



SENA KILINÇOĞLU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2025



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KOLON KANSERİNDE SALL GEN AİLESİ VE
MİRNA'LARIN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

SENA KILINÇOĞLU

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. ŞEREF BUĞRA TUNÇER**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
KANSER GENETİĞİ BİLİM DALI**

İSTANBUL-2025

BEYAN

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

SENA KILINÇOĞLU

AÇIKLAMA:

Kişisel Verileri Koruma Kurulu'nun 24/09/2020 tarihli ve 2020/722 sayılı toplantısında “Açık Erişim Sisteminde ıslak imzalı evrakların yayımlanması uygulamasının ilgili kişilere ait ıslak imzalı belgeleri içermeyecek şekilde güncellenmesi” Kararı üzerine tezlerde kişisel verilerin olmadan yüklenmesi uygulamasına başlanmıştır.

İTHAF

Bu çalışmayı, en büyük desteğim, yol arkadaşım olan eşime ve hayatım boyunca yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Değerli katkıları ve sağladıkları bilimsel ortam için İstanbul Üniversitesi Rektörü ve Onkoloji Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Osman Bülent ZÜLFİKAR'a ve Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hatice Bilge BECERİR'e;

Tez sürecimin her aşamasında bilgi birikimi, rehberliği ve yapıcı geri bildirimleriyle akademik gelişimime önemli katkılarda bulunan; sabrı, anlayışı ve teşvik edici tutumuyla bu süreci daha verimli ve değerli kılan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Şeref Buğra TUNÇER'e;

Çalışmam kapsamında kolon kanseri hastalarından doku örneklerinin temininde bana büyük destek sağlayan başta Sayın Doç. Dr. İlker ÖZGÜR, Sayın Uzm. Dr. Cemil Burak KULLE ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şule KARAMAN olmak üzere, Gastrointestinal Cerrahi Bölümü'nün kıymetli asistan doktorlarına ve hemşirelerine;

İstatistiksel analizlerin yürütülmesinde kıymetli desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Özge PASİN'e;

Kanser Genetiği Bilim Dalı'nda görev alan ve her aşamada desteğiyle yanımda olan Sayın Dr. Zübeyde YALNIZ KAYIM ve değerli teknisyenlerimiz Türkan ŞEN FERADOĞLU ile Arzu BURNUVA'ya; başta sevgili arkadaşım Dilruba Beyza DEMİREL olmak üzere birlikte emek verdiğimiz tüm dönem arkadaşlarıma;

Hayatım boyunca bana koşulsuz destek veren, sevgisi ve inancıyla her zaman arkamda duran sevgili annem Yıldız KARAGÖL ve babam Cenap KARAGÖL'e, kıymetli kardeşim Süha KARAGÖL'e ve hayatımıza neşe katan miniğim Miray KARAGÖL'e;

Son olarak, tüm zorlu süreçte varlığına minnettar olduğum kıymetli eşim Onur KILINÇOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2023-39720.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Bilim Dalı Programında Yüksek Lisans öğrencisi Sena KILINÇOĞLU tarafından Doç. Dr. Şeref Buğra TUNÇER'in danışmanlığında hazırlanan **“Kolon Kanserinde SALL Gen Ailesi ve miRNA’ların Rolünün Araştırılması”** başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 30/06/2025 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Özge PASİN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Hamidiye Tıp Fakültesi
Biyoistatistik Anabilim Dalı

Jüri-Danışman

Doç. Dr. Şeref Buğra TUNÇER
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı
Kanser Genetiği Bilim Dalı

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Şule KARAMAN
İstanbul Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü
Klinik Onkoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolon Kanseri	3
2.1.1. Epidemiyolojisi	3
2.1.2. Anatomik Yapısı	5
2.1.3. Patogenezi	5
2.1.4. Risk Faktörleri	7
2.1.5. Evreleme	8
2.1.6. Teşhis Yöntemleri	9
2.1.7. Tedavi Yöntemleri	10
2.2. Kolon Kanseri Biyobelirteçleri	12
2.2.1. Kolon Kanserinde Doku Bazlı Biyobelirteçler	12
2.2.2. Kolon Kanserinde Epigenetik Biyobelirteçler	13
2.2.3. Kolon Kanserinde Diğer Potansiyel Biyobelirteçler	14
2.3. Kanser Gelişiminde SALL Gen Ailesinin Rolü	16
2.3.1. SALL1 Geninin Rolü	16
2.3.2. SALL2 Geninin Rolü	17
2.3.3. SALL3 Geninin Rolü	17
2.3.4. SALL4 Geninin Rolü	18
2.3.5. SALL Gen Ailesiyle İlişkili miRNA'ların Rolü	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Gereçler	21

3.1.1. Kitler ve Sarf Malzemeler.....	21
3.1.2. Cihazlar.....	21
3.2. Yöntemler	22
3.2.1. Dokuların Eldesi ve Saklanması	22
3.2.2. Dokudan Total RNA İzolasyonu	23
3.2.3. NanoDrop Cihazı ile RNA Saflık ve Konsantrasyon Ölçümleri	25
3.2.4. cDNA'nın Sentezlenmesi	25
3.2.5. Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyon (dPZR) İşlemi	27
3.2.6. İstatistiksel Analizler	30
4. BULGULAR	33
4.1. SALL Genlerinin Ekspresyon Analizleri.....	34
4.2. Seçilen miRNA'ların Ekspresyon Analizleri.....	37
4.3. ROC Analizleri	39
4.3.1. SALL Genlerine Ait ROC Analizleri	39
4.3.2. miRNA'lara Ait ROC Analizleri	42
4.3.3. Hastaların Klinik Özellikleri Açısından Gen ve miRNA Ekspresyon Analizleri.....	44
4.4. Lojistik Regresyon Modellemesi	48
4.5. Korelasyon Analizleri	49
4.5.1. Kat Değişimi Analizi	52
5. TARTIŞMA.....	54
KAYNAKLAR.....	68
HAM VERİLER	90
FORMLAR.....	91
ETİK KURUL ONAYI	97
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	98

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: KRK’de TNM Evrelemesi*	8
Tablo 2.2: KRK’de Dukes Evrelemesi*	9
Tablo 3.1: Kullanılan Kitler.....	21
Tablo 3.2: Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	21
Tablo 3.3: gDNA Eliminasyonu için Kullanılan Bileşenler	26
Tablo 3.4: Ters Transkripsiyon İşleminde Kullanılan Bileşenler	26
Tablo 3.5: Ters Transkripsiyon İşleminde Kullanılan Bileşenler	27
Tablo 3.6: mRNA Ekspresyonunda Kullanılan dPZR Bileşenleri.....	28
Table 3.7: miRNA Ekspresyonunda Kullanılan dPZR Bileşenleri.....	28
Tablo 3.8: Dijital PZR döngü adımları	29
Tablo 4.1: Hasta popülasyonunun demografik verileri.....	34
Tablo 4.2: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki <i>SALL1</i> , <i>SALL2</i> ve <i>SALL3</i> Genleri Kopya Sayısı Değerleri.	34
Tablo 4.3: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde <i>miR-130a-5p</i> ve <i>miR-5688</i> Kopya Sayısı Değerleri.	37
Tablo 4.4: <i>SALL1</i> Geninin Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki ROC Analizi.....	39
Tablo 4.5: <i>SALL2</i> Geninin Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki ROC Analizi.....	40
Tablo 4.6: <i>SALL3</i> Geninin Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki ROC Analizi.....	41
Tablo 4.7: <i>miR-130a-5p</i> için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde ROC Analizi.....	42
Tablo 4.8: <i>miR-5688</i> için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde ROC Analizi.....	43
Tablo 4.9: Cinsiyete Göre Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi Sonuçları).	44
Tablo 4.10: Tümör Evresine Göre Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi Sonuçları).	45
Tablo 4.11: Tümör Tipine Göre Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi Sonuçları).	46
Tablo 4.12: Aile Öyküsüne Göre Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi Sonuçları).	47
Tablo 4.13: Sigara Kullanımına Göre Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi Sonuçları).	48

Tablo 4.14: Kolon Kanseri Tümör Dokularında <i>SALL1</i> , <i>SALL2</i> , <i>SALL3</i> Genleri ile <i>miR-130a-5p</i> ve <i>miR-5688</i> Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Analizleri.	49
Tablo 4.15: <i>SALL1</i> , <i>SALL2</i> ve <i>SALL3</i> Genleri ile <i>miR-130a-5p</i> ve <i>miR-5688</i> Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Kat Değişimleri Analizi.	52



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: 2024 yılında cinsiyet bazlı en sık görülen on kanser türü (Siegel Mph ve ark., 2024).	3
Şekil 2.2: Kolon, rektum ve anüsten oluşan bağırsak anatomisi (Bhalerao ve ark., 2021).	5
Şekil 2.3: KK gelişimi (X. Zhu & Li, 2023).	6
Şekil 3.3: Hedef mRNA'lar için Deney Şablonu	30
Şekil 3.4: Hedef miRNA'lar için Deney Şablonu	30
Şekil 4.1: Hasta Popülasyonundaki Tümör Evre Dağılımı	33
Şekil 4.2: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki <i>SALL1</i> Geni Kopya Sayısı Dağılımları.	35
Şekil 4.3: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki <i>SALL2</i> Geni Kopya Sayısı Dağılımları.	36
Şekil 4.4: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki <i>SALL3</i> Geni Kopya Sayısı Dağılımları.	36
Şekil 4.5: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde <i>miR-130a-5p</i> Kopya Sayısı Dağılımları.	38
Şekil 4.6: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde <i>miR-5688</i> Kopya Sayısı Dağılımları.	38
Şekil 4.7: <i>SALL1</i> Geni için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinin ROC Analiz Eğrisi.	39
Şekil 4.8: <i>SALL2</i> Geni için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinin ROC Analiz Eğrisi.	40
Şekil 4.9: <i>SALL3</i> Geni için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinin ROC Analiz Eğrisi.	41
Şekil 4.10: <i>miR-130a-5p</i> için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde ROC Analiz Eğrisi.	43
Şekil 4.11: <i>miR-5688</i> için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde ROC Analiz Eğrisi.	44
Şekil 4.12: <i>SALL1</i> ve <i>SALL2</i> Gen Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Pozitif Korelasyonu Gösteren Dağılım Grafiği.	50
Şekil 4.13: <i>SALL1</i> ve <i>SALL3</i> Gen Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Pozitif Korelasyonu Gösteren Dağılım Grafiği.	51
Şekil 4.14: <i>miR-130a-5p</i> ve <i>miR-5688</i> Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Pozitif Korelasyonu Gösteren Dağılım Grafiği.	51
Şekil 4.15: Kolon Kanserli Hastaların Tümör Doku Örneklerinde <i>SALL1</i> ve <i>SALL3</i> Genlerinin Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Kat Değişimlerini Gösteren Dağılım Grafiği.	53

Şekil 4.16: Kolon Kanserli Hastaların Tümör Doku Örneklerinde *miR-130a-5p* ve *miR-5688* Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Kat Değişimlerini Gösteren Dağılım Grafiği. 53



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

SEMBOLLER	ANLAMLARI
%	Yüzde
Ng	Nanogram
°C	Santigrat derece
≥	Büyük eşittir
<	Küçüktür
μL	Mikrolitre

KISALTMALAR	AÇILIMLARI
5-FU	5-Fluorourasil
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
AUC	Eğir Altında Kalan Alan
BRAF	v-Raf fare sarkoma virüsü onkojeni homologu B1
BMI1	B Hücrelerine Özgü Moloney Fare Lösemi Virüsü Entegrasyon Bölgesi 1
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CB1R	Cannabinoid Reseptör 1
CIMP	CpG Adacığı Metilatör Fenotipi
CpG	Sitozin-Fosfat-Guanin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EMT	Epitel-Mezenkimal Geçiş
FAP	Ailevi Adenomatöz Polipozis
FIT	Fekal İmmünokimyasal Test
FOXC1	Forkhead kutusu C1
gFOBT	Dışkıda Gizli Kan Testi
HNPCC	Kalıtsal Polipozis Olmayan Kolon Kanseri
IGF1R	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Reseptörü

IL-11	İnterlökin 11
K-RAS	Kirsten Rat Sarkoma Viral Onkogen
KK	Kolon Kanseri
KRK	Kolorektal Kanser
lncRNA	Uzun Kodlanmayan RNA
miRNA	Mikro RNA
MMR	DNA Eşleşme Onarım
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Mesajcı RNA
MSI	Mikrosatellit İnstabilitesi
NDST4	N-Deasetilaz / N-Sülfotransferaz 4
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PI3K	Fosfatidilinozitid-3-kinazlar
PRL-3	Fosfataz Regenerasyon Benzeri 3
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
RAS	Rat Sarkoma Viral Onkogen
RNA	Ribonükleik Asit
ROC	Alıcı İşlem Karakteristikleri
SALL	Spalt Benzeri Transkripsiyon Faktörleri
SEPT9	Septin 9 Geni
SPSS	Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi
SPS	Serrated Polipozis Sendromu
TGF- β RII	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Reseptörü Tip II
TNM	Tümör – Lenf Nodları – Metastaz
TRU	Transrektal Ultrasonografi
TP53	Tümör Baskılayıcı Protein p53
UTR	Çevrilmemiş Bölgeler
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
ZEB1	Çinko Parmak E-Kutu Bağlayıcı Homeobox 1

WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WNT	Wingless/Entegre Sinyal Yolu



ÖZET

KILINÇOĞLU, S. Kolon Kanserinde SALL Gen Ailesi ve miRNA'ların Rolünün Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul (2025).

Kolon kanseri, dünyada en sık görülen üçüncü kanser türüdür. Hem tekrarlama riskinin yüksek olması hem de hastalığın heterojen yapısı nedeniyle, kolon kanseri tanı ve tedavisinde yeni moleküler belirteçlerin keşfi önem taşımaktadır. Spalt benzeri (*SALL*) gen ailesi, transkripsiyon faktörleri olarak işlev görür ve ürettikleri proteinlerle hücre proliferasyonu, farklılaşma ve kök hücre benzeri özelliklerin kontrolü de dahil olmak üzere gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alırlar. Güncel çalışmalarda mikroRNA'ların, gen regülasyonunda önemli görevleri olduğu ve karsinogenez sürecine katkı sağladığı bilinmektedir.

Çalışmada, 25 kolon kanser hastasına ait tümör dokusu ve komşu normal doku örneklerinde *SALL1*, *SALL2*, *SALL3* ve *SALL4* genleri ile *miR-5688*, *miR-1305*, *miR-130a-5p* ve *miR-1226-3p* ekspresyon düzeyleri dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemiyle analiz edilmiştir. Tümör dokusu ve komşu normal doku arasındaki *SALL2* ve *SALL3* genlerinin anlamlı ekspresyon farkları ($p<0,001$; $p=0,008$) ve yüksek ROC değerleri ($AUC=0,818$; $0,718$), bu genlerin biyobelirteç adayı olma potansiyelini güçlendirmektedir. *SALL2* ve *SALL3* genlerinin kombine kullanımı, kolon kanserinde histopatolojik tanıyı destekleyecek biyobelirteç panelleri için potansiyel olarak temel oluşturabilir. Ayrıca *SALL1* ve *SALL2* gen ekspresyonları arasında saptanan yüksek pozitif korelasyonda ($r=0,601$; $p=0,002$), bu genlerin kombine biyobelirteç panelinde birlikte değerlendirilme potansiyelini desteklemektedir. *SALL4* geni, *miR-1226-3p* ve *miR-1305* ekspresyon düzeylerinin çoğu kolon dokusunda tespit edilememesi, ekspresyonlarının epigenetik baskılanma olasılığına işaret etmektedir. Bu bulgular, söz konusu moleküllerin kolon kanserinde sınırlı ekspresyon profiline sahip olabileceğini göstermektedir.

Çalışma sonuçları, *SALL2* ve *SALL3* genlerinin kolon kanserinde tanısal biyobelirteç olma potansiyeline işaret eden ön veriler sunmaktadır. Kesin sonuçlara varılabilmesi için bu bulguların daha geniş ve çok merkezli gruplarda doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolon kanseri, *SALL1*, *SALL2*, *SALL3*, *SALL4*, *miR-5688*, *miR-1305*, *miR-130a-5p*, *miR-1226-3p*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2023-39720.

ABSTRACT

KILINÇOĞLU, S. Investigation of the Role of the SALL Gene Family and miRNAs in Colon Cancer. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Basic Oncology. Master's Thesis. Istanbul (2025).

Colon cancer is the third most commonly diagnosed cancer type worldwide. Due to its high recurrence rate and heterogeneous nature, the identification of novel molecular biomarkers is crucial for the diagnosis and treatment of colon cancer. The Spalt-like (*SALL*) gene family functions as transcription factors and plays a role in the regulation of gene expression through the proteins they encode, particularly in processes such as cell proliferation, differentiation, and the maintenance of stem cell-like properties. Recent studies have shown that microRNAs play important roles in gene regulation and contribute to the process of carcinogenesis.

In this study, expression levels of *SALL1*, *SALL2*, *SALL3*, and *SALL4* genes, as well as *miR-5688*, *miR-1305*, *miR-130a-5p*, and *miR-1226-3p*, were analyzed using digital Polymerase Chain Reaction in tumor and adjacent normal tissue samples obtained from 25 colon cancer patients. Significant expression differences of *SALL2* and *SALL3* genes between tumor and adjacent normal tissues ($p < 0,001$; $p = 0,008$), along with high ROC values ($AU = 0,818$; $0,718$), support the potential of these genes as biomarker candidates. The combined use of *SALL2* and *SALL3* genes may form a basis for biomarker panels that support histopathological diagnosis in colon cancer. Additionally, the strong positive correlation observed between *SALL1* and *SALL2* gene expressions ($r = 0,601$; $p = 0,002$) further supports their potential for joint evaluation in such panels. The lack of detectable expression of the *SALL4* gene, *miR-1226-3p*, and *miR-1305* in most colon tissue samples suggests possible epigenetic silencing of these molecules. These findings indicate that the mentioned molecules may exhibit a limited expression profile in colon cancer.

The results of this study provide preliminary evidence supporting the diagnostic biomarker potential of *SALL2* and *SALL3* genes in colon cancer. However, validation of these findings in larger, multicenter cohorts is necessary to draw definitive conclusions.

Keywords: Colon cancer, *SALL1*, *SALL2*, *SALL3*, *SALL4*, *miR-5688*, *miR-1305*, *miR-130a-5p*, *miR-1226-3p*

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: TYL-2023-39720.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hem erkek hem de kadın popülasyonlarında en sık görülen üçüncü kanser türü olan kolon kanseri (KK), aynı zamanda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında da ön sıralardadır. Küresel veriler, yılda 153.000'den fazla yeni vakanın (tüm kanserlerin %7.8'i) teşhis edildiğini göstermekte ve bu durumun ciddi bir halk sağlığı sorunu olduğunu ortaya koymaktadır (Siegel ve ark., 2023). Erken evre tanı zorlukları ve tedavi yanıtlarındaki heterojenite, moleküler biyobelirteçlerin klinik önemini artırmaktadır (T. Li ve ark., 2014). Bu biyobelirteçlerin doğrulanması, KK'de erken tanı ve prognoz takibi için vazgeçilmezdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, transkripsiyon faktörleri ve mikroRNA'ların (miRNA) karsinogeneze ve progresyonda önemli roller üstlendiğini ortaya koymuştur. Spalt-benzeri transkripsiyon faktörü *SALL* gen ailesi; *SALL1*, *SALL2*, *SALL3* ve *SALL4* geni olmak üzere dört üyeden oluşmakta olup; hücre proliferasyonu, farklılaşma, göç ve kök hücre fenotipinin sürdürülmesinde kritik rol oynamaktadır (Sweetman & Münsterberg, 2006). Bu genlerin, bulundukları dokuya ve epigenetik duruma bağlı olarak tümör baskılayıcı veya onkogenik işlevler gösterebildiği bilinmektedir. Literatürde *SALL4* geni iyi tanımlanmış bir onkogen iken; *SALL1*, *SALL2* ve *SALL3* gen işlevlerinin tümör tipi ve evresine göre değişkenlik gösterebileceği bildirilmektedir (Álvarez ve ark., 2021)

Benzer şekilde, miRNA'lar da gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyen, kısa ve protein kodlamayan RNA molekülleridir. Onkogenik ya da tümör baskılayıcı işlevler gösterebilen miRNA'ların KK dahil pek çok kanser türünde epitel-mezenkimal geçiş (EMT), metastaz ve hücrel transformasyon gibi süreçleri etkilediği gösterilmiştir (X. Meng ve ark., 2013; Garzon ve ark., 2009). Ayrıca doku ve vücut sıvı örneklerinde yüksek stabilite göstermeleri, miRNA'ları ideal biyobelirteç adayları haline getirmektedir (Creemers ve ark., 2012).

Bu çalışmanın amacı, kolon kanseri tanılı 25 hastadan alınan tümör ve komşu normal doku örneklerinde; *SALL1*, *SALL2*, *SALL3*, *SALL4* genleri ile KK'de henüz araştırılmamış dört miRNA'nın (*miR-5688*, *miR-1305*, *miR-130a-5p*, *miR-1226-3p*) ekspresyon düzeylerini dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu (dPZR) ile analiz etmektir. Tümör-komşu normal doku ekspresyon farklılıklarının belirlenmesinin yanı sıra, gen-

miRNA arasındaki potansiyel düzenleyici ilişkilerin ortaya konması ve bunların patogenezdaki rollerinin araştırılması hedeflenmiştir. Özellikle KK'de ilk kez incelenecek bu miRNA'lar ile *SALL* gen ailesinin birlikte değerlendirilmesi, bu moleküllerin tanı/prognozda biyobelirteç potansiyelinin ve yeni düzenleyici mekanizmaların belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

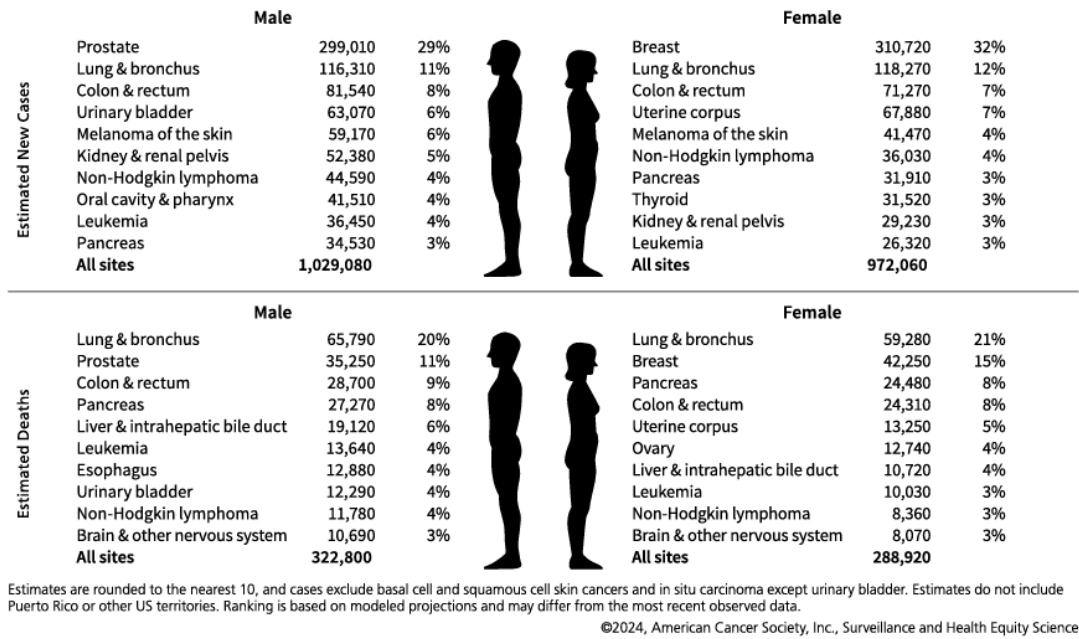


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Kanseri

2.1.1. Epidemiyolojisi

Dünya genelinde kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en yaygın ölüm nedenlerinden biridir (Dizon & Kamal, 2024). Kanser, hem genetik faktörlerle nesilden nesile aktarılabilen hem de çevresel koşulların etkisiyle ortaya çıkabilen bir hastalıktır (Yıldızhan ve ark., 2018). Siegel ve arkadaşlarının (2024) yaptığı bir çalışmada cinsiyete göre kanser dağılımı incelenmiş ve sonuçlar Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Ayrıca, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tahminlerine göre, önümüzdeki 30 yıl içinde dünya çapında yaklaşık 28 milyon kişiye kanser teşhisi konulacağı öngörülmektedir (H. Sung ve ark., 2021).



Şekil 2.1: 2024 yılında cinsiyet bazlı en sık görülen on kanser türü (Siegel Mph ve ark., 2024).

Bu çarpıcı veriler ışığında, kansere bağlı ölüm oranlarının küresel düzeyde değerlendirilmesi, hastalığın yol açtığı ekonomik yükün anlaşılması ve yeni kaynakların doğru şekilde planlanması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, kanserin görülme sıklığı (insidans), tarama programları ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelerin detaylı analizi gereklidir. Özellikle, KK'ye bağlı ölüm oranlarındaki hızlı artış, düşük ve orta gelirli ülkelerde daha belirgindir. Bu durum, söz konusu ülkelerde erken teşhis, tedavi

erişimi ve önleyici politikaların acilen ele alınması ihtiyacını ortaya koymaktadır (Santucci ve ark., 2024). Öte yandan, gelişmiş ülkelerde yaşam standartlarının yüksek olması ve tarama hizmetlerine kolay erişim sayesinde KK kaynaklı ölüm oranlarında belirgin bir düşüş gözlenmektedir (Arnold ve ark., 2017). KK alanındaki araştırmalarda, moleküler düzeyde sağlanan ilerlemeler sayesinde artık belirli kanser alt tiplerine özgü hedefe yönelik tedaviler ve yeni ilaçlar geliştirilebilmektedir (J.L. Arias, 2011). Bu nedenle, kanserin biyolojik mekanizmalarının detaylı şekilde anlaşılması, yenilikçi tanı ve tedavi yöntemlerinin keşfi açısından büyük önem taşımaktadır.

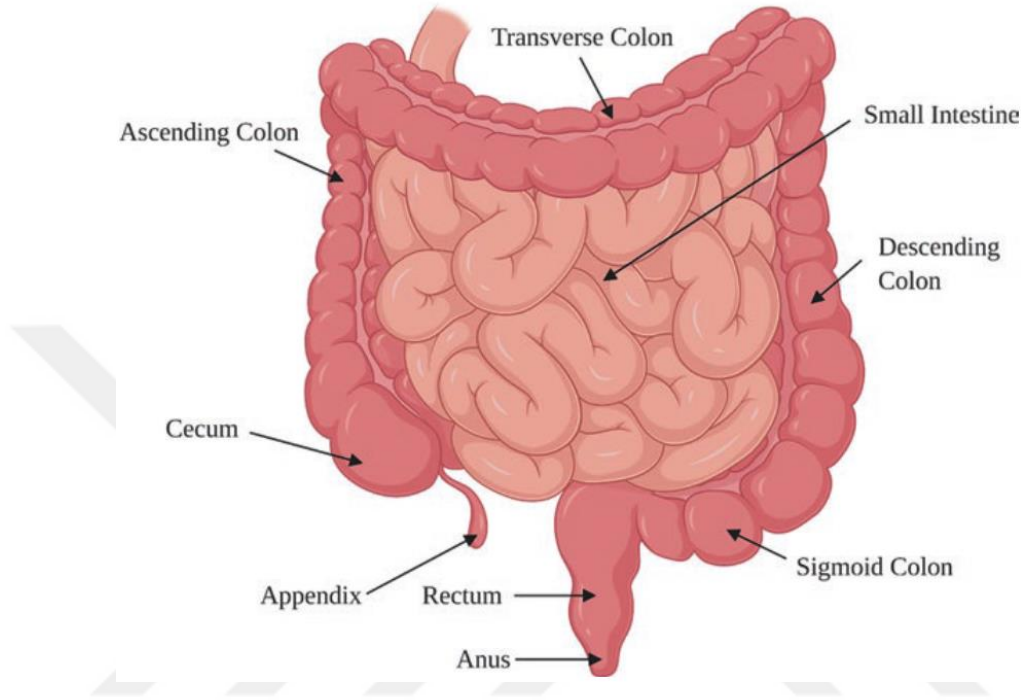
KK, tıbbi literatürde kolorektal kanser (KRK) grubunda yer alan önemli bir kanser türüdür. Cinsiyet bazında en sık görülen kanserler sıralamasında ise üçüncü sırada yer almaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu son verilerine göre, kadınlarda görülme sıklığı (insidans) yüz binde 14,7, erkeklerde ise yüz binde 24,8 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde her yıl yaklaşık 19.000 kişiye KK teşhisi konulmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2018).

2023 yılında yapılan geniş kapsamlı bir araştırmaya göre dünya genelinde 150.000'den fazla yeni KRK vakası tespit edilmiştir. Bu vakaların yaklaşık %70'i kolon bölgesinde, %30'u ise rektum bölgesinde gelişen tümörlerden oluşmaktadır. Çalışma sonuçları erkeklerde KK'nin, kadınlara kıyasla daha erken yaşlarda ortaya çıkma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Genel olarak hastalığın görülme sıklığı uzun vadede azalma eğilimi gösterse de, son yıllarda bu düşüş hızında belirgin bir yavaşlama gözlemlenmektedir. Özellikle 50 yaş altı bireylerde KK sıklığında artış trendi dikkat çekmektedir. Bu bulgular, özellikle genç erişkinlerde tarama programlarının yeniden değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Erkek popülasyonundaki erken başlangıç eğilimi ise cinsiyete özgü risk faktörlerinin daha detaylı incelenmesi ihtiyacını doğurmaktadır (Siegel ve ark., 2023).

Dünya genelinde ise KK insidans oranları ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. 2020 yılı verilerine göre, yaşa standardize edilmiş en yüksek KK insidansı Macaristan'da kaydedilirken, çeşitli Batı Afrika ülkelerinde bu oran oldukça düşük seviyelerde bulunmaktadır (Al-Joufi ve ark., 2022).

2.1.2. Anatomik Yapısı

Tıbbi terminolojide sıklıkla KRK veya KK olarak adlandırılan bu hastalık grubu; kolon, rektum ve anüs kaynaklı kanserlerin ortak özelliklerini bir arada değerlendirmektedir (How Kit ve ark., 2012; M. Li ve ark., 2008).



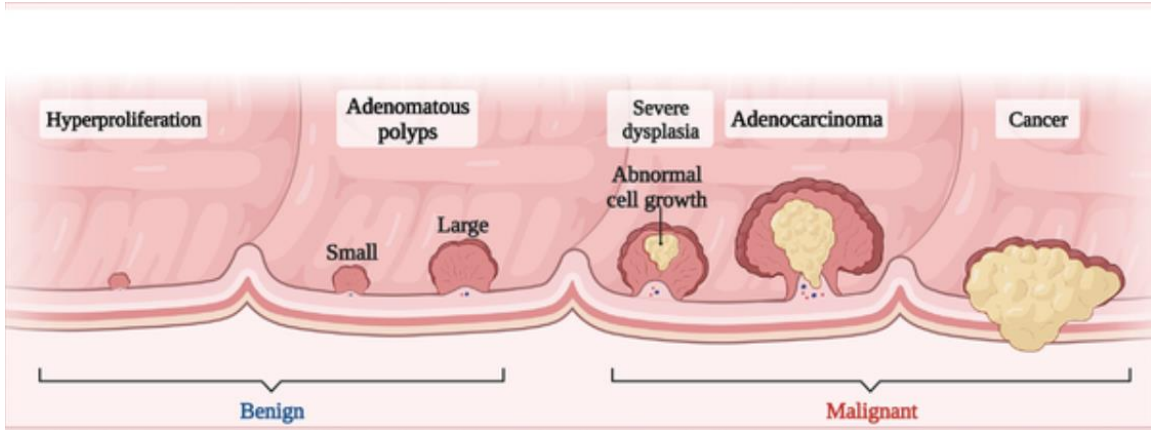
Şekil 2.2: Kolon, rektum ve anüsten oluşan bağırsak anatomisi (Bhalerao ve ark., 2021).

2.1.3. Patogenezi

KK oluşum mekanizması, organ gelişimi ve embriyonel süreçleri düzenleyen genlerdeki genetik ve epigenetik değişikliklerin karmaşık etkileşimine dayanmaktadır (Bertrand ve ark., 2012). Kansere yol açan faktörlerin DNA'da neden olduğu mutasyonlar sonucunda, KK üç aşamalı kötü huylu (malign) bir dönüşüm sürecinden geçmektedir (Labianca ve ark., 2010). Bu süreç şu şekilde işlemektedir:

- Hiperplazi: Hücreler normalden fazla çoğalmaktadır.
- Atipik hiperplazi: Hücrelerin anormal şekil ve davranış göstermektedir.
- Adenom: İyi huylu tümör oluşmaktadır.
- Karsinom: Kötü huylu kanser gelişimi görülmektedir.

Bu değişimler, başlangıçta normal olan epitel dokunun zamanla kanserli yapıya dönüşmesine yol açmaktadır (Duan ve ark., 2022; Khan, 2022).



Şekil 2.3: KK gelişimi (X. Zhu & Li, 2023).

KK vakalarının yaklaşık %70'i rastgele gelişen (sporadik) adenomlardan kaynaklanmaktadır. Bu tür vakalar genellikle çevresel faktörler ve beslenme alışkanlıklarıyla yakından ilişkilidir. Vakaların %10'undan daha az bir kısmı ise ailevi adenomatöz polipozis (FAP) gibi kalıtsal genetik bozukluklar sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu hastalarda çok sayıda polip görülür. Geriye kalan %25'lik grup ise belirli bir kalıtsal sendromla bağlantılı olmayan, ancak genetik yatkınlık taşıyan vakalardan oluşmaktadır. Bu grupta spesifik gen varyasyonları rol oynamaktadır (Bolocan ve ark., 2011; Molina-Cerrillo ve ark., 2020).

KK oluşumunda üç ana moleküler sinyal yolu belirleyici rol oynamaktadır. Bunlardan ilki, genellikle hipermutasyonla ilişkili olan mikrosatellit instabilitesidir (MSI). İkincisi, hipermutasyonla doğrudan bağlantılı olmayan kromozomal instabilite yoludur. Üçüncü sinyal yolu ise her iki grupta da gözlemlenebilen *sitozin-fosfat-guanin* (CpG) adası metilasyon fenotipidir. Bu fenotip, epigenetik düzeyde önemli değişiklikleri temsil etmektedir (Aghagolzadeh & Radpour, 2016).

KK oluşum sürecinde hem kalıtsal hem de somatik düzeyde meydana gelen genetik değişimlerin önemli katkıları bulunmaktadır. Bu değişikliklerin rolü aşağıdaki şekilde özetlenmektedir.

Kalıtsal Mutasyonlar: Tümör baskılayıcı genlerden biri olan *Adenomatöz Polipozis Koli* (APC) geninde meydana gelen kalıtsal mutasyonlar, FAP sendromunun gelişimine neden olmaktadır. Bu genetik bozukluk sonucunda, bireyin artan yaşı ile birlikte, kolon mukozasında da adenom sayısında artış doğru orantılıdır. KK oluşumu açısından değerlendirildiğinde, FAP sendromuna sahip bireylerin riskli grupta yer aldığı

bilinmektedir (Goss & Groden, 2000; Kinzler & Vogelstein, 1996). Bir diğer önemli kalıtsal mutasyon türü, DNA yanlış eşleşme tamirinden (*MMR*) sorumlu genlerde meydana gelen değişikliklerle ilişkilidir. Bu mutasyonlar, Lynch sendromu olarak bilinen kalıtsal polipozis olmayan kolon kanserinin (HNPCC) genetik temelini oluşturmaktadır (Kinzler & Vogelstein, 1996; Kolodner, 1996; S. Markowitz, 2000). Klasik HNPCC olgularının %90'ından fazlasında, *MMR* genlerindeki mutasyonlar belirleyici rol oynamaktadır (H. Yan ve ark., 2000).

Somatik Gen Mutasyonları: KK'de saptanan en erken ve en yaygın somatik mutasyonlardan biri *Tümör Baskılayıcı Protein p53 (TP53)* geninde görülmekte olup, bu mutasyonlar olguların yarısından fazlasında tespit edilmiştir. Bu genin işlev kaybı, adenomdan karsinom evresine geçişte kritik role sahiptir (Bommer & Fearon, 2008). *Rat Sarkoma Viral Onkogen (RAS)* ailesi içinde özellikle *Kirsten Rat Sarkoma Viral Onkogen (K-RAS)* geninde gözlenen mutasyonlar, büyük çaplı adenomalarda ve KRK vakalarının yaklaşık %50'sinde görülmektedir (Bommer & Fearon, 2008). Öte yandan, *Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta Tip II Reseptörü (TGF β -RII)* geninin inaktivasyona yol açan bu mutasyonlar, KRK hastalarının %30'unda tespit edilmiştir (S. Markowitz, 2000; S. Markowitz ve ark., 1995). Özellikle metastatik KRK vakalarında sıkça görülen yüksek *Fosfataz Regenerasyon Benzeri 3 (PRL-3)* gen ekspresyonu ise, vakaların %25'inde görülen gen amplifikasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Saha ve ark., 2001).

2.1.4. Risk Faktörleri

Genel olarak kanser gelişimi, bireyin genetik yatkınlığı, aile öyküsü ve obezite gibi faktörlerin tek başına ya da birlikte etkili olmasıyla anlamlı düzeyde artış gösterebilir. Bununla birlikte, fiziksel aktivitenin yetersizliği ve düzenli olarak kırmızı et tüketimi, kanser riskini arttıran çevresel ve yaşam tarzına bağlı faktörler arasında yer almaktadır. Özellikle kanser kaynaklı mortalite oranlarının artmasıyla ilişkilendirilen faktörler arasında ise sigara kullanımı, gece vardiyasında çalışarak uyku kalitesinde azalma ve aşırı alkol tüketimi yer almaktadır (Normanno ve ark., 2018; Rex ve ark., 2017).

KK açısından değerlendirildiğinde, genetik faktörler ve aile öyküsü doğrudan risk faktörleri arasında yer almaktadır. Özellikle 60 yaş öncesi ileri evre adenom veya KK tanısı almış birinci derece akrabası bulunan bireyler ile herhangi bir yaşta bu hastalıklara sahip iki veya daha fazla birinci derece akrabası olan kişiler, yüksek risk grubunda kabul edilmektedir. Bu bireylere düzenli kolonoskopik taramalar önerilmektedir. Ayrıca,

ülseratif kolit ve Crohn hastalığı da KK gelişme riskini arttıran önemli klinik faktörlerdendir. Bunun yanı sıra, Serrated Polipozis Sendromu (SPS) tanısı konulan hastalarda 5 yıl içinde KRK gelişme olasılığının göz ardı edilmemesi ve bu bireylere yıllık kolonoskopik takip gerektiği de bildirilmiştir (Boparai ve ark., 2010; Sazanov ve ark., 2017).

2.1.5. Evreleme

KRK vakalarında tümörlerin yaklaşık üçte ikisi kolon segmentinde, geri kalan üçte biri ise rektumda lokalize olmaktadır. Histopatolojik tanının kesinleşmesinin ardından, hastalığın lokal ya da sistemik yayılım durumunun ayrıntılı biçimde değerlendirilmesi gerekmektedir (Kolligs, 2016). Günümüzde KK veya KRK evrelemede en yaygın kullanılan yöntem, TNM evreleme sistemidir (Amin ve ark., 2017). Bu sistem; tümörün invazyon derinliği (T), bölgesel lenf nodlarına metastaz durumunu (N) ve uzak organ metastazlarının varlığı (M) olmak üzere üç temel parametre üzerinden hastalığın evresini belirlemektedir (Tablo 2.1). TNM sınıflandırması, hem hastalığın prognozunu değerlendirmede hem de bireyselleştirilmiş tedavi planlarının oluşturulmasında temel bir rehber niteliği taşımaktadır (Knowlton ve ark., 2024). Dukes evrelemesi ise KRK'nin bağırsak duvarına invazyonunu ve lenf nodu tutulumunu göstermektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.1: KRK'de TNM Evrelemesi*

Evre	Primer Tümör	Bölgesel Lenf Nod Metastazı	Uzak Metastaz
0	Tis	N0	M0
I	T1 veya T2	N0	M0
II	T3-T4	N0	M0
III	Herhangi bir T	N1-N2	M0
IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

*TNM Sınıflandırması: Tis = karsinoma in situ; T1 = submukoza; T2 = muskularis propria; T3 = tüm katmanlara nüfuz eder (rektal kanser için perirektal dokuyu içerir); T4 = bitişik organlar veya periton. N0 = yok; N1 = 1-3 bölgesel lenf nodu veya lenf nodu tutulumu olmaksızın herhangi bir sayıda tümör birikimi; N2 = ≥ 4 bölgesel lenf nodu. M0 = yok; M1 = mevcut.

Tablo 2.2: KRK'de Dukes Evremelesi*

Evre	TNM	Dukes Sınıflandırması	Tümör İnvazyon Derecesi
0	T0, M0, N0	-	Gözle görülür tümör yok
I	T1, N0, M0 & T2, N0, M0	A	Tümör mükülaris mukoza ve submukozaya sınırlı
II	T3, N0, M0 & T4, N0, M0	B1 & B2	Tümör mükülaris propria'ya sınırlı
III	T1-4, N1, M0 & T1-4, N2, M0	C1 & C2	Tümör serozoya ulaşmış, komşu organ tutulumu olabilir
IV	T1-4, N1-2, M1	D	Uzak metastaz var

*Dukes evreleme sistemi, KRK'nin bağırsak duvarına invazyonunu ve lenf nodu tutulumu durumunu değerlendirmektedir. Dukes A, tümörün bağırsak duvarı ile sınırlı olduğunu, Dukes B, tümörün duvarı aştığını ancak lenf nodlarına yayılmadığını, Dukes C, lenf nodu metastazının bulunduğunu ve Dukes D, uzak metastaz varlığını göstermektedir (Haq ve ark., 2009).

2.1.6. Teşhis Yöntemleri

KK'nin tanısında sıkça kullanılan invaziv ve invaziv olmayan aşağıda özetlenmektedir:

Moleküler ve Biyokimyasal Yöntemler: İdrar, kan, dışkı, beyin omurilik sıvısı gibi çeşitli biyolojik örneklerde saptanabilen biyobelirteçler; proteinler, tümöre özgü DNA fragmanları, dolaşımdaki tümör hücreleri, miRNA'lar, MSI vb. molekülleri içermektedir. Bu biyobelirteçler, KK tanısında önemli bir yer tutmaktadır. Söz konusu yöntemler invaziv olmamakla birlikte; hızlı, duyarlı ve maliyet açısından da uygulanabilirliği yüksek tanı araçlarıdır (Aghagolzadeh & Radpour, 2016; Gan ve ark., 2020).

Nano-Moleküler Yöntemler: Dolaşımdaki tümör DNA seviyelerinin kantitatif olarak ölçülmesi ve plazmada bulunan miRNA konsantrasyonlarının analiz edilmesi KK tanısında kullanılan gelişmiş moleküler tekniklerin başında gelmektedir. Kan bazlı biyobelirteçlerden biri olan *Septin 9 (SEPT9)* geni metilasyon profilinin de tespiti bu

yöntemler arasında yer almaktadır. Ayrıca, KK'nin erken tanı ve progresyon takibinde yenilikçi potansiyele sahip teknikler arasında uzun kodlanmayan RNA'ların (lncRNA) analizi bulunmaktadır (Alix-Panabières & Pantel, 2014; Stroun ve ark., 2001).

Kromozomal Yöntemler: KK'de, özellikle kromozom 18q bölgesinde saptanan heterozigotluk kaybı, hastalığın seyri ve tedaviye verilen yanıtı öngörmede kullanılan önemli genetik biyobelirteçlerden biridir (Crowley ve ark., 2013).

Dışkıda Test Yöntemleri: KK taramasında, invaziv olmayan yöntemler arasında dışkıda gizli kan testi (gFOBT) ve fekal immünokimyasal test (FIT) sıkça tercih edilmektedir. FIT'in, yalnızca insan hemoglobine özgül çalışması, onu ileri evre adenomlar ve malign lezyonların saptanmasında gFOBT'ye kıyasla daha duyarlı hale getirmektedir. Çok hedefli FIT ile dışkı DNA analizlerinin birarada kullanıldığı yöntemler, KK'de tanısal doğruluğu arttırmaktadır. Ayrıca, bu testlerin evde uygulanabilir olması, hasta kullanımı açısından avantaj sağlamaktadır (Brenner & Tao, 2013; Hundt ve ark., 2009; Tsai ve ark., 2011).

Görüntüleme Yöntemleri: Tümör boyutu, çevre dokulara yayılımı ve tedaviye verilen yanıtını belirlenmesi amacıyla için başta manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve bilgisayarlı tomografi (BT) gibi temel görüntüleme tekniklerine ek olarak pozitron emisyon tomografisi (PET) ve transrektal ultrasonografi (TRU) gibi ileri görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. En yaygın invaziv yöntemlerden olan kolonoskopi ise, kolonun doğrudan görsel incelemesini ve biyopsi örneği alınmasını sağlamaktadır (Danese ve ark., 2019). Ayrıca, kolonda daha sınırlı bir alanı tarayan sigmoidoskopi ve yutulabilir kapsül endoskopisi gibi alternatif yöntemler de bulunmaktadır (El Messaoudi ve ark., 2013).

2.1.7. Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavilerinde temel yaklaşım; cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve palyatif bakım olup, bu yöntemler hastanın klinik durumu ve tümörün evresine göre tek başına veya kombine şekilde uygulanmaktadır. Ancak bu tedavilerin çeşitli yan etkileri bulunmaktadır ve bunlar arasında en ciddi olanı, ikincil kanser gelişme riskidir (Yildizhan ve ark., 2018).

Diğer birçok kanser türünde olduğu gibi, KK erken evrelerinde de standart tedavi yaklaşımı; primer tümör dokusu ve bölgesel lenf nodlarının cerrahi yolla çıkarılmasıdır.

Bu cerrahi müdahaleyi takiben bazı hastalarda sekiz haftaya kadar adjuvan kemoterapi uygulanmaktadır (Costas-Chavarri ve ark., 2019; Labianca ve ark., 2013).

Evre II ve III KK hastalarında sıklıkla kullanılan 5-fluorourasil'in (5-FU) kemoterapi ajanı, tek başına uygulandığında sınırlı düzeyde etkili olmaktadır. Kombinasyon tedavileri ile etkinliği artırılrsa da, genel başarı oranları istenen seviyeye ulaşamamıştır (D. Y. Zhang ve ark., 2008). Tümörün yapısal ve fizyolojik özellikleri, bu durumu doğrudan etkilemektedir. Tümör dokusundaki yüksek hidrostatik basınç gibi faktörler, ilaçların dağılmasını ve terapötik etkinliğini sınırlamaktadır. Ayrıca, ilaçların çevre dokulara sızması sonucu etkinliğinin azalmasında tümördeki yetersiz lenfatik drenaj sistemi de en büyük etmendir (Jain, 2001; Reddy, 2005).

Kemoterapi ajanlarının başarısızlığında etkili olan diğer başlıca faktörler aşağıda sıralanmıştır (Arias, 2008; Durán ve ark., 2008):

- Kısa plazma yarı ömürleri nedeniyle yüksek doz ve sıkı uygulama gerektirmeleri,
- Sistemik biyodağılımın artması sonucunda hedef dışı organlarda toksisite gelişimi,
- Tümör hücrelerine özgü seçiciliğin düşük olması,
- Kanser hücrelerinde zamanla gelişen çoklu ilaç direnç mekanizmaları,
- Hidrofobik yapıya sahip ajanların hedef dokuya yeterli oranda ulaşamaması.

İleri evre KK hastalarında tedavi planı, tümör yayılımı ve hastanın genel sağlık durumuna göre şekillenmektedir. Bağırsaklarda, tümöre bağlı gelişen tıkanık ya da kanama gibi durumlarda palyatif cerrahi yöntemi seçilmektedir. Ayrıca, hastalara yüksek teknik başarı oranı ve minimal invaziv özelliği sayesinde kolonik stent uygulamaları da önerilmekte olup, hastanede yatış süreleri kısaltmaktadır (Borowiec ve ark., 2016).

KK tedavisi, hastalığın ilerleyen evrelerinde tümörün biyolojik yapısı, gelişen ilaç direnci ve fizyolojik bariyerler nedeniyle giderek karmaşık hale gelmekte ve tedavi başarısı azalmaktadır. Bu nedenle, en etkili ve sürdürülebilir yaklaşım hastalığın erken dönemde saptanmasıdır. Düzenli tarama programlarına katılım ve yaşam tarzı risk faktörlerinin azaltılması, zorlu tedavi süreçlerine kıyasla hem daha uygulanabilir hem de daha etkilidir.

2.2. Kolon Kanseri Biyobelirteçleri

Moleküler biyobelirteçler, KK’de tedaviye verilen yanıtın izlenmesi ve prognostik değerlendirme açısından klinik pratikte oldukça önemlidir. Ancak, mevcut biyobelirteçlerin duyarlılık ve özgüllükleri sınırlıdır. Bu sebeple, erken tanı ve uygun tedavi stratejisi açısından daha yüksek doğruluk oranlarına sahip yeni nesil biyobelirteçlerin geliştirilmesi gerekmektedir (Bustin & Dorudi, 2004; Schirripa & Lenz, 2016).

2.2.1. Kolon Kanserinde Doku Bazlı Biyobelirteçler

Aşağıda, KK tanı ve tedavisinde sıkça kullanılan doku bazlı biyobelirteçler özetlenmiştir:

1) *Kirsten Rat Sarkoma Viral Onkogen (KRAS)*

KRAS geni, mutasyona uğradığında sürekli aktif hale gelerek; tümör oluşumu ve metastatik yayılımı neden olması dışında özellikle *Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)* hedefli tedavi direnç gelişimini de sağlamaktadır (M. Meng ve ark., 2021; VanSchaeybroeck ve ark., 2014). Birçok kanser türünde %30 oranlarına kadar tespit edilen *RAS* gen mutasyonları arasında en sık görüleni ise yaklaşık %86 oranıyla *KRAS*’tır (Cox ve ark., 2014). Bu onkogende meydana gelen mutasyonlar, sporadik KK vakalarının yaklaşık %50’sinde gözlemlenmektedir (Andreyev ve ark., 1998; Fodde ve ark., 2001).

2) *V-Raf Fare Sarkomu Virüs Onkogeni Homoloğu B1 (BRAF) Geni*

BRAF gen mutasyonları, tüm kanser türlerinin yaklaşık %7’sinde görülmektedir (Cantwell-Dorris ve ark., 2011). *BRAF* mutasyonlu KK vakaları, genellikle sağ kolon yerleşimli tümörlerle ilişkilidir. Bu tür vakalar ileri yaş grubunda ve kadın bireylerde daha sık gözlenmekte olup, tekrarlama eğilimleri yüksektir (Barras, 2015). Metastatik KK olgularında ise bu gen mutasyonuna rastlama oranı ortalama %10’dur. Bu mutasyonlar özellikle evre II ve ileri evre hastalarda kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilmektedir (Markowitz & Bertagnolli, 2009).

3) *Adenomatöz Polipozis Koli (APC) Geni*

APC geni *WNT* sinyal yolunun kontrol ederek, çeşitli hücresel süreçlerde görev alan bir tümör baskılayıcıdır (Liang ve ark., 2013). *APC* genindeki mutasyonlar, intestinal epitel hücrelerinde anormal proliferasyonu tetiklemektedir. Bu sayede, hücresel farklılaşma baskılanmakta ve çeşitli onkogenler aktive olmaktadır. Bu mutasyonlar,

sporadik KK olgularında ve kalıtsal *FAP* sendromunda sıkça görülmektedir (Fearon & Vogelstein, 1990; Szvicsek ve ark., 2019). Çeşitli çalışmalarda, KK hastalarının yaklaşık %80'inde *APC* gen mutasyonu saptanmıştır (Hamilton ve ark., 1994).

