

## TÜRKÇE ÖZET

Enstitüsü : Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI  
Tez Türü ve Tarihi : Doktora – Ocak 2024

## KISA ÖZET

### **BERRAK HÜCRELİ RENAL HÜCRELİ KARSİNOMADA YAĞ ASİT METABOLİZMASI İLİŞKİLİ AMPK ve miR-33a İFADELERİNİN KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİNİN TCGA VERİ SETİNDE ve HÜCRE HATLARINDA MOLEKÜLER DÜZEYDE ANALİZİ**

Mustafa Zafer TEMİZ

Böbrek kaynaklı en sık izlenen kanser olan ve lipid metabolizması ile yakından ilişkili olduğu gösterilen berrak hücreli renal hücreli karsinom (BHRHK)' da yağ asidi metabolizmasının rolü, günümüzde prognozu tahmin etmek ve tedavi stratejilerini yönlendirebilmek amacıyla çok sayıda araştırmaya konu olmuş ve yeterli düzeyde kanıtlara ulaşmak için halen yeni çalışmalara konu olmaya devam etmektedir.

Bu çalışmada, Kanser Genom Atlası (The Cancer Genome Atlas, TCGA) veri bankası üzerinden, yağ asit metabolizması ile ilişkili olan 5'-adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) ve yağ asidi metabolizması ile ilişkisi en net açıklanan mikro RNA olan miR-33a ifadelerinin BHRHK olgularında klinikopatolojik verilerle ilişkisini araştırdık. Ardından, hücre hattı analizleriyle, AMPK ve miR-33a ifadelerinin primer ve metastatik BHRHK hücre hatlarında hücresel düzeyde ifadelerini ve miR-33a modülasyonlarının hücre içi lipid birikimi üzerine etkilerini değerlendirdik. TCGA veri bankasında kayıtlı BHRHK olgularına ait biyoinformatik veriler açık erişimli cBioPortal, UCSC Xena, UALCAN ve Linkedomics veri portalları kullanılarak elde edildi. Bu portallardaki yerleşik istatistiksel metodlar ile AMPK 1 ve 2 genleri mRNA ifadeleri ile miR-33a ifade seviyelerinin BHRHK olgularında patolojik tümör derecesi, patolojik tümör T evresi, N evresi ve M evresi, ve sağkalım gibi klinikopatolojik parametrelerle olan ilişkileri

irdelendi. Ayrıca, miR-33a ve AMPK1 ve 2 ifadeleri arasındaki korelasyonlar da analiz edildi. Takiben, primer BHRHK kaynaklı A-498 ve metastatik BHRHK kaynaklı Caki-1 hücre hatları ve kontrol hücre hattı olarak kullanılan HEK-293 hücre hatlarında immunoblotlama ile AMPK 1 $\alpha$  alt ünitesi protein seviyeleri ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR, qRT-PCR) ile miR-33a ifadeleri belirlendi. Son aşamada ise, miR-33a mimik ve anti-miR-33a transfeksiyonları sonrası miR-33a modülasyonlarının bu hücre hatlarında hücre içi lipid birikimleri üzerine etkileri BODIPY ve eş zamanlı DAPI floresan boyama yöntemiyle değerlendirildi.

TCGA analiz sonuçlarına göre; BHRHK olgularında primer tümör dokularında AMPK 1 ve 2 mRNA ifadelerinin normal doku örneklerine kıyasla büyük oranda anlamlı azalma sergiledikleri izlendi. Tümör patolojik derecesi ve T evresi ilerledikçe bu azalmalar daha da belirginleşme eğilimindeydi. Benzer şekilde lenf nodu tutulumu ve metastazlı olgularda da anlamlı derecede daha az ifade edildikleri gözlemlendi. Ayrıca, azalmış AMPK 1 ve 2 mRNA ifadelerinin BHRHK olgularında daha kötü sağ kalım sonuçları ile ilişkili olduğu saptandı. Protein düzeyinde ise primer tümörlü dokularda AMPK 1 protein ifadesinin normal dokulara oranla anlamlı derecede yüksek, AMPK 2 protein ifadesinin ise anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi. Artmış AMPK 1 protein ifadesi artan tümör T evresi ile birlikte daha da artma eğilimindeydi. miR-33a ifadeleri irdelendiğinde primer tümör dokularında normal doku örneklerine kıyasla anlamlı derecede azalmış miR-33a ifadesi izlenirken, BHRHK' ya ait primer tümör doku örneklerinde T evresi ilerledikçe miR-33a ifadesinin artma eğiliminde olduğu belirlendi. Bu dokularda, ayrıca, miR-33a ile AMPK 1 ve 2 mRNA ifadeleri arasındaki negatif yönde zayıf korelasyonların olduğu saptandı. Ancak, alt grup analizlerinde bu korelasyonların yüksek T evreli olgularda olmadığı belirlendi. Hücre hatları analizlerimizde ise; AMPK 1 $\alpha$  protein ve miR-33a ifade düzeylerinin, daha agresif olan metastatik Caki-1 hücrelerinde A-498 primer tümör hücrelerine oranla anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlendi. miR-33a mimik transfeksiyonlarına bağlı olarak hücre içi lipid içeriğinde belirgin değişim olmadığı gözlemlenirken, anti-miR-33a transfeksiyonlarının A-498 ve Caki-1 hücrelerinde hücre içi doğal lipid oranında azalmaya sebep olduğu izlendi. Öte yandan, hücre içi lipid düzeyindeki azalma AMPK 1 $\alpha$  protein seviyesi daha yüksek olan metastatik Caki-1 hücrelerinde daha fazlaydı.

