35286098
3	10189787^10189788	Insertion	-	-	Het	VHL	
3	10189787^10189788	Insertion	-	A	Het	VHL	

EK-4. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen VHL Geninin SNP'leri

Kromozom	Pozisyon	Tip	Referans	Allel	Zigozite	Gen	rsNum	Transkript ID, Aminoasitve Nükleotit Değişimleri
3	10186447	SNV	A	T	Hom	VHL	rs1678593	
3	10186514	SNV	T	A	Hom	VHL	rs779811	
3	10188428	SNV	T	G	Hom	VHL	rs1678607	
3	10191491	SNV	T	T	Het	VHL		VHL:NM_198156:exon2:c.T361A;p.C121S, VHL:NM_000551:exon3:c.T484A;p.C162S
3	10191493	SNV	C	C	Het	VHL		VHL:NM_198156:exon2:c.C363A;p.C121X, VHL:NM_000551:exon3:c.C486A;p.C162X
3	10191943	SNV	G	A	Hom	VHL	rs1642742	
3	10188428	SNV	T	G	Het	VHL	rs1678607	
3	10191943	SNV	G	A	Het	VHL	rs1642742	
3	10181399	SNV	C	T	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10191495	SNV	T	T	Het	VHL		VHL:NM_198156:exon2:c.T365C;p.L122P;VHL: NM_000551:exon3:c.T488C;p.L163P
3	10186199	SNV	G	G	Het	VHL		
3	10188245	SNV	G	G	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon2:c.G388C;p.V130L
3	10183002	SNV	G	C	Hom	VHL	rs10433558	
3	10170079	SNV	T	C	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10170082	SNV	T	G	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10170083	SNV	A	T	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10170092	SNV	A	G	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10170107	SNV	A	C	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10188217	SNV	A	A	Het	VHL		VHL:NM_000551:exon2:c.A360T;p.R120S
3	10195067	SNV	C	A	Hom	VHL		NM_000551:c.*3418C>A x3bNM_198156:c.*3418C>A
3	10200032	SNV	C	T	Hom	VHL x3bIRAK2		
3	10186414	SNV	C	T	Hom	VHL		
3	10187171	SNV	T	C	Hom	VHL	rs374645	
3	10172744	SNV	G	A	Hom	BRK1 x3bVHL	rs67227131	
3	10174830	SNV	C	A	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10174836	SNV	C	A	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10174845	SNV	C	T	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10174846	SNV	A	G	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10174851	SNV	T	A	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10174856	SNV	T	A	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10174858	SNV	C	T	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10174860	SNV	T	A	Hom	BRK1 x3bVHL		

3	10187014	SNV	A	G	Hom	VHL	rs779812	
3	10189929	SNV	T	C	Hom	VHL	rs1681660	
3	10174775	SNV	A	G	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10174777	SNV	C	G	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10174779	SNV	A	C	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10174792	SNV	A	G	Hom	BRK1 x3bVHL		
3	10203190	SNV	A	T	Hom	VHL x3bIRAK2		
3	10205253	SNV	T	C	Hom	VHL x3bIRAK2		
3	10191219	SNV	C	G	Hom	VHL		
3	10180557	SNV	G	A	Hom	BRK1 x3bVHL	rs776517	

EK-5. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen BAP1 SNP'leri. **BAP 1 Genine Ait İndel Varyant Görülmemiştir.

Kromozom	Pozisyon	Tip	Referans	Allel	Zigozite	Gen	rsNum.	Transkript ID, Aminoasitve Nükleotit Değişimleri
3	52442724	SNV	G	G	Het	BAP1	rs116234404	
3	52443739	SNV	C	C	Het	BAP1		BAP1:NM_004656:exon2:c.G58T:p.E20X
3	52442354	SNV	G	G	Het	BAP1	rs123602	
3	52442724	SNV	G	G	Het	BAP1	rs116234404	
3	52442240	SNV	T	T	Het	BAP1	rs187250016	
3	52439468	SNV	A	T	Hom	BAP1		
3	52442354	SNV	G	C	Hom	BAP1	rs123602	

EK-6. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen PBRM1 SNP'leri

Kromozom	Pozisyon	Tip	Referans	Allel	Zigozite	Gen	rsNum	Transkript ID, Aminoasitve Nükleotit Değişimleri
3	52584715	SNV	A	G	Hom	PBRM1	rs2878628	
3	52584715	SNV	A	A	Het	PBRM1	rs2878628	
3	52584787	SNV	T	T	Het	PBRM1	rs2251219	PBRM1:NM_001350075:exon28:c.A4491G;p.P1497P, PBRM1:NM_018313:exon28:c.A4335G;p.P1445P, PBRM1:NM_181042:exon28:c.A4335G;p.P1445P, PBRM1:NM_001350079:exon29:c.A4323G;p.P1441P, PBRM1:NM_001350074:exon30:c.A4443G;p.P1481P, PBRM1:NM_001350076:exon30:c.A4440G;p.P1480P, PBRM1:NM_001350078:exon30:c.A4443G;p.P1481P, PBRM1:NM_001350077:exon31:c.A4434G;p.P1478P
3	52587921	SNV	G	A	Hom	PBRM1		
3	52588655	SNV	G	A	Hom	PBRM1	rs2336142	
3	52588655	SNV	G	G	Het	PBRM1	rs2336142	
3	52596133	SNV	T	T	Het	PBRM1		
3	52597324	SNV	T	T	Het	PBRM1		PBRM1:NM_001350075:exon25:c.A4061C;p.D1354A;PBRM1:NM_181042:exon26:c.A4061C;p.D1354A, PBRM1:NM_001350079:exon27:c.A4049C;p.D1350A;PBRM1:NM_001350074:exon28:c.A4169C;p.D1390A, PBRM1:NM_001350076:exon28:c.A4166C;p.D1389A;PBRM1:NM_001350078:exon28:c.A4169C;p.D1390A, PBRM1:NM_001350077:exon29:c.A4160C;p.D1387A
3	52602013	SNV	A	G	Hom	PBRM1		
3	52602026	SNV	G	C	Hom	PBRM1		
3	52602035	SNV	C	G	Hom	PBRM1		
3	52602041	SNV	T	C	Hom	PBRM1		
3	52605005	SNV	T	C	Hom	PBRM1	rs6788887	
3	52605447	SNV	T	G	Hom	PBRM1		
3	52605460	SNV	G	A	Hom	PBRM1		
3	52605470	SNV	C	T	Hom	PBRM1		
3	52605474	SNV	T	A	Hom	PBRM1		
3	52610415	SNV	T	C	Hom	PBRM1	rs7652191	
3	52610415	SNV	T	T	Het	PBRM1	rs7652191	
3	52610513	SNV	T	T	Het	PBRM1	rs2028220	
3	52610651	SNV	T	T	Het	PBRM1	rs17264436	PBRM1:NM_001350075:exon23:c.A3597T;p.P1199P, PBRM1:NM_018313:exon23:c.A3522T;p.P1174P, PBRM1:NM_181042:exon24:c.A3597T;p.P1199P;PBRM1:NM_001350079:exon25:c.A3585T;p.P1195P,

3	52616930	SNV	G	T	Hom	PBRM1		PBRM1:NM_001350074:exon26:c.A3705T;p.P1235P,PBRM1:NM_001350076:exon26:c.A3702T;p.P1234P, PBRM1:NM_001350078:exon26:c.A3705T;p.P1235P,PBRM1:NM_001350077:exon27:c.A3696T;p.P1232P
3	52620441	SNV	C	C	Het	PBRM1		PBRM1:NM_001350075:exon21:c.G3387C;p.K1129N,PBRM1:NM_018313:exon17:c.G3312C;p.K1104N, PBRM1:NM_181042:exon22:c.G3387C;p.K1129N,PBRM1:NM_001350079:exon23:c.G3375C;p.K1125N, PBRM1:NM_001350074:exon24:c.G3495C;p.K1165N,PBRM1:NM_001350076:exon24:c.G3492C;p.K1164N, PBRM1:NM_001350078:exon24:c.G3495C;p.K1165N,PBRM1:NM_001350077:exon25:c.G3486C;p.K1162N
3	52620745	SNV	G	G	Het	PBRM1	rs80314598	
3	52621627	SNV	C	C	Het	PBRM1	rs3733046	
3	52621627	SNV	C	T	Hom	PBRM1	rs3733046	
3	52633765	SNV	G	A	Hom	PBRM1		
3	52635829	SNV	G	G	Het	PBRM1	rs115464407	
3	52643307	SNV	A	G	Hom	PBRM1	rs3733045	
3	52643307	SNV	A	A	Het	PBRM1	rs3733045	
3	52643685	SNV	T	T	Het	PBRM1	rs3755806	PBRM1:NM_001350075:exon17:c.A2211G;p.T737T,PBRM1:NM_018313:exon17:c.A2211G;p.T737T, PBRM1:NM_181042:exon18:c.A2211G;p.T737T,PBRM1:NM_001350079:exon19:c.A2274G;p.T758T, PBRM1:NM_001350074:exon20:c.A2319G;p.T773T,PBRM1:NM_001350076:exon20:c.A2319G;p.T773T, PBRM1:NM_001350078:exon20:c.A2319G;p.T773T,PBRM1:NM_001350077:exon21:c.A2310G;p.T770T
3	52643846	SNV	A	A	Het	PBRM1		PBRM1:NM_001350075:exon17:c.T2050A;p.F684I,PBRM1:NM_018313:exon17:c.T2050A;p.F684I, PBRM1:NM_181042:exon18:c.T2050A;p.F684I,PBRM1:NM_001350079:exon19:c.T2113A;p.F705I, PBRM1:NM_001350074:exon20:c.T2158A;p.F720I,PBRM1:NM_001350076:exon20:c.T2158A;p.F720I, PBRM1:NM_001350078:exon20:c.T2158A;p.F720I, PBRM1:NM_001350077:exon21:c.T2149A;p.F717I
3	52646041	SNV	C	T	Hom	PBRM1		
3	52646057	SNV	C	T	Hom	PBRM1		
3	52646063	SNV	T	A	Hom	PBRM1		
3	52649748	SNV	A	G	Hom	PBRM1	rs13083798	
3	52655458	SNV	C	T	Hom	PBRM1		

3	52659124	SNV	T	C	Hom	PBRM1	rs34215106	
3	52661518	SNV	G	A	Het	PBRM1		
3	52661640	SNV	G	C	Hom	PBRM1	rs35249778	
3	52662850	SNV	A	A	Het	PBRM1	rs57869735	
3	52668638	SNV	G	G	Het	PBRM1	rs17052357	PBRM1:NM_001350075:exon12:c.C1281T;p.P427P, 13:exon12:c.C1281T;p.P427P, PBRM1:NM_181042:exon13:c.C1281T;p.P427P,PBRM1:NM_0013500 74:exon14:c.C1344T;p.P448P, PBRM1:NM_001350076:exon14:c.C1344T;p.P448P,PBRM1:NM_0013 50078:exon14:c.C1344T;p.P448P, PBRM1:NM_001350079:exon14:c.C1344T;p.P448P,PBRM1:NM_0013 50077:exon15:c.C1335T;p.P445P
3	52668776	SNV	A	A	Het	PBRM1	rs34173244	PBRM1:NM_001350075:exon12:c.T1143C;p.D381D,PBRM1:NM_018 313:exon12:c.T1143C;p.D381D, PBRM1:NM_181042:exon13:c.T1143C;p.D381D,PBRM1:NM_001350 074:exon14:c.T1206C;p.D402D, PBRM1:NM_001350076:exon14:c.T1206C;p.D402D,PBRM1:NM_001 350078:exon14:c.T1206C;p.D402D, PBRM1:NM_001350079:exon14:c.T1206C;p.D402D,PBRM1:NM_001 350077:exon15:c.T1197C;p.D399D
3	52670044	SNV	C	T	Hom	PBRM1	rs13098776	
3	52673266	SNV	A	T	Hom	PBRM1		
3	52673271	SNV	C	T	Hom	PBRM1		
3	52673282	SNV	A	G	Hom	PBRM1		
3	52673283	SNV	A	T	Hom	PBRM1		
3	52674300	SNV	T	G	Hom	PBRM1	rs13060675	
3	52676065	SNV	C	C	Het	PBRM1	rs11719685	
3	52676190	SNV	A	C	Hom	PBRM1	rs11130313	
3	52677478	SNV	G	G	Het	PBRM1	rs13099479	
3	52682205	SNV	G	G	Het	PBRM1	rs34757451	
3	52682390	SNV	A	A	Het	PBRM1		
3	52687562	SNV	T	T	Het	PBRM1	rs4435633	
3	52687904	SNV	T	T	Het	PBRM1		
3	52692124	SNV	G	A	Hom	PBRM1	rs2336149	
3	52692124	SNV	G	G	Het	PBRM1	rs2336149	
3	52692359	SNV	C	C	Het	PBRM1	rs2590846	
3	52692721	SNV	T	C	Hom	PBRM1	rs7611731	
3	52692725	SNV	A	C	Hom	PBRM1	rs56665533	
3	52693718	SNV	C	T	Hom	PBRM1		
3	52693728	SNV	C	T	Hom	PBRM1		

3	52696352	SNV	T	T	T	Het	PBRM1	rs72950432	
3	52707256	SNV	A	G	Hom	PBRM1			
3	52707909	SNV	A	T	Hom	PBRM1			
3	52707934	SNV	G	A	Hom	PBRM1			
3	52711958	SNV	T	C	Hom	PBRM1			
3	52711972	SNV	A	C	Hom	PBRM1			
3	52711986	SNV	A	G	Hom	PBRM1			
3	52711987	SNV	C	T	Hom	PBRM1			
3	52711994	SNV	A	C	Hom	PBRM1			
3	52719578	SNV	C	G	Hom	PBRM1			
3	52719816	SNV	C	C	Het	PBRM1	rs10933		

EK-7. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen PBRM1 İndel'leri

Kromozom	Pozisyon	Tip	Referans	Allel	Zigozite	Gen	rsNum.	Transkript ID Amino asit ve Nükleotit Değişiklikleri
3	52584431^52584432	Insertion	-	CTC	Hom	PBRM1	rs34372721	
3	52596174	Deletion	A	-	Hom	PBRM1	rs35217588	
3	52713306^52713307	Insertion	-	C	Hom	PBRM1	rs11370862	
3	52584431^52584432	Insertion	-	-	Het	PBRM1	rs34372721	
3	52584431^52584432	Insertion	-	CTC	Het	PBRM1	rs34372721	
3	52596174	SNV	A	A	Het	PBRM1	rs35217588	
3	52596174	Deletion	A	-	Het	PBRM1	rs35217588	
3	52682399^52682400	Insertion	-	-	Het	PBRM1		PBRM1:NM_001350075:exon8:c.773dupA.p.N258Kfs*6, PBRM1:NM_018313:exon8:c.773dupA.p.N258Kfs*6, PBRM1:NM_181042:exon9:c.773dupA.p.N258Kfs*6, PBRM1:NM_001350074:exon10:c.836dupA.p.N279Kfs*6, PBRM1:NM_001350076:exon10:c.836dupA.p.N279Kfs*6, PBRM1:NM_001350078:exon10:c.836dupA.p.N279Kfs*6, PBRM1:NM_001350079:exon10:c.836dupA.p.N279Kfs*6, PBRM1:NM_001350077:exon11:c.827dupA.p.N276Kfs*6
3	52682399^52682400	Insertion	-	T	Het	PBRM1		PBRM1:NM_001350075:exon8:c.773dupA.p.N258Kfs*6, PBRM1:NM_018313:exon8:c.773dupA.p.N258Kfs*6, PBRM1:NM_181042:exon9:c.773dupA.p.N258Kfs*6, PBRM1:NM_001350074:exon10:c.836dupA.p.N279Kfs*6, PBRM1:NM_001350076:exon10:c.836dupA.p.N279Kfs*6, PBRM1:NM_001350078:exon10:c.836dupA.p.N279Kfs*6, PBRM1:NM_001350079:exon10:c.836dupA.p.N279Kfs*6, PBRM1:NM_001350077:exon11:c.827dupA.p.N276Kfs*6
3	52696311	Deletion	A	-	Hom	PBRM1		
3	52584431^52584432	Insertion	-	CTC	Hom	PBRM1	rs34372721	
3	52682330..52682332	MNV	AAC	AAC	Het	PBRM1		

3	52682330..52682332	Deletion	AAC	-	Het	PBRM1			PBRM1:NM_001350075:exon25:c.4062_4063insTCA TG:p.L1355Sfs*31, PBRM1:NM_181042:exon26:c.4062_4063insTCATG: p.L1355Sfs*31, PBRM1:NM_001350079:exon27:c.4050_4051insTCA TG:p.L1351Sfs*31, PBRM1:NM_001350074:exon28:c.4170_4171insTCA TG:p.L1391Sfs*31, PBRM1:NM_001350076:exon28:c.4167_4168insTCA TG:p.L1390Sfs*31, PBRM1:NM_001350078:exon28:c.4170_4171insTCA TG:p.L1391Sfs*31, PBRM1:NM_001350077:exon29:c.4161_4162insTCA TG:p.L1388Sfs*31
3	52692429	Deletion	T	-	Hom	PBRM1			
3	52597322^52597323	Insertion	-	-	Het	PBRM1			
3	52597322^52597323	Insertion	-	CATGA	Het	PBRM1			
3	52620765	SNV	A	A	Het	PBRM1	rs200031540		
3	52620765	Deletion	A	-	Het	PBRM1	rs200031540		
3	52584431^52584432	Insertion	-	CTC	Hom	PBRM1	rs34372721		
3	52596174	SNV	A	A	Het	PBRM1	rs35217588		
3	52596174	Deletion	A	-	Het	PBRM1	rs35217588		
3	52646056^52646057	Insertion	-	TT	Hom	PBRM1			
3	52649433	SNV	C	C	Het	PBRM1			PBRM1:NM_001350075:exon16:c.1858delG:p.E620Rfs*22, PBRM1:NM_01813:exon16:c.1858delG:p.E620Rfs*2 2, PBRM1:NM_181042:exon17:c.1858delG:p.E620Rfs*2 2,

3	52649433	Deletion	C	-	Het	PBRM1	PBRM1:NM_001350079:exon18:c.1921delG;p.E64IRf s*22, PBRM1:NM_001350074:exon19:c.1966delG;p.E656Rf s*22, PBRM1:NM_001350076:exon19:c.1966delG;p.E656Rf s*22, PBRM1:NM_001350078:exon19:c.1966delG;p.E656Rf s*22, PBRM1:NM_001350077:exon20:c.1957delG;p.E653Rfs*22
3	52713306^52713307	Insertion	-	C	Hom	PBRM1	PBRM1:NM_001350075:exon16:c.1858delG;p.E620Rf s*22, PBRM1:NM_018313:exon16:c.1858delG;p.E620Rfs*22, PBRM1:NM_181042:exon17:c.1858delG;p.E620Rfs*22, PBRM1:NM_001350079:exon18:c.1921delG;p.E64IRf s*22, PBRM1:NM_001350074:exon19:c.1966delG;p.E656Rf s*22, PBRM1:NM_001350076:exon19:c.1966delG;p.E656Rf s*22, PBRM1:NM_001350078:exon19:c.1966delG;p.E656Rf s*22, PBRM1:NM_001350077:exon20:c.1957delG;p.E653Rf s*22
3	52584431^52584432	Insertion	-	-	Het	PBRM1	
3	52584431^52584432	Insertion	-	CTC	Het	PBRM1	
3	52596174	SNV	A	A	Het	PBRM1	
3	52596174	Deletion	A	-	Het	PBRM1	
3	52681933	Deletion	T	-	Hom	PBRM1	
3	52687606	Deletion	A	-	Hom	PBRM1	
3	52687916^52687917	Insertion	-	-	Het	PBRM1	
3	52687916^52687917	Insertion	-	CT	Het	PBRM1	
3	52713306^52713307	Insertion	-	-	Het	PBRM1	
3	52713306^52713307	Insertion	-	C	Het	PBRM1	
3	52583039^52583040	Insertion	-	T	Hom	PBRM1	
3	52661520^52661521	Insertion	-	-	Het	PBRM1	
3	52661520^52661521	Insertion	-	GTATAT ACTC	Het	PBRM1	

3	52582446	SNV	T	T	T	Het	PBRM1		
3	52582446	Deletion	T	T	-	Het	PBRM1		
3	52702799^52702800	Insertion	-	A	A	Hom	PBRM1	rs143631943	
3	52602005^52602006	Insertion	-	TTA	Hom	Hom	PBRM1		
3	52602033	Deletion	C	-	Hom	Hom	PBRM1		
3	52602036^52602037	Insertion	-	C	Hom	Hom	PBRM1		
3	52643307	SNV	A	A	A	Het	PBRM1		
3	52643307	Deletion	A	A	-	Het	PBRM1		
3	52643452	SNV	G	G	G	Het	PBRM1		PBRM1:NM_001350075:exon17:c.2444delC;p.P815Lfs*s*10, PBRM1:NM_018313:exon17:c.2444delC;p.P815Lfs*10, PBRM1:NM_181042:exon18:c.2444delC;p.P815Lfs*10,P BRM1:NM_001350079:exon19:c.2507delC;p.P836Lfs*10, PBRM1:NM_001350074:exon20:c.2552delC;p.P851Lfs*s*10, PBRM1:NM_001350076:exon20:c.2552delC;p.P851Lfs*s*10, PBRM1:NM_001350078:exon20:c.2552delC;p.P851Lfs*s*10, PBRM1:NM_001350077:exon21:c.2543delC;p.P848Lfs*s*10
3	52643452	Deletion	G	-	-	Het	PBRM1		PBRM1:NM_001350075:exon17:c.2444delC;p.P815Lfs*s*10, PBRM1:NM_018313:exon17:c.2444delC;p.P815Lfs*10, PBRM1:NM_181042:exon18:c.2444delC;p.P815Lfs*10, PBRM1:NM_001350079:exon19:c.2507delC;p.P836Lfs*s*10, PBRM1:NM_001350074:exon20:c.2552delC;p.P851Lfs*s*10, PBRM1:NM_001350076:exon20:c.2552delC;p.P851Lfs*s*10, PBRM1:NM_001350078:exon20:c.2552delC;p.P851Lfs*s*10, PBRM1:NM_001350077:exon21:c.2543delC;p.P848Lfs*s*10
3	52702799^52702800	Insertion	-	A	A	Hom	PBRM1		
3	52592204^52592205	Insertion	-	-	-	Het	PBRM1		

3	52592204^52592205	Insertion	-	A	Het	PBRM1	
3	52676066	SNV	A	A	Het	PBRM1	rs376663529
3	52676066	Deletion	A	-	Het	PBRM1	rs376663529
3	52584431^52584432	Insertion	-	-	Het	PBRM1	rs34372721
3	52584431^52584432	Insertion	-	CTC	Het	PBRM1	rs34372721

EK-8. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen SETD2 Geni SNPLeri

Kromozom	Pozisyon	Tip	Referans	Allel	Zigozite	Gen	rsNum	Transkript ID, A.Ave Nükleotit Değişimleri
3	47059323	SNV	C	T	Hom	SETD2	rs2385867	
3	47079112	SNV	G	A	Hom	SETD2	rs6768722	
3	47108330	SNV	C	T	Hom	SETD2	rs9844122	
3	47110228	SNV	T	G	Hom	SETD2	rs6777145	
3	47125385	SNV	G	A	Hom	SETD2	rs4082155	SETD2:NM_001349370:exon11:c.C5753T;p.PI918L, SETD2:NM_014159:exon12:c.C5885T;p.PI962L
3	47125805	SNV	G	G	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon11:c.C5333T;p.PI778L, SETD2:NM_014159:exon12:c.C5465T;p.PI822L
3	47125805	SNV	G	A	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon11:c.C5333T;p.PI778L, SETD2:NM_014159:exon12:c.C5465T;p.PI822L
3	47125806	SNV	G	G	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon11:c.C5332T;p.PI778S, SETD2:NM_014159:exon12:c.C5464T;p.PI822S
3	47125806	SNV	G	A	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon11:c.C5332T;p.PI778S, SETD2:NM_014159:exon12:c.C5464T;p.PI822S
3	47161214	SNV	T	C	Hom	SETD2	rs11923706	
3	47162661	SNV	A	G	Hom	SETD2	rs6767907	SETD2:NM_001349370:exon2:c.T3333C;p.N1111N, SETD2:NM_014159:exon3:c.T3465C;p.N1155N
3	47187075	SNV	C	G	Hom	SETD2	rs6442059	
3	47056349	SNV	C	T	Hom	NRADDPx3bSETD2		
3	47059323	SNV	C	C	Het	SETD2	rs2385867	
3	47059323	SNV	C	T	Het	SETD2	rs2385867	
3	47079173	SNV	C	C	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon17:c.G7201A;p.D2401N, SETD2:NM_014159:exon18:c.G7333A;p.D2445N
3	47079173	SNV	C	T	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon17:c.G7201A;p.D2401N, SETD2:NM_014159:exon18:c.G7333A;p.D2445N
3	47143032	SNV	C	C	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon7:c.G4799T;p.GI600V, SETD2:NM_014159:exon8:c.G4931T;p.GI644V
3	47143032	SNV	C	A	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon7:c.G4799T;p.GI600V, SETD2:NM_014159:exon8:c.G4931T;p.GI644V
3	47160027	SNV	C	T	Hom	SETD2		
3	47160032	SNV	T	C	Hom	SETD2		
3	47162661	SNV	A	A	Het	SETD2	rs6767907	SETD2:NM_001349370:exon2:c.T3333C;p.N1111N, SETD2:NM_014159:exon3:c.T3465C;p.N1155N
3	47162661	SNV	A	G	Het	SETD2	rs6767907	SETD2:NM_001349370:exon2:c.T3333C;p.N1111N, SETD2:NM_014159:exon3:c.T3465C;p.N1155N
3	47187075	SNV	C	C	Het	SETD2	rs6442059	
3	47187075	SNV	C	G	Het	SETD2	rs6442059	

3	47059323	SNV	C	T	Hom	SETD2	rs2385867	
3	47079112	SNV	G	A	Hom	SETD2	rs6768722	
3	47103376	SNV	C	T	Hom	SETD2	rs9845728	
3	47125385	SNV	G	A	Hom	SETD2	rs4082155	
3	47162661	SNV	A	G	Hom	SETD2	rs6767907	
3	47168834	SNV	G	G	Het	SETD2		
3	47168834	SNV	G	A	Het	SETD2		
3	47187075	SNV	C	G	Hom	SETD2	rs6442059	
3	47072621	SNV	T	A	Hom	SETD2	rs11715121	
3	47097187	SNV	A	T	Hom	SETD2		
3	47179501	SNV	G	A	Hom	SETD2		
3	47179503	SNV	C	A	Hom	SETD2		
3	47187892	SNV	C	T	Hom	SETD2		
3	47187894	SNV	G	A	Hom	SETD2		
3	47187899	SNV	C	T	Hom	SETD2		
3	47187900	SNV	C	T	Hom	SETD2		
3	47187916	SNV	A	G	Hom	SETD2		
3	47187936	SNV	A	G	Hom	SETD2		
3	47187938	SNV	C	T	Hom	SETD2		
3	47187939	SNV	G	A	Hom	SETD2		
3	47199184	SNV	A	T	Hom	SETD2		
3	47059323	SNV	C	T	Hom	SETD2	rs2385867	
3	47079112	SNV	G	A	Hom	SETD2	rs6768722	
3	47079907	SNV	C	T	Hom	SETD2		
3	47079913	SNV	G	C	Hom	SETD2		
3	47125385	SNV	G	A	Hom	SETD2	rs4082155	SETD2:NM_001349370:exon11:c.C5753T;p.P1918L, SETD2:NM_014159:exon12:c.C5885T;p.P1962L
3	47129903	SNV	C	T	Hom	SETD2	rs12631730	
3	47162661	SNV	A	G	Hom	SETD2	rs6767907	SETD2:NM_001349370:exon2:c.T3333C;p.N1111N, SETD2:NM_014159:exon3:c.T3465C;p.N1155N
3	47187075	SNV	C	G	Hom	SETD2	rs6442059	
3	47059323	SNV	C	C	Het	SETD2	rs2385867	
3	47059323	SNV	C	T	Het	SETD2	rs2385867	
3	47079112	SNV	G	G	Het	SETD2	rs6768722	
3	47079112	SNV	G	A	Het	SETD2	rs6768722	
3	47120308	SNV	C	T	Hom	SETD2		
3	47120323	SNV	C	T	Hom	SETD2		
3	47120324	SNV	A	G	Hom	SETD2		

3	47120333	SNV	A	T	Hom	SETD2			SETD2:NM_001349370:exon11:c.G5839T;p.E1947X, SETD2:NM_014159:exon12:c.G5971T;p.E1991X
3	47125299	SNV	C	C	Het	SETD2			SETD2:NM_001349370:exon11:c.G5839T;p.E1947X, SETD2:NM_014159:exon12:c.G5971T;p.E1991X
3	47125299	SNV	C	A	Het	SETD2			SETD2:NM_001349370:exon11:c.G5839T;p.E1947X, SETD2:NM_014159:exon12:c.G5971T;p.E1991X
3	47125385	SNV	G	G	Het	SETD2	rs4082155		SETD2:NM_001349370:exon11:c.C5753T;p.P1918L, SETD2:NM_014159:exon12:c.C5885T;p.P1962L
3	47125385	SNV	G	A	Het	SETD2	rs4082155		SETD2:NM_001349370:exon11:c.C5753T;p.P1918L, SETD2:NM_014159:exon12:c.C5885T;p.P1962L
3	47129903	SNV	C	T	Hom	SETD2	rs12631730		
3	47155301	SNV	T	T	Het	SETD2			
3	47155301	SNV	T	C	Het	SETD2			
3	47155310	SNV	A	A	Het	SETD2			
3	47155310	SNV	A	T	Het	SETD2			
3	47155315	SNV	T	T	Het	SETD2			
3	47155315	SNV	T	C	Het	SETD2			
3	47155317	SNV	A	A	Het	SETD2			
3	47155317	SNV	A	T	Het	SETD2			
3	47155321	SNV	C	C	Het	SETD2			
3	47155321	SNV	C	T	Het	SETD2			
3	47155322	SNV	T	T	Het	SETD2			
3	47155322	SNV	T	C	Het	SETD2			
3	47155327	SNV	T	T	Het	SETD2			
3	47155327	SNV	T	C	Het	SETD2			
3	47155339	SNV	G	G	Het	SETD2			
3	47155339	SNV	G	A	Het	SETD2			
3	47155340	SNV	T	T	Het	SETD2			
3	47155340	SNV	T	A	Het	SETD2			
3	47161214	SNV	T	T	Het	SETD2	rs11923706		
3	47161214	SNV	T	C	Het	SETD2	rs11923706		
3	47162661	SNV	A	A	Het	SETD2	rs6767907		SETD2:NM_001349370:exon2:c.T3333C;p.N1111N, SETD2:NM_014159:exon3:c.T3465C;p.N1155N
3	47162661	SNV	A	G	Het	SETD2	rs6767907		SETD2:NM_001349370:exon2:c.T3333C;p.N1111N ,SETD2:NM_014159:exon3:c.T3465C;p.N1155N
3	47187075	SNV	C	C	Het	SETD2	rs6442059		
3	47187075	SNV	C	G	Het	SETD2	rs6442059		
3	47059323	SNV	C	C	Het	SETD2	rs2385867		
3	47059323	SNV	C	T	Het	SETD2	rs2385867		
3	47079112	SNV	G	G	Het	SETD2	rs6768722		

3	47079112	SNV	G	A	Het	SETD2	rs6768722	
3	47113693	SNV	G	A	Hom	SETD2		
3	47113754	SNV	C	T	Hom	SETD2	rs13091054	
3	47125385	SNV	G	G	Het	SETD2	rs4082155	
3	47125385	SNV	G	A	Het	SETD2	rs4082155	
3	47148998	SNV	C	A	Hom	SETD2		
3	47154651	SNV	T	G	Hom	SETD2	rs11130114	
3	47161214	SNV	T	T	Het	SETD2	rs11923706	
3	47161214	SNV	T	C	Het	SETD2	rs11923706	
3	47162661	SNV	A	A	Het	SETD2	rs6767907	
3	47162661	SNV	A	G	Het	SETD2	rs6767907	
3	47169010	SNV	G	G	Het	SETD2		
3	47169010	SNV	G	A	Het	SETD2		
3	47169015	SNV	C	C	Het	SETD2		
3	47169015	SNV	C	T	Het	SETD2		
3	47169023	SNV	C	C	Het	SETD2	rs6442059	
3	47169023	SNV	C	G	Het	SETD2	rs6442059	
3	47169029	SNV	G	G	Het	SETD2		
3	47169029	SNV	G	C	Het	SETD2		
3	47169030	SNV	T	T	Het	SETD2		
3	47169030	SNV	T	C	Het	SETD2		
3	47187075	SNV	C	C	Het	SETD2		
3	47187075	SNV	C	G	Het	SETD2		
3	47059323	SNV	C	C	Het	SETD2		
3	47059323	SNV	C	T	Het	SETD2		
3	47061183	SNV	G	A	Hom	SETD2		
3	47079112	SNV	G	A	Hom	SETD2		
3	47088069	SNV	T	T	Het	SETD2	4,97E-03	SETD2:NM_001349370:exon15:c.A6874G;p.I2292V, SETD2:NM_014159:exon16:c.A7006G;p.I2336V
3	47088069	SNV	T	C	Het	SETD2	4,97E-03	SETD2:NM_001349370:exon15:c.A6874G;p.I2292V, SETD2:NM_014159:exon16:c.A7006G;p.I2336V
3	47108330	SNV	C	T	Hom	SETD2		
3	47125385	SNV	G	A	Hom	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon11:c.C5753T;p.P1918L, SETD2:NM_014159:exon12:c.C5885T;p.P1962L
3	47146932	SNV	C	T	Hom	SETD2		
3	47147576	SNV	G	G	Het	SETD2	0,08	SETD2:NM_001349370:exon5:c.C4618T;p.L1540F, SETD2:NM_014159:exon6:c.C4750T;p.L1584F
3	47147576	SNV	G	A	Het	SETD2	0,08	SETD2:NM_001349370:exon5:c.C4618T;p.L1540F, SETD2:NM_014159:exon6:c.C4750T;p.L1584F

3	47147582	SNV	C	C	C	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon5:c.G4612T:p.E1538X, SETD2:NM_014159:exon6:c.G4744T:p.E1582X
3	47147582	SNV	C	A	A	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon5:c.G4612T:p.E1538X, SETD2:NM_014159:exon6:c.G4744T:p.E1582X
3	47161214	SNV	T	C	Hom		SETD2		
3	47162661	SNV	A	A	Het		SETD2		SETD2:NM_001349370:exon2:c.T3333C:p.N1111N, SETD2:NM_014159:exon3:c.T3465C:p.N1155N
3	47162661	SNV	A	G	Het		SETD2		SETD2:NM_001349370:exon2:c.T3333C:p.N1111N, SETD2:NM_014159:exon3:c.T3465C:p.N1155N
3	47187075	SNV	C	G	Hom		SETD2		
3	47079112	SNV	G	G	Het		SETD2	rs6768722	
3	47079112	SNV	G	A	Het		SETD2	rs6768722	
3	47094594	SNV	T	C	Hom		SETD2		
3	47100388	SNV	C	G	Hom		SETD2		
3	47100394	SNV	T	C	Hom		SETD2		
3	47100409	SNV	A	T	Hom		SETD2		
3	47108773	SNV	G	G	Het		SETD2		
3	47108773	SNV	G	A	Het		SETD2		
3	47125385	SNV	G	G	Het		SETD2	rs4082155	SETD2:NM_001349370:exon11:c.C5753T:p.P1918L, SETD2:NM_014159:exon12:c.C5885T:p.P1962L
3	47125385	SNV	G	A	Het		SETD2	rs4082155	SETD2:NM_001349370:exon11:c.C5753T:p.P1918L, SETD2:NM_014159:exon12:c.C5885T:p.P1962L
3	47138229	SNV	G	C	Hom		SETD2	rs7432062	
3	47138236	SNV	C	A	Hom		SETD2		
3	47143123	SNV	T	T	Het		SETD2	rs34173174	
3	47143123	SNV	T	C	Het		SETD2	rs34173174	
3	47165303	SNV	C	C	Het		SETD2		SETD2:NM_001349370:exon2:c.G691T:p.A231S, SETD2:NM_014159:exon3:c.G823T:p.A275S
3	47165303	SNV	C	A	Het		SETD2		SETD2:NM_001349370:exon2:c.G691T:p.A231S, SETD2:NM_014159:exon3:c.G823T:p.A275S
3	47169077	SNV	T	T	Het		SETD2		
3	47169077	SNV	T	A	Het		SETD2		
3	47108361	SNV	G	G	Het		SETD2	rs73079603	
3	47108361	SNV	G	A	Het		SETD2	rs73079603	
3	47129903	SNV	C	C	Het		SETD2	rs12631730	
3	47129903	SNV	C	T	Het		SETD2	rs12631730	
3	47104307	SNV	G	C	Hom		SETD2		
3	47104317	SNV	C	T	Hom		SETD2		
3	47104326	SNV	A	G	Hom		SETD2		

3	47104327	SNV	G	T	Hom	SETD2		
3	47108361	SNV	G	A	Hom	SETD2	rs73079603	
3	47147001	SNV	C	T	Hom	SETD2	rs180918770	
3	47079112	SNV	G	A	Hom	SETD2	rs6768722	
3	47198826	SNV	G	A	Hom	SETD2	rs11708451	
3	47061183	SNV	G	G	Het	SETD2	rs2290547	
3	47061183	SNV	G	A	Het	SETD2	rs2290547	
3	47125385	SNV	G	A	Hom	SETD2	rs4082155	
3	47103828	SNV	G	G	Het	SETD2		
3	47103828	SNV	G	A	Het	SETD2		
3	47187075	SNV	C	G	Hom	SETD2	rs6442059	
3	47185650	SNV	C	G	Hom	SETD2	rs62246446	
3	47110228	SNV	T	G	Hom	SETD2	rs6777145	
3	47162661	SNV	A	G	Hom	SETD2	rs6767907	
3	47059323	SNV	C	T	Hom	SETD2	rs2385867	

EK-9. WES Analizleri Sonucu Hastalarda Tespit Edilen SETD2 Geni İndelleri

Kromozom	Pozisyon	Tip	Referans	Allel	Zigozite	Gen	rsNum	Transkript ID, AAve Nükleotit Değişimleri
3	47103862..47103863	Deletion	TT	-	Hom	SETD2	rs10589946	
3	47125917..47125918	Deletion	TT	-	Hom	SETD2		
3	47129455..47129458	Deletion	AAAC	-	Hom	SETD2	rs66851205	
3	47142908..47142909	Deletion	CC	-	Hom	SETD2	rs60548476	
3	47147394..47147398	Deletion	AAAAA	-	Hom	SETD2		
3	47168839..47168840	Insertion	-	-	Het	SETD2	rs60754228	
3	47205503..47205508	Deletion	GCGGCG	-	Hom	KIF9-AS1\3bSETD2		
3	47059030	SNV	A	A	Het	SETD2		
3	47059030	Deletion	A	-	Het	SETD2		
3	47079162..47079163	MNV	GG	GG	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon17:c.7211_7212del;p.P2404Hfs*17, SETD2:NM_014159:exon18:c.7343_7344del;p.P2444Hfs*17
3	47079162..47079163	Deletion	GG	-	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon17:c.7211_7212del;p.P2404Hfs*17, SETD2:NM_014159:exon18:c.7343_7344del;p.P2444Hfs*17
3	47103862..47103863	MNV	TT	TT	Het	SETD2	rs10589946	
3	47103862..47103863	Deletion	TT	-	Het	SETD2	rs10589946	
3	47143087..47143088	Insertion	-	GT	Hom	SETD2		
3	47142908..47142909	Deletion	CC	-	Hom	SETD2	rs60548476	
3	47147394..47147397	MNV	AAAA	AAAA	Het	SETD2		
3	47147394..47147397	Deletion	AAAA	-	Het	SETD2		
3	47168840	SNV	A	A	Het	SETD2		
3	47168840	Deletion	A	-	Het	SETD2		
3	47205503..47205511	Deletion	GCGGCGGCG	-	Hom	KIF9-AS1\3bSETD2		
3	47087869..47087870	Insertion	-	-	Het	SETD2		
3	47103862..47103863	Deletion	TT	-	Hom	SETD2	rs10589946	
3	47125917	Deletion	T	-	Hom	SETD2	rs5848822	
3	47142908..47142909	Deletion	CC	-	Hom	SETD2	rs60548476	
3	47147394..47147396	MNV	AAA	AAA	Het	SETD2		
3	47147394..47147396	Deletion	AAA	-	Het	SETD2		
3	47205503..47205511	Deletion	GCGGCGGCG	-	Hom	KIF9-AS1\3bSETD2		
3	47103862..47103863	MNV	TT	TT	Het	SETD2	rs10589946	
3	47103862..47103863	Deletion	TT	-	Het	SETD2	rs10589946	

3	47129455..47129458	Deletion	AAAC	-	Hom	SETD2	rs66851205	
3	47142908..47142909	MNV	CC	CC	Het	SETD2	rs60548476	
3	47142908..47142909	Deletion	CC	-	Het	SETD2	rs60548476	
3	47147394..47147396	MNV	AAA	AAA	Het	SETD2		
3	47147394..47147396	Deletion	AAA	-	Het	SETD2		
3	47155283..47155284	MNV	CG	CG	Het	SETD2		
3	47155283..47155284	Deletion	CG	-	Het	SETD2		
3	47155286^47155287	Insertion	-	-	Het	SETD2		
3	47155286^47155287	Insertion	-	CA	Het	SETD2		
3	47155335..47155336	MNV	GG	GG	Het	SETD2		
3	47155335..47155336	Deletion	GG	-	Het	SETD2		
3	47205503..47205511	MNV	GCGGCGGCG	GCGGC GGCG	Het	KIF9-AS1 x3bSETD2		
3	47205503..47205511	Deletion	GCGGCGGCG	-	Het	KIF9-AS1 x3bSETD2		
3	47103862..47103863	MNV	TT	TT	Het	SETD2	rs10589946	
3	47103862..47103863	Deletion	TT	-	Het	SETD2	rs10589946	
3	47125884^47125885	Insertion	-	-	Het	SETD2		
3	47125884^47125885	Insertion	-	A	Het	SETD2		
3	47142908..47142909	MNV	CC	CC	Het	SETD2	rs60548476	
3	47142908..47142909	Deletion	CC	-	Het	SETD2	rs60548476	
3	47163496	SNV	G	G	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon2:c.2498del C:p.S833*, SETD2:NM_014159:exon3:c.2630delC:p .S877*
3	47163496	Deletion	G	-	Het	SETD2		SETD2:NM_001349370:exon2:c.2498del C:p.S833*, SETD2:NM_014159:exon3:c.2630delC:p .S877*
3	47168840	SNV	A	A	Het	SETD2		
3	47168840	Deletion	A	-	Het	SETD2		
3	47103862..47103863	Deletion	TT	-	Horn	SETD2	rs10589946	
3	47129364^47129365	Insertion	-	AGG	Horn	SETD2	rs141224027	
3	47129455..47129462	Deletion	AAACAAAC	-	Horn	SETD2		
3	47142908..47142909	MNV	CC	CC	Het	SETD2	rs60548476	
3	47142908..47142909	Deletion	CC	-	Het	SETD2	rs60548476	
3	47147394..47147395	MNV	AA	AA	Het	SETD2	rs55987628	
3	47147394..47147395	Deletion	AA	-	Het	SETD2	rs55987628	
3	47168839^47168840	Insertion	-	-	Het	SETD2	rs60754228	
3	47168839^47168840	Insertion	-	A	Het	SETD2	rs60754228	

3	47100406..47100407	Insertion	-	C	Hom	SETD2			
3	47143088..47143091	MNV	GTGT	GTGT	Het	SETD2	rs72231601		
3	47143088..47143091	Deletion	GTGT	-	Het	SETD2	rs72231601		
3	47143087..47143088	Insertion	-	-	Het	SETD2			
3	47143087..47143088	Insertion	-	GT	Het	SETD2			
3	47168840	SNV	A	A	Het	SETD2			
3	47168840	Deletion	A	-	Het	SETD2			
3	47205503..47205508	MNV	GCGGCG	GCGGC G	Het	KIF9-AS1 x3bSETD2			
3	47205503..47205508	Deletion	GCGGCG	-	Het	KIF9-AS1 x3bSETD2			
3	47165240..47165243	MNV	AACT	AACT	Het	SETD2			SETD2:NM_001349370:exon2:c.751_754del:p.S251Lfs*5, SETD2:NM_014159:exon3:c.883_886del:p.S295Lfs*5
3	47165240..47165243	Deletion	AACT	-	Het	SETD2			SETD2:NM_001349370:exon2:c.751_754del:p.S251Lfs*5, SETD2:NM_014159:exon3:c.883_886del:p.S295Lfs*5
3	47168840	SNV	A	A	Het	SETD2			
3	47168840	Deletion	A	-	Het	SETD2			
3	47081202..47081204	Deletion	AAA	-	Hom	SETD2			
3	47103862..47103863	Deletion	TT	-	Hom	SETD2	rs10589946		
3	47142908..47142909	Deletion	CC	-	Hom	SETD2	rs60548476		
3	47143088..47143089	MNV	GT	GT	Het	SETD2			
3	47143088..47143089	Deletion	GT	-	Het	SETD2			
3	47147394..47147400	Deletion	AAAAAAAA	-	Het	SETD2, SETD2			
3	47147394..47147400	Deletion	AAAAAAAA	AAAA	Het	SETD2, SETD2			
3	47205503..47205511	Deletion	GCGGCGCG	-	Hom	KIF9-AS1 x3bSETD2			

EK-10. Etik Kurul Kararı