2.2.2. Kolon Kanserinde Epigenetik Biyobelirteçler

1) *CpG Adacığı Metilatör Fenotipi (CIMP)*

KK'de yüksek düzeydeki metilasyon ile karakterize edilen *CpG Adacığı Metilatör Fenotipi (CIMP)*, özellikle kadın bireylerde daha sık görülmekte ve *BRAF* mutasyonlarıyla anlamlı bir ilişki göstermektedir. Bu fenotipe sahip tümörler; proksimal kolon yerleşimi, yüksek dereceli diferensiyasyon, belirgin müsin üretimiyle karakterize edilmektedir (Issa, 2008; Wheeler ve ark., 2000).

2) *Mikrosatellit İnstabilitesi (MSI)*

MSI moleküler anormalliği, genetik materyaldeki kısa tekrar dizilerinde meydana gelen değişikliklerle karakterize olup, Bu durum, temel *MMR* genlerindeki mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır (Ward ve ark., 2001). Özellikle kalıtsal KKK vakaları, MSI ile ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte, sporadik KKK vakalarının yaklaşık %15'inde yüksek düzeyde MSI tespit edilmektedir (Grady & Carethers, 2008).

3) *miRNA*

Yaklaşık 20 ila 24 nükleotid uzunluğunda olan ve protein kodlamayan kısa RNA molekülleri olan miRNA'lar, genellikle hedef genlerin 3' uçtaki çevrilmemiş bölgelerine (UTR) bağlanırlar. Etkilerini, gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyerek ve hücrel pek çok biyolojik süreci kontrol ederek gösterirler (Bartel, 2004; Stiegelbauer ve ark., 2014).

miRNA'lar, kanser biyolojisinde hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı rollerde yer alabilmektedir (Garzon ve ark., 2009). Her bir miRNA teorik olarak birçok farklı geni düzenleyebilme potansiyeline sahiptir. Ancak, yüksek çözünürlüklü analizler yalnızca sınırlı sayıdaki miRNA'nın, KK dahil çeşitli tümörlerde doğrudan düzenleyici bir rol üstlendiğini göstermektedir (Krichevsky & Gabriely, 2009; X. Meng ve ark., 2013). Bu moleküllerin biyobelirteç olarak dikkat çekmesinin başlıca nedenleri şunlardır:

- Yüksek yapısal stabiliteleri sayesinde laboratuvar ortamında kolayca korunabilirler,
- Küçük boyutları ve saç tokası şeklindeki yapıları sayesinde RNaz enzimlerine karşı dirençlidirler,
- Vücut sıvılarında lipoproteinler, eksozomlar vb. aracılığıyla taşındıklarından, hem dokulardan hem de sıvı biyopsilerden güvenli şekilde izole edilebilirler (Creemers ve ark., 2012).

Çeşitli çalışmalar, KRK ile ilişkili olarak 500'ün üzerinde miRNA'nın düzensiz şekilde eksprese olduğunu bildirmiştir. Örneğin; *miR-29a* ve *miR-92a*, erken KRK tanısı için umut vaat eden biyobelirteçler arasında yer almaktadır (X. Chen ve ark., 2008). KRK vakalarında *miR-103a-3p*, *miR-106b-5p* ve *miR-20a-5p* gibi miRNA'ların hastalığın ilerleyişine göre yüksek ve düşük riskli grupları ayırt etme potansiyeli taşıdığı görülmüştür (Weissmann-Brenner ve ark., 2012). Fonksiyonel deneylerde, örneğin *miR-508*'in, KRK hücrelerinde progresyonu baskıladığı, ayrıca hasta sağkalımıyla pozitif ilişki gösterdiği bulunmuştur. Bu özellikleriyle bahsi geçen miRNA, KRK'nin kök hücre benzeri alt türlerine yönelik potansiyel bir tedavi hedefi olarak değerlendirilmektedir (T. Yan ve ark., 2018). Vahşi tip *KRAS* genine sahip metastatik KRK hastalarında ise, *miR-125b* ve *miR-99a*, erken tanıda kullanılabilecek aday biyobelirteçler olarak gösterilmiştir. Öte yandan *miR-181a* düzeyinin azaldığı hastalarda, kötü klinik sonuçlarla daha sık karşılaşılmıştır (Huynh ve ark., 2011). Bir diğer çalışmada ise, *miR-3622a-3p*'nin, *SALL4* gen ifadesini baskılayarak, KRK progresyonunu ve metastazını engellediği ortaya koyulmuştur (Chang ve ark., 2020).

2.2.3. Kolon Kanserinde Diğer Potansiyel Biyobelirteçler

1) Fosfatidilinozitol-3-kinazlar (PI3K)

PI3K onkogeni pek çok solid tümörde mutasyona uğramaktadır (Samuels ve ark., 2004). KRK vakalarında bu mutasyonlara ortalama %15 oranında rastlanmakta olup, özellikle yüksek derece *CIMP* ile birlikte görülme eğilimi bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, kötü prognozla ilişkili etkisinin yalnızca vahşi tip *BRAF* tümörlerde anlamlı olduğu vurgulanmıştır (Rosty ve ark., 2013). Genin, spesifik olarak 9. ve 20. ekson bölgelerinin her ikisinde de mutasyon görülmesi, KRK vakalarında daha agresif hastalık seyriyle ilişkilendirilmektedir (Liao ve ark., 2012; Zhao & Vogt, 2008).

2) Fosfataz ve Tensin Homologu (PTEN) Geni

PTEN tümör baskılayıcı geninin ekspresyon düzeyinde gözlenen azalma, birçok KRK vakasındaki uzak metastaz ve sağkalım oranlarında anlamlı düşüş ile ilişkilendirilmiştir (Neumann ve ark., 2013; Tural ve ark., 2014). Ayrıca, bu gendeki mutasyonlar, Cowden sendromu gibi ciddi kalıtsal hastalıklara yol açmaktadır. Bu mutasyona sahip bireylerin; meme, KRK ve tiroid kanserlerine yakalanma riski de oldukça yüksektir (Milella ve ark., 2015). KRK bağlamında yapılan çalışmalarda, hastaların yaklaşık %35'inde *PTEN* gen ekspresyon kaybı tespit edilmiştir. (Lin ve ark., 2015). Bu kayıp, özellikle metastatik KRK olgularında anti-*EGFR* temelli tedavi yaklaşımlarına direnç gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla *PTEN* geninin ekspresyon düzeyinin değerlendirilmesi, hem hasta prognozunun belirlenmesi hem de tedavi planının şekillendirilmesi açısından klinik olarak büyük önem taşımaktadır (Sood ve ark., 2012).

3) Tümör Proteini 53 (Tp53) Geni

Tümör Proteini 53 (TP53) geni, önemli tümör baskılayıcı genler arasında yer almaktadır ve bu genin mutasyonu, KRK vakalarının %60'ından fazlasında saptanmıştır (Huh ve ark., 2013; Neal ve ark., 2006). Bazı araştırmalar, özellikle 3. evre KRK hastalarında *TP53* gen ekspresyon düzeyinin, hastalığını prognozunu belirlemede potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini ileri sürmektedir (Tzeng ve ark., 2013).

4) N-deasetilaz/N-sülfotransferaz 4 (NDST4) Geni

Hücre dışı matriks bileşenlerinden biri olan *NDST4* geni; sinyal iletimi, adezyon gibi birçok hücresel süreçte görev almaktadır (Kjellén, 2003). Tzeng ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada bu gen, KRK'de yeni bir tümör baskılayıcı aday olarak değerlendirilmiştir. Araştırmada, tümör dokularındaki gen ekspresyon düzeyinin, normal dokular kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı belirtilmiştir (Tzeng ve ark., 2013).

5) Kromozom 18q Heterozigotluğunun Kaybı

KRK'de sık rastlanan genetik değişimlerden biri olan kromozomal instabilite, belirli kromozomal bölgelerde yer alan tümör baskılayıcı genlerin kaybına neden olmakta ve tümör gelişiminde önemli bir rol üstlenmektedir (Jen ve ark., 1994; Watanabe ve ark., 2001). Bu tür bir kaybın tespiti için çoğunlukla bireyin tümör dokusu ile normal

dokusundaki alleller karşılaştırılmaktadır. Eğer tümör dokusunda normal dokuda bulunan allellerden biri kayıpsa, bu durum heterozigot kaybı olarak tanımlanmakta ve DNA düzeyinde bir silinmeyi işaret etmektedir (Bertagnolli ve ark., 2011). Özellikle kromozom 18q'daki veya 8p'deki heterozigotluk kaybının, KRK hastalarında kötü klinik sonuçlarla ve sağkalım oranlarında yaşanan düşüşlerle ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Jen ve ark., 1994).

6) *İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Tip 1 Reseptörü (IGF-1R)*

IGF-1R, transmembran bir glikoprotein işlevine sahip olup, hücrede büyüme ve hayatta kalma sinyallerinin iletiminde kilit bir rol oynamaktadır. Yüksek *IGF-1R* geninin ekspresyonu, böbrek ve meme tümörleri başta olmak üzere çeşitli tümör tiplerinde yaygın olarak rapor edilmiştir (Baserga, 1999). Bu gen aktivasyonu ile özellikle KRK hücrelerinde *Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)* gen ekspresyon düzeyleri artmaktadır. Bu durum, tümör dokusunda yeni damar oluşumunu teşvik ederek hastalığın progresyonuna önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (D. S. Wang ve ark., 1996; Warren ve ark., 1996).

2.3. Kanser Gelişiminde *SALL* Gen Ailesinin Rolü

Çinko parmak proteinleri, insan genomunda en yaygın bulunan transkripsiyonel düzenleyici protein gruplarından biri olup, çoğunlukla 19q13 kromozomal bölgesinde konumlanmaktadır (Hosoe-Nagai ve ark., 2017). Bu protein yapısına sahip genlerden biri de *Spalt-benzeri* transkripsiyon faktörlerini kodlayan *SALL* gen ailesidir. İnsanlarda dört üyeden oluşan bu aile, *SALL1*, *SALL2*, *SALL3* ve *SALL4* genlerini içermektedir. Evrimsel kökenleri, *Spalt* lokusunda meydana gelen çoğul duplikasyon olaylarına dayanmaktadır (Sweetman & Münsterberg, 2006).

SALL proteinlerinin biyolojik işlevleri; yer aldıkları dokunun yapısal özellikleri, genetik varyasyonlar, epigenetik düzenleyici mekanizmalar ve hangi izoformunun ifade edildiği gibi etkenlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bu nedenle, *SALL* genleri bazı durumlarda tümör baskılayıcı, bazı durumlarda ise onkogen olarak görev alabilir; hatta belirli koşullarda her iki işlevi bir arada üstlenebilirler (Álvarez ve ark., 2021).

2.3.1. *SALL1* Geninin Rolü

SALL1 geni, 16q12.1 kromozomal lokasyonunda bulunmakta ve transkripsiyonel baskılayıcı olarak görev yapmaktadır (Sills & Wood, 2021). Townes–Brocks

sendromunun ortaya çıkmasında etkili olan temel genetik değişiklikler arasında, bu genin heterozigot kayıp-fonksiyon mutasyonları yer almaktadır (Botzenhart ve ark., 2005). Embriyonik gelişim süreci ve kanser oluşumu gibi temel biyolojik olaylarda etkili olan *SALL1* geni, bu etkilerin büyük bir kısmı *Wnt* sinyal iletim yoluyla gerçekleştirmektedir. Bu gen, *nükleozom yeniden şekillendirme ve deasetilazı* adı verilen *NuRD* kompleksini toplayarak gen ekspresyonunu baskılamaktadır. Aynı zamanda eterokromatinle etkileşim kurarak nükleer yapının düzenlenmesine katkı sağlamaktadır (Lauberth & Rauchman, 2006; Sato ve ark., 2004). Bunlara ek olarak, *SALL1* gen promotör bölgesinin metilasyon kaynaklı baskılanmasının, meme ve epitel türevli çeşitli kanserlerde yaygın olarak görüldüğü bildirilmiş; ancak bu epigenetik mekanizmanın tümörleşme sürecine etkisi henüz tam olarak netlik kazanmamıştır (Hill ve ark., 2010).

2.3.2. *SALL2* Geninin Rolü

SALL2 geni, insan genomunda 14q11.1-12 bölgesine yerleşmiş olup, araştırmalar bu genin hücre büyümesi ve farklılaşması üzerinde dengeleyici etkiler gösterdiğini ve potansiyel bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü göstermektedir (D. Li ve ark., 2004). Bulunduğu aile üyeleriyle sınırlı yapısal benzerliğe sahip olmasına karşın, gelişimsel süreçlerde ve genetik hastalıklarda önemli görevleri bulunmaktadır (Hermosilla ve ark., 2017). Bu gen, iki farklı proteine öncülük eden E1 ve E1A adlı izoformları üretmektedir. Aralarındaki temel fark, proteinin baş kısmında bulunan kısa bir amino asit dizisinden kaynaklanmaktadır (Lauberth & Rauchman, 2006). E1 formu, gen ifadesinin baskılayıcı bir bölge taşıdığı için farklı biyolojik etkiler oluşturabilir. Genin ifadesi özellikle beyin dokusunda belirgin düzeyde bulunurken; böbrek, pankreas, yumurtalık ve kalp gibi organlarda daha düşük seviyelerde tespit edilmiştir (Kohlhase ve ark., 2000; D. Li ve ark., 2001). E1A izoformunun birçok dokuda yaygın olarak ifade edildiği, E1'in ise daha çok kolon ve testis gibi spesifik organlarla sınırlı olduğu görülmüştür (Y. Ma ve ark., 2001).

2.3.3. *SALL3* Geninin Rolü

SALL3 geninin embriyolojik gelişim sürecini tam olarak nasıl etkilediği hala net olarak açıklanamasa da, farelerde yapılan gen silme çalışmaları sonucunda sinir sisteminin gelişiminde düzensizliklere ve damak oluşumunda bozukluklara yol açtığı saptanmıştır (Parrish ve ark., 2004). Bazı araştırmalar genin, bağışıklık hücrelerinin tümör mikroçevresine daha etkili şekilde ulaşmasına katkıda bulunarak, antitümör yanıtı

desteklediğini göstermektedir. Bu durum, özellikle immünoterapiler açısından önemli bulguları barındırmaktadır (T. Ma ve ark., 2021). *SALL3* geninin sadece tümör dokularında değil, kanser kök hücrelerinde de düşük ekspresyon düzeyi gösterdiği belirtilmiştir. İlginç biçimde, gen ekspresyonunun artırılmasıyla bağışıklık sisteminin tümöre karşı verdiği yanıtın güçlenebileceği ileri sürülmüştür (H. Zhu & Xie, 2024).

2.3.4. *SALL4* Geninin Rolü

SALL4 geni, embriyonik kök hücrelerde pluripotensi özelliğinin sürdürülmesini sağlarken; hücrelerin kendini yenileme, çoğalma ve farklı hücre türlerine dönüşüm gibi süreçlerinde de görev almaktadır (J. Yang ve ark., 2010; Yuri ve ark., 2009; J. Zhang ve ark., 2006). İnsan genomunda 20q13.2 bölgesinde bulunan *SALL4* geni, iki alternatif formda üretilmektedir: *SALL4A* ve *SALL4B* (Al-Baradie ve ark., 2002a; Uez ve ark., 2008). Özellikle kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücrelerde bu genin yüksek düzeyde çalıştığı tespit edilmiştir (Aguila ve ark., 2011; J. Yang ve ark., 2011, 2012). Genetik düzlemde incelendiğinde ise bu gende meydana gelen bazı değişimlerin, kalıtsal bir sendrom olan Duane radial ray bozukluğuna yol açtığı bilinmektedir. Bu sendrom, uzuvlarda ve kalpte yapısal bozukluklarla kendini gösterebilen nadir bir hastalıktır (Al-Baradie ve ark., 2002).

Normal gelişim süreçlerinde katkıda bulunmasının yanı sıra, bu genin bazı kanser türlerinde kanser oluşumunu destekleyen bir rol üstlendiği bildirilmiştir. İlk olarak lösemi hücrelerinde yüksek ekspresyon düzeyi gösterdiği fark edilmiş ve bu bağlamda bir potansiyele sahip olduğu değerlendirilmiştir (Y. Ma ve ark., 2006). Bazı kanser türlerinde normalde sessiz olan *SALL4* geninin yeniden aktif hale gelmesi, dikkat çekici bir diğer bulgudur. Örneğin, fetal karaciğer dokusunda geçici olarak aktif olan genin, ilerlemiş karaciğer kanserinin agresif alt gruplarında tekrar devreye girdiği görülmüştür (Gilbert, 2013). Benzer şekilde, bazı akciğer ve mide kanseri türlerinde de genin olağandışı derecede aktif olduğu, bunun da kanser progresyonuna katkı sunduğu belirtilmiştir (X. Yuan ve ark., 2016).

2.3.5. *SALL* Gen Ailesiyle İlişkili miRNA'ların Rolü

KRK'de gerçekleştirilen birçok moleküler araştırma, *SALL* gen ailesiyle doğrudan bağlantılı olan çeşitli miRNA'ların varlığını ortaya koymuştur. Örneğin, *miR-181a-2*'nin yüksek düzeyde ifade edildiği durumlarda, *SALL1* gen ekspresyon düzeyinde belirgin azalmalar gözlenmiştir. Ayrıca bu azalma, genin promotör bölgesinde artmış metilasyon

düzeyi ile ilişkilendirilmiştir. Bulgular ilgili miRNA'nın, *SALL1* geni üzerinde transkripsiyonel ve epigenetik düzeyde baskılayıcı etki gösterebileceğine işaret etmektedir (Kondelova ve ark., 2020).

Bir başka çalışmada, *miR-3622a-3p* ve *miR-219-5p*'nin, *SALL4* genini bağlandığı durumlarda, kanser hücrelerinin biyolojik aktivitelerini baskıladığı ortaya konmuştur. Ayrıca, potansiyel birer tümör baskılayıcı rol üstlenebileceği düşünülen bu miRNA'ların, hücre ölümünü desteklediği ve tümörün kök hücre benzeri özelliklerini zayıflattığı da bildirilmiştir (Chang ve ark., 2020).

Bir başka çalışmada, *SALL4* genini doğrudan hedef alarak ekspresyon düzeyini etkileyen miRNA'lar arasında *miR-103*, *miR-195* ve *miR-15b*'nin yer aldığı belirlenmiştir. Bu miRNA'lar yüksek ekspresyon düzeyleriyle ilişkili olan *SALL4* gen ekspresyon düzeyinde de azalmalar gözlenmiştir. Özellikle glioma üzerinde yapılan biyolojik analizler, bu ilişkiyi doğrulamaktadır (L. P. Chen ve ark., 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için gerekli etik kurul onayı, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 25 Kasım 2024 tarihinde yapılan 21. toplantısında alınmıştır. Çalışma, kurul tarafından 2022/1942 protokol numarası ile kayıt altına alınmıştır.

Çalışmanın istatistiksel güvenilirliğini sağlamak için gerekli hasta sayısı, Power and Sample Size programı kullanılarak yapılan güç analizi ile belirlenmiştir. Analizde, istatistiksel güç düzeyi %80, tip I hata oranı %10 ($p=0,1$) olarak ayarlanmıştır. Bu parametrelere göre, çalışma için minimum 23 katılımcının yeterli olacağı hesaplanmıştır. Çalışmaya nihai olarak 25 gönüllü hasta alınmıştır.

Bu çalışmada, kolon kanseri tanısı almış ve daha önce kemoterapi veya radyoterapi gibi herhangi bir tedavi görmemiş 25 hasta incelenmiştir. Her hastadan, hem tümörlü doku hem de aynı hastanın normal doku örneği alınmıştır. Böylece her hasta için tümörlü ve normal doku çiftleri oluşturularak karşılaştırmalı analizler yapılmıştır. Toplamda 50 doku örneği (25 tümör + 25 normal doku) kullanılarak çalışma yürütülmüştür.

Çalışma grubu, 2023-2024 yılları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'na başvuran, radyolojik ve biyopsi bulguları doğrultusunda kesin tanı almış, araştırmaya gönüllü olarak katılmayı kabul eden ve bilgilendirilmiş onam formunu imzalayan hastalardan seçilmiştir.

Çalışmaya dahil edilecek hastaların seçimi için belirlenen kriterler arasında; 18 yaşını doldurmuş olmak, histopatolojik olarak doğrulanmış kolon kanseri tanısı almış olmak, tanıyı belgeleyen bir patoloji raporuna ulaşılabilir olması ve herhangi bir onkolojik tedaviye (kemoterapi veya radyoterapi) başlanmamış olması yer almıştır. Bu ölçütler doğrultusunda, tedavi almamış bireylerden elde edilen örneklerle daha tutarlı ve karşılaştırılabilir bir hasta grubu oluşturulması hedeflenmiştir.

Moleküler analizler, cerrahi operasyon sırasında elde edilen doku örneklerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'na bağlı Kanseri Genetiği Bilim Dalı Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kitler ve Sarf Malzemeler

Tablo 3.1: Kullanılan Kitler

KİTLER	ÜRETİCİ VE KATALOG NUMARASI
miRNeasy Gelişmiş Mini Kit (Doku/Hücre için)	(QIAGEN, 217684, Almanya)
miRNeasy Mikro Kit	(QIAGEN, 217084, Almanya)
QuantiTect Ters Transkripsiyon Kiti	(QIAGEN, 205311, Almanya)
miRCURY LNA Ters Transkripsiyon Kiti	(QIAGEN, 339340, Almanya)
miRCURY LNA miRNA PZR Analiz Kiti	(QIAGEN, 339306, Almanya)
QIAcuity EvaGreen (EG) PZR Kiti	(QIAGEN, 250111)
QIAcuity 8.5k - 96 kuyucuklu plaka	(QIAGEN, 250021, Almanya)

3.1.2. Cihazlar

Tablo 3.2: Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

EKİPMAN	ÜRETİCİ
QIAcuity One Dijital PZR Cihazı (Şekil 3.1)	QIAGEN, Almanya
Doku Parçalama Cihazı	QIAGEN
Santrifüj Cihazı	JOUAN B4i
NanoDrop Spektrofotometre	Thermo Scientific NanoDrop One C
Vorteks Karıştırıcı	Nüve NM 110
+4°C Laboratuvar Tipi Buzdolabı	Vestel
-80°C Derin Dondurucu	Sanyo
Termal Döngü Cihazı (Şekil 3.2)	BIORAD T100 Termal Cyclers
Mikropipet Seti	Gilson, Eppendorf



Şekil 3.1: QIAcuity One Dijital PZR Cihazı (QIAGEN).



Şekil 3.2: Termal Döngü Cihazı (T100 Thermal Cycler, BIORAD).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Dokuların Eldesi ve Saklanması

Kolon kanserine yönelik cerrahi işlem sonrası elde edilen rezeksiyon örnekleri, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda henüz fikse edilmeden, taze halleriyle uygun koşullarda işleme alındı. Tümörlü bölge belirlendikten sonra, kanama veya doku ölümü göstermeyen canlı alandan yaklaşık 3-5 mm boyutunda bir parça alındı ve buna karşılık aynı hastaya ait tümör dışı, komşu normal kolon dokusundan da benzer boyutta ikinci bir örnek toplandı. Her iki doku örneği, RNA bütünlüğünün korunması amacıyla RNAlater çözeltisi içerisine yerleştirilerek saklandı.

Analiz sürecinde kullanılmak üzere, RNAlater çözeltisinde stabil halde tutulan doku örnekleri, steril penset yardımıyla dikkatlice alınarak uygun hacimdeki eppendorf tüplerine aktarıldı. Ardından, örneklerin bozulmadan muhafaza edilebilmesi için -80°C sıcaklıktaki derin dondurucuda saklamaya alındı ve Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji

Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Laboratuvarları'ndaki gerçekleştirilecek analiz işlemi için hazırlandı.

3.2.2. Dokudan Total RNA İzolasyonu

- 1) Kit içeriğinde yer alan ve dokuyu parçalama işlemini kolaylaştırmak amacıyla seramik tanecikler içeren parçalama tüplerinin üzerine, her hastaya özgü tanımlayıcı bir kod yazıldı. Daha sonra her tüpün içine 450 µL Buffer RLT tamponu eklendi.
- 2) Yaklaşık 30 mg'ı geçmeyen doku parçaları, saklandıkları tüplerden steril penset yardımıyla alınarak parçalama işlemi için hazırlanan tüplere aktarıldı. Eğer doku örneği bu sınırdan daha büyükse, düz ve sert bir yüzey alüminyum folyo ile kaplanarak alkolle temizlendi; ardından doku, steril bisturi kullanılarak küçük parçalara ayrıldı. Kesilen her bir parça, penset yardımıyla parçalama tüplerine dikkatlice yerleştirildi.
- 3) Hazırlanan parçalama tüpleri, dengenin sağlanabilmesi için doku parçalama cihazının karşılıklı bölmelerine yerleştirildi. Parçalama işlemi ilk olarak 40 Hz hız ayarında ve 30 saniye boyunca çalıştırılarak uygulandı. İşlem sonrasında dokunun tamamen ayrılmadığı durumlarda, cihaz tekrar çalıştırılarak bu kez 50 Hz hız ayarında ve yine 30 saniyelik süreyle ikinci bir parçalama işlemi gerçekleştirildi.
- 4) Doku örneğinin tamamen parçalandığı kontrol edildikten sonra, tüp içerisine 140 AL tamponu eklendi. Karışımın eşit şekilde dağılması için tüp birkaç kez elde çalkalanarak homojen hale getirildi.
- 5) Hazırlanan karışım, oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi. Bu sürenin ardından, tüpteki sıvının dibe toplanması amacıyla kısa süreli bir santrifüj işlemi uygulandı.
- 6) Devam eden aşamada, kitle birlikte gelen gDNAeliminator mini spin kolon tüplerinin üzerine, örneklerin karışmaması için her hastaya ait tanımlayıcı kod yazıldı.
- 7) Parçalama tüpünde homojenize hale gelmiş lizat, üst kısmında oluşan köpük tabakasının alınmamasına dikkat edilerek, 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş gDNA eliminator spin kolona aktarıldı. Ardından, kolonun içeriği 10.000 rpm hızında 30 saniye süreyle santrifüj edildi.

- 8) Santrifüj işlemi sonrasında, kolonda bir miktar sıvı kaldığı durumlarda, bu sıvının tamamen süzülmesini sağlamak amacıyla işlem 12.000 rpm hızında ve 30 saniye süreyle tekrar edildi.
- 9) DNA materyali taşıyan üstteki kolon kısmı ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, RNA'yı içeren yaklaşık 600 µL'lık alt faz, yeni bir 2 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Tüplerin karışmasını önlemek amacıyla, yeni tüp üzerine ilgili hastaya ait tanımlayıcı kod dikkatlice yazıldı.
- 10) Bu aşamada tüpün içine 20 µL RPP tamponu eklendi ve kapağı kapatıldı. Ardından, karışımın homojen hale gelmesi için tüp 20 saniye boyunca vorteks cihazında çalkalandı.
- 11) Tüpler oda sıcaklığında 3 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, 12.000 rpm hızda ve yine 3 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 12) Santrifüj işlemi sonucunda, tüp içerisinde çökelti ve sıvı üst faz olmak üzere iki faz oluştu. Pipet yardımıyla yaklaşık 300 µL'lık üst faz dikkatlice alınarak, yeni bir 2 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Her tüpün üzerine ilgili hastayı tanımlayan kod yazılmıştır.
- 13) Yıkama işlemi için tüp içine 300 µL izopropanol alkol ilave edildi. Karışımı tamamen homojenleştirmek amacıyla pipetleme yöntemiyle birkaç kez karıştırıldı.
- 14) Kit içerisinde yer alan RNA easy mini spin kolonlara, yine hastaya ait tanımlayıcı kod yazıldı. Hazırlanan yaklaşık 700 µL'lık karışım, bu kolona transfer edildi ve kapağı kapatıldıktan sonra 10.000 rpm hızında, 15 saniye boyunca santrifüj edildi. Bu işlemden sonra tüpün alt fazı uzaklaştırıldı.
- 15) Kolon filtrasyon kısmına 700 µL RWT tamponu ilave edildi ve ardından 10.000 rpm hızda 15 saniyelik kısa bir santrifüj uygulandı. Sürecin sonunda, alt faz atıldı.
- 16) Devamında kolona 500 µL RPE tamponu ilave edildi. Aynı santrifüj koşullarında, yani 10.000 rpm hızda 15 saniye, işlem uygulandı ve alt faz tekrar uzaklaştırıldı.
- 17) Kolona 500 µL %80 etanol eklendi. Bu kez, santrifüj 2 dakika boyunca 10.000 rpm hızında sürdürüldü, ardından alt faz ortamdan uzaklaştırıldı.

- 18) RNeasy mini santrifüj kolon, üzerinde hastaya ait tanımlayıcı kod yazılan 1.5 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolon filtre kısmına 40 µL RNA içermeyen su eklendi.
- 19) Su eklendikten sonra, kolon 1 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi; ardından, kapak kapatılarak 10.000 rpm hızında 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem ile RNA'nın alt tüpe geçmesi (elüsyon) sağlandı.
- 20) RNA'nın kolon filtresinden tamamen ayrılmasının ardından, filtre atıldı ve tüpte kalan çözeltideki RNA'nın niceliksel değerlendirmesi Nanodrop cihazı ile yapıldı. Ölçümler tamamlandıktan sonra elde edilen RNA, cDNA sentezi yapılarına kadar -80 °C'de saklanmak üzere derin dondurucuya yerleştirildi.

3.2.3. NanoDrop Cihazı ile RNA Saflık ve Konsantrasyon Ölçümleri

Elde edilen RNA örneklerinin kalitesini ve saflığını değerlendirmek için, her örnekten 1 µL alınarak Nanodrop 2000 spektrofotometre (Thermo Scientific) cihazı ile ölçüm gerçekleştirildi. RNA'nın miktarı ve saflığı, 260/280 ve 260/230 nanometre dalga boylarındaki absorbans oranlarına göre değerlendirildi.

260/280 oranının yaklaşık 2.0 civarında olan RNA örneği ve 260/230 absorbansı yaklaşık 2.0-2.2 aralığında olan RNA örneği, saf, uygun ve ileri moleküler analizler için uygun nitelikte kabul edildi.

3.2.4. cDNA'nın Sentezlenmesi

İzolasyonu tamamlanan total RNA örneklerinin, mRNA ve miRNA düzeyinde analiz edilebilmesi için dönüştürme işlemleri iki farklı yöntem kullanılarak yürütüldü.

3.2.4.1. mRNA'dan cDNA Sentez İşlemi

Bu aşamada, mRNA moleküllerinin cDNA'ya dönüştürülmesi için QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) kullanıldı.

- 1) Derin dondurucuda -80 °C'de muhafaza edilen toplam RNA örnekleri, çözünme sırasında buz üzerinde bekletilerek çözdürüldü. Aynı anda kit içeriğinde bulunan ters transkriptaz enzimi, RT primer karışımı, RT tamponu ve RNaz içermeyen saf su ise oda sıcaklığında çözündürülerek işlem öncesi hazırlandı. Sentez sürecinde tüm bileşenlerle birlikte çalışılırken her adım buz üzerinde yürütüldü.

- 2) Kullanılacak RNA örnekleri, her biri 50 ng/ μ L konsantrasyona seyreltilerek, cDNA sentezine uygun hale getirildi.
- 3) Sentez işleminden önce, olası genomik DNA kontaminasyonunu engellemek amacıyla Wipeout tamponu kullanılarak DNA uzaklaştırma işlemi uygulandı.
- 4) Her bir örnek için toplam 14 μ L hacminde olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışımdaki bileşenlerin miktarları Tablo 3.3'te belirtildi. Bu reaksiyon karışımı, 42 °C sıcaklıkta 2 dakika boyunca BIO-RAD T100 termal döngü cihazında inkübe edilerek ilk aşama tamamlandı.

Tablo 3.3: gDNA Eliminasyonu için Kullanılan Bileşenler

Bileşenler	Miktar
gDNA Wipeout Tamponu, 7X	2 μ L
RNA örneği	2 μ L
RNaz içermeyen su	10 μ L

- 5) DNA uzaklaştırma adımının tamamlanmasının ardından, tüpler buz üzerine alınarak ters transkripsiyon sürecine geçildi. Bu aşama için gerekli olan tüm bileşenler, Tablo 3.4'te belirtilen miktarlara göre, buz üzerinde hazırlandı ve her bir örnek için toplam 20 μ L reaksiyon hacmi oluşturulacak şekilde eppendorf tüp içerisinde bir master karışım hazırlandı.

Tablo 3.4: Ters Transkripsiyon İşleminde Kullanılan Bileşenler

Bileşenler	Miktar
Quantiscript Ters Transkriptaz Enzimi	1 μ L
Quantiscript RT Tamponu, 5X	4 μ L
Ters Transkripsiyon Primer Karışımı	1 μ L
Örnek RNA (eliminasyon tüpünün tamamı olacak şekilde)	14 μ L

- 6) Hazırlanan reaksiyon karışımı, ters transkripsiyon işlemi gerçekleştirmek amacıyla BIO-RAD T100 Termal Döngü cihazında; ilk olarak 42 °C sıcaklıkta 15 dakika, ardından enzim inaktivasyonu için 95 °C'de 3 dakika süreyle inkübasyona tabi tutuldu.

- 7) İşlem sonrasında elde edilen cDNA örneklerinin bütünlüğünü korumak ve dPZR analizlerinde kullanılmak üzere uygun şekilde -80°C 'de derin dondurucuda muhafaza edilmesi sağlandı.

3.2.4.2. miRNA'dan cDNA Sentez İşlemi

Bu işlem için, QIAGEN firmasına ait miRNACury LNA RT Kit kullanıldı. İşlem esnasında, malzemeler ile buz üzerinde çalışılmasına dikkat edildi.

- 1) Her bir RNA örneği $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ konsantrasyonda olacak şekilde seyreltildi ve ardından her bir örnek için $10\text{ }\mu\text{L}$ 'lik toplam hacmine sahip ters transkripsiyon karışımı hazırlandı. Bu karışımda kullanılan bileşenler, $200\text{ }\mu\text{L}$ hacminde eppendorf tüp içine Tablo 3.5'te yer alan oranlarda eklendi.

Tablo 3.5: Ters Transkripsiyon İşleminde Kullanılan Bileşenler

Bileşenler	Miktar
5X miCURY RT Reaksiyon Tamponu	$2\text{ }\mu\text{L}$
10X miCURY RT Enzim Karışımı	$1\text{ }\mu\text{L}$
RNaz içermeyen su	$5\text{ }\mu\text{L}$
RNA örneği ($5\text{ ng}/\mu\text{L}$)	$2\text{ }\mu\text{L}$

- 2) $10\text{ }\mu\text{L}$ hacmindeki bu karışım, ilk olarak 60 dakika boyunca 42°C 'de inkübasyona bırakıldı. Bu aşamadan sonra enzim aktivasyonunu tamamlamak amacıyla karışımın 95°C 'de 5 dakika boyunca inkübasyonu sağlandı.
- 3) Inkübasyonun ardından, 4°C 'ye soğutma işlemi uygulanarak reaksiyon sonlandırıldı. Elde edilen cDNA'lar, analizlerde kullanılmak üzere -80°C 'deki dondurucuda saklandı.

3.2.5. Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyon (dPZR) İşlemi

3.2.5.1. mRNA Ekspresyonunda Kullanılan dPZR İşlemine Hazırlık Aşaması

Bu işlem için QIAGEN firmasına ait QIAquity EvaGreen (EG) PZR kiti kullanıldı.

- 1) Liyofilize halde bulunan *SALL* gen ailesi üyeleri (*SALL1*, *SALL2*, *SALL3* ve *SALL4* genleri) ve *GAPDH* referans geni, her biri için $440\text{ }\mu\text{L}$ nükleaz içermeyen su ile vortekslenerek çözünmesi sağlandı. Ardından her birinden $44\text{ }\mu\text{L}$ olacak şekilde 10 ayrı tüpe paylaştırıldı.

- 2) Elde edilen cDNA'lar, deney sürecine doğrultusunda 1:40 oranında sulandırılarak kullanıma hazır hale getirildi.
- 3) 12 µL hacminde dPZR karışımı hazırlamak için Tablo 3.6'da belirtilen bileşenler buz üzerinde çözündürüldü ve pipetleme sırasında herhangi bir hataya yer vermemek adına tüp sayısından %10 fazla olarak hazırlanarak tek bir tüpte homojenleştirildi.

Tablo 3.6: mRNA Ekspresyonunda Kullanılan dPZR Bileşenleri

Bileşenler	Miktar
3X EvaGreen PZR Master Karışımı	4 µL
10X Primer Karışımı	0.8 µL
RNaz içermeyen su	4.2 µL
cDNA örneği	3 µL

3.2.5.2. miRNA Ekspresyonunda Kullanılan dPZR İşlemine Hazırlık Aşaması

Bu işlem için miRNACURY LNA miRNA PCR Assay Kiti kullanıldı.

- 1) Liyofilize halde bulunan miRNA primerleri (*miR-5688*, *miR-1305*, *miR-130a-5p* ve *miR-1226-3p*) ve *U6* referans geni, her biri 220 µL nükleaz içermeyen saf su ile çözündürüldü ve bu çözeltiler homojen hale getirilmesi amacıyla vortekslendi. Elde edilen çözeltiler, her biri 22 µL olacak şekilde 10 ayrı tüpe paylaştırıldı.
- 2) Kullanılacak cDNA'lar, deney sürecine uygun olarak *U6* ve *miR-5688*, *miR-1305*, *miR-130a-5p* ve *miR-1226-3p* primerleri ile kullanılacak örnekler için 1:20 oranında sulandırıldı.
- 3) dPZR uygulaması için gerekli olan 12 µL'lik reaksiyon hacmi; Tablo 3.7'de tanımlanan reaktiflerin buz üzerinde çözünmesinin ardından, 200 µL'lik bir eppendorf tüp içinde birleştirilerek hazırlandı.

Table 3.7: miRNA Ekspresyonunda Kullanılan dPZR Bileşenleri

Bileşenler	Miktar
3X EvaGreen PZR Ana Karışımı (yeşil kanal)	4 µL
MiRCURY LNA PZR Testi (10X)	1.2 µL
Nükleaz içermeyen su	3.8 µL
cDNA örneği (1:5 seyreltilmiş)	3 µL

3.2.5.3. Dijital PZR Aşaması

Bu aşamada, mRNA ve miRNA örneklerine ait ekspresyon düzeylerinin analizleri eş zamanlı olarak yürütüldü.

- 1) Her bir reaksiyon karışımı, 96 kuyucuktan oluşan QIAcuity plaka üzerine dikkatlice tek tek aktarıldı. Bu aşamada, örneklerin doğru aktarıldığından emin olunabilmesi adına, mRNA (Şekil 3.3) ve miRNA (Şekil 3.4) analizleri için özel olarak hazırlanmış deney düzen şablonlarından faydalanıldı.
- 2) Numunelerin buharlaşmasını önlemek amacıyla plakanın üstü kit içerisinde yer alan özel sızdırmaz film ile kapatıldı; ardından bu filmin yüzeye tamamen yapışması için üzerine silindir uygulanarak basınç eşitlendi. Hazırlanan plaka, dPZR analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla QIAcuity cihazına yerleştirildi.
- 3) dPZR işlemi, Tablo 3.8’de verilen adımlar doğrultusunda gerçekleşti. Reaksiyonların tamamlanması ardından, olası yeniden okuma gereksinimi göz önünde bulundurularak plakalar +4°C’de buzdolabına konuldu.

Tablo 3.8: Dijital PZR döngü adımları

ADIM	TEKRAR SAYISI		SICAKLIK	SÜRE
PZR Başlangıç Isı Aktivasyonu	1X		95°C	02.00
2 Adımlı Döngü	40X	Denatürasyon	95°C	00.15
		Annealing/Extension	60°C	01.00
Soğutma	1X		40°C	05.00

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1Ç	1T	1Ç	1T	1Ç	1T	1Ç	1T	1Ç	1T		1
B	2Ç	2T	2Ç	2T	2Ç	2T	2Ç	2T	2Ç	2T		2
C	3Ç	3T	3Ç	3T	3Ç	3T	3Ç	3T	3Ç	3T		3
D	4Ç	4T	4Ç	4T	4Ç	4T	4Ç	4T	4Ç	4T		4
E	5Ç	5T	5Ç	5T	5Ç	5T	5Ç	5T	5Ç	5T		5
F	6Ç	6T	6Ç	6T	6Ç	6T	6Ç	6T	6Ç	6T		
G	7Ç	7T	7Ç	7T	7Ç	7T	7Ç	7T	7Ç	7T		
H	8Ç	8T	8Ç	8T	8Ç	8T	8Ç	8T	8Ç	8T		
	GAPDH (Kontrol Geni)		SALL1 Geni		SALL2 Geni		SALL3 Geni		SALL4 Geni		DNA/RNA şablonu içermeyen kontrol grubu	

Ç: Çevre; T: Tümör; 1: GAPDH primeri ile oluşturulan kalıp cDNA içermeyen dPZR reaksiyon karışımı; 2: SALL1 primeri ile oluşturulan kalıp cDNA içermeyen dPZR reaksiyon karışımı; 3: SALL2 primeri ile oluşturulan kalıp cDNA içermeyen dPZR reaksiyon karışımı; 4: SALL3 primeri ile oluşturulan kalıp cDNA içermeyen dPZR reaksiyon karışımı; 5: SALL4 primeri ile oluşturulan kalıp cDNA içermeyen dPZR reaksiyon karışımı

Şekil 3.3: Hedef mRNA'lar için Deney Şablonu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1Ç	1T	1Ç	1T	1Ç	1T	1Ç	1T	1Ç	1T	1	
B	2Ç	2T	2Ç	2T	2Ç	2T	2Ç	2T	2Ç	2T	2	
C	3Ç	3T	3Ç	3T	3Ç	3T	3Ç	3T	3Ç	3T	3	
D	4Ç	4T	4Ç	4T	4Ç	4T	4Ç	4T	4Ç	4T	4	
E	5Ç	5T	5Ç	5T	5Ç	5T	5Ç	5T	5Ç	5T	5	
F	6Ç	6T	6Ç	6T	6Ç	6T	6Ç	6T	6Ç	6T		
G	7Ç	7T	7Ç	7T	7Ç	7T	7Ç	7T	7Ç	7T		
H	8Ç	8T	8Ç	8T	8Ç	8T	8Ç	8T	8Ç	8T		
	U6 (Kontrol Geni)		miR-5688		miR-1305		miR-130a-5p		miR-1226-3p		DNA/RNA şablonu içermeyen kontrol grubu	

Ç: Çevre; T: Tümör; 1: U6 primeri ile oluşturulan kalıp cDNA içermeyen dPZR reaksiyon karışımı; 2: miR-5688 primeri ile oluşturulan kalıp cDNA içermeyen dPZR reaksiyon karışımı; 3: miR-1305 primeri ile oluşturulan kalıp cDNA içermeyen dPZR reaksiyon karışımı; 4: miR-130a-5p primeri ile oluşturulan kalıp cDNA içermeyen dPZR reaksiyon karışımı; 5: miR-1226-3p primeri ile oluşturulan kalıp cDNA içermeyen dPZR reaksiyon karışımı

Şekil 3.4: Hedef miRNA'lar için Deney Şablonu

3.2.6. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada nitel veriler, veri sayısı (n) ve yüzde (%) biçiminde ifade edilirken; nicel verilere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerler olarak sunulmuştur. Analizde, Shapiro-Wilk testi kullanılarak nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu kontrol edilmiştir. Bağımsız iki grup karşılaştırmalarında ise Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Nitel değişkenlerin karşılaştırmalarında ise Pearson ki-kare testi kullanılmış, verilerin durumuna göre de

Fisher'in kesin testi analize dahil edilmiştir. Hedef genler ve miRNA'ların gruplar arası ekspresyonlarının ayırt etme başarısını ölçmek amacıyla ROC (Alıcı İşlem Karakteristikleri) analizi kullanılmıştır. Oluşan ROC eğrilerinde, eğri altında kalan alan (AUC) değerleri hesaplanarak ayırt etme gücü değerlendirilmiştir. Eşik değeri seçiminde optimum dengeyi sağlayan Youden indeksi esas alınmıştır. Nicel değişkenler arası ilişki Spearman korelasyonu ile değerlendirilmiş; analizler SPSS 28.0 ile yapılmış, $p \leq 0,05$ anlamlılık düzeyi esas alınmıştır.

Gen ekspresyon düzeyleri normal dağılım göstermediği için, iki grup arasındaki farkları değerlendirmede Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Bu test, özellikle küçük örneklemelerde veya veriler normal dağılıma uymadığında güvenilir sonuçlar veren parametrik olmayan bir yöntemdir. Testin temel mantığı, verilerin sıralanmasına dayanır ve gruplar arasındaki dağılım farklarının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemektedir.

KK tanısı almış 25 hastanın tümör dokusu ve komşu normal doku örneklerinin incelendiği veriler bağımlı gruplar kapsamında değerlendirilmiştir. Bu nedenle, karşılaştırmalı analizlerde Wilcoxon işaretli sıralar testi tercih edilmiştir. Öte yandan, çalışmada elde edilen miRNA ekspresyon düzeylerinin normal dağılım göstermemesi nedeniyle, bağımsız gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

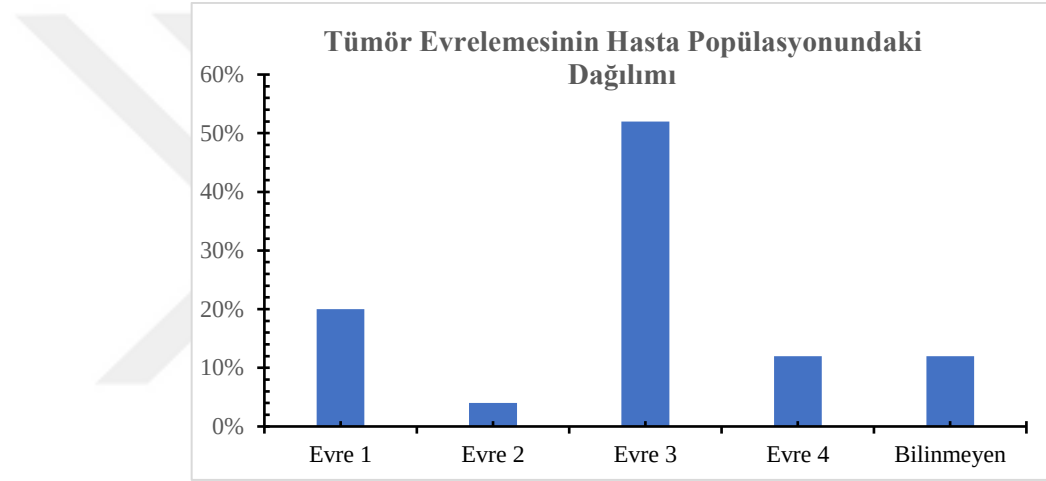
Bu çalışmada ROC analizi, *SALL* gen ailesi ve seçilen miRNA'ların tanısal gücünü değerlendirmek için kullanılmıştır. Bu analiz, yüksek duyarlılık ve spesifite değerlerini grafiksel olarak gösteren istatistiksel bir yöntemdir. ROC eğrisi, eşik değerleri değiştikçe duyarlılık ile $1 - \text{spesifite}$ arasındaki ilişkiyi gösterirken, bu eğri altında kalan alan (AUC) modelin ayırma başarısını ifade eder. AUC değeri 0,5'e yakın olduğunda, testin ayırma gücü rastgele tahmin düzeyindeyken, bu değer 1,0'a yakın olması yüksek doğrulukta ayırt ediciliğe işaret etmektedir. Bu sebeple, ROC analizi sonucu elde ettiğimiz AUC değeri, biyobelirteç potansiyeli ölçülen hedef genlerin ve miRNA'ların sınıflandırma başarısını özetleyen kritik bir göstergedir. Özellikle AUC değerinin 0,7'nin altında kaldığı analizlerde biyobelirtecini ayırt etme kapasitesinin düşük olduğuna işaret edilmektedir. Ek olarak, AUC güven aralığının dar olması, elde edilen sonuçların istatistiksel olarak güvenilir olduğunu vurgulamaktadır.

İki sayısal değişken arasındaki ilişkinin derecesini ve yönünü incelemek için kullanılan yöntemlerden biri korelasyon analizidir. Bu çalışmada, kolon dokusunda ekspresyonu tespit edilebilen gen ve miRNA'lar arasında olası ilişkilerin değerlendirilmesi amacıyla korelasyon analizleri yapılmıştır. Sadece tümör dokusunda ölçülebilir düzeyde ekspresyon düzeyi gösteren *SALL1*, *SALL2*, *SALL3* genleri ile *miR-130a-5p* ve *miR-5688* bu analize dahil edilmiştir. Korelasyon analizinde, değişkenler arası ilişkiyi değerlendirmek amacıyla Spearman korelasyon katsayısı (r) esas alınmıştır. Bu katsayı, -1 ile +1 arasında değer almaktadır. Spearman katsayısı, -1 ile +1 arasında değişen bir değer alır; pozitif değerler değişkenlerin birlikte artma eğiliminde olduğunu, negatif değerler ise birinin artarken diğerinin azaldığını göstermektedir. Katsayı değeri sıfıra yaklaştıkça ilişki daha zayıf, ± 1 'e yaklaştıkça daha güçlü kabul edilir. Bu çalışma kapsamındaki $p < 0,05$ sonuçları anlamlı bulunmuştur.

4. BULGULAR

İstatistiksel analizler ile hastaların klinik özellikleri değerlendirilmiş ve başlıca klinik ve genetik özellikleri aşağıdaki şekilde sıralanmıştır.

25 KK hastasının yaş ortalaması $61,00 \pm 15,03$ olarak hesaplanmıştır. Hastaların %52'sini kadınlar, %48'ini ise erkekler oluşturmaktadır. Hastalarda en yaygın evre, %52 ile 3. evre kolon kanseridir. Bunu sırasıyla %20 ile 1. evre, %12 ile 4. evre ve %4 ile 2. evre takip etmektedir. Hastaların %12'sinde ise kanser evresi belirlenememiştir. Ayrıca, 25 hastanın 19'unda tümör primer (ana) bölgede yer alırken, 3 hastada metastaz (yayılım) tespit edilmiştir. Hasta popülasyonunun demografik verileri Tablo 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: Hasta Popülasyonundaki Tümör Evre Dağılımı

Hastaların %40'ının ailesinde kolon kanseri öyküsü bulunmaktadır. %52'sinde aile öyküsü yoktur, %8'inde ise bu bilgi mevcut değildir. Hastaların %80'i alkol kullanmamaktadır. 12 hasta aktif sigara kullanıcısıyken, 11 hasta hiç sigara kullanmamıştır. 2 hastanın sigara ve alkol kullanım öyküsü bilinmemektedir. Hastalarda en sık görülen şikayetler arasında makattan kanama (dışkıda kan), kabızlık, karın ağrısı, hazımsızlık, halsizlik, ishal (diyare), bel ağrısı ve anemi bulunmaktadır.

Tablo 4.1: Hasta popülasyonunun demografik verileri

DEĞİŞKEN	ALT GRUP	N	%
Cinsiyet	Kadın	13	%52
	Erkek	12	%48
	Var	3	%12
Alkol Kullanımı	Yok	20	%80
	Bilinmeyen	2	%8
	Var	12	%48
Sigara Kullanımı	Yok	11	%44
	Bilinmeyen	2	%8
	Evre 1	5	%20
Tümör Evresi	Evre 2	1	%4
	Evre 3	13	%52
	Evre 4	3	%12
	Bilinmeyen	3	%12
	Metastatik	3	%12
Primer-Metastatik Durum	Primer	19	%76
	Bilinmeyen	3	%12
	Var	10	%40
Aile Öyküsü	Yok	13	%52
	Bilinmeyen	2	%8

N: Örneklem sayısı

4.1. SALL Genlerinin Ekspresyon Analizleri

KK hastalarının tümör ve komşu normal dokusunda *SALL1*, *SALL2* ve *SALL