Bulgularımız, BHRHK patogenezinde yağ asit metabolizması ilişkili AMPK ve miR-33a' nın erken evre ve ileri evre hastalıkta farklı karmaşık rolleri olabileceğini düşündürecek kanıtlar olarak ele alınabilir. Hücre hatlarından elde ettiğimiz sonuçlara göre, AMPK 1 $\alpha$  protein seviyesi daha yüksek olan metastatik hücrelerde anti-miR-33a ile müdahalenin hücre içi lipid birikimini önemli ölçüde azalttığı saptandı. Sonuç olarak bulgularımız, miR-33a' nın ileri evre BHRHK tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini desteklemekle birlikte, bu konuda daha net sonuçlar için miR-33a' nın hücre sağkalımı üzerine etkilerinin de ayrıntı irdelenmesi gerekmektedir.

**Anahtar Sözcükler: Böbrek Kanseri, Yağ Asit Metabolizması, AMPK, miR-33a.**

## YABANCI DİL ÖZET

Institute : Institute of Graduate Studies  
Department : Molecular Biology and Genetics  
Programme : Molecular Biology and Genetics  
Supervisor : Assist Prof. Dr. Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI  
Degree Awarded and Dat : Doctorate – January 2024

### ABSTRACT

## **MOLECULAR ANALYSIS OF THE RELATIONSHIP BETWEEN FATTY ACID METABOLISM RELATED AMPK AND miR-33a EXPRESSIONS AND CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN CLEAR CELL RENAL CARCINOMA IN THE TCGA DATA SET AND CELL LINES**

Mustafa Zafer TEMİZ

The role of fatty acid metabolism in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), which is the most common cancer of kidney origin and has been shown to be closely related to lipid metabolism, has been the subject of numerous studies to predict prognosis and guide treatment strategies and continues to be the subject of new studies to provide sufficient evidence.

In this study, we investigated the expression levels of 5'-adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK), which is associated with fatty acid metabolism, and miR-33a, the micro RNA most clearly associated with fatty acid metabolism, in patients with ccRCC. The associations between clinicopathological characteristics and these expression characteristics in ccRCC patients included in The Cancer Genome Atlas (TCGA) database were also investigated. We then used cell line analyses to evaluate the expression of AMPK and miR-33a at the cellular level in primary and metastatic ccRCC cell lines and the effects of miR-33a modulations on intracellular lipid accumulation. Bioinformatic data of ccRCC cases from the TCGA database were obtained from the open access data portals cBioPortal, UCSC Xena, UALCAN, and Linkedomics. Using statistical methods built into these portals, the associations of AMPK 1 and 2 gene mRNA expression and miR-33a expression levels with clinicopathological parameters such as pathological tumor grade, pathological tumor T stage, N stage, and M stage, and

survival in ccRCC cases were evaluated. Correlations between miR-33a and AMPK 1 and 2 expression were also analyzed. Subsequently, AMPK 1 $\alpha$  subunit protein levels by immunoblotting and miR-33a expression by quantitative real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) were determined in primary ccRCC-derived A-498 and metastatic ccRCC-derived Caki-1 cell lines and HEK-293 cell lines used as control cell lines. Finally, the effects of miR-33a modulations on intracellular lipid accumulation in these cell lines after miR-33a mimic and anti-miR-33a transfections were evaluated by BODIPY and simultaneous DAPI fluorescent staining.

According to the results of the TCGA analysis, AMPK 1 and 2 mRNA expressions in primary tumor tissues of ccRCC cases showed a significant decrease compared to normal tissue samples. These decreases tended to be more pronounced with increasing tumor pathologic grade and T stage. Similarly, significantly lower expression was observed in patients with lymph node involvement and metastases. Furthermore, decreased AMPK 1 and 2 mRNA expression was associated with worse survival outcomes in patients with ccRCC. At the protein level, AMPK 1 protein expression was significantly higher and AMPK 2 protein expression was significantly lower in primary tumor tissues compared to normal tissues. Moreover, increased AMPK 1 protein expression tended to increase with tumor stage. When miR-33a expression was examined, it was found that miR-33a expression was significantly decreased in primary tumor tissues, while miR-33a expression tended to increase in tumor tissues as T stage progressed. In evaluating the relationship between miR-33a and AMPK 1 and 2 mRNA expressions, it was found that there were weak negative correlations in tumor tissues. However, subgroup analyses revealed that these correlations were not present in high T stage cases. In our cell line analyses, AMPK 1 $\alpha$  protein and miR-33a expression levels were significantly higher in the more aggressive metastatic Caki-1 cells compared to primary A-498 tumor cells. While no significant change in intracellular lipid content was observed by miR-33a mimic transfections, anti-miR-33a transfections caused a decrease in intracellular natural lipid content in A-498 and Caki-1 cells. On the other hand, the decrease in intracellular lipid levels was greater in metastatic Caki-1 cells with higher AMPK 1 $\alpha$  protein levels.

Our findings suggest that fatty acid metabolism-related AMPK and miR-33a may have different complex roles in the pathogenesis of ccRCC in early stage and advanced disease. According to our results from cell lines, intervention with anti-miR-33a significantly reduced intracellular lipid accumulation in metastatic cells with higher AMPK 1 $\alpha$  protein levels. In conclusion, our findings support that miR-33a may be a potential target in the treatment of advanced ccRCC, but the effects of miR-33a on cell survival should also be examined in detail for clearer results.

**Key Words: Kidney Cancer, Fatty Acid Metabolism, AMPK, miR-33a.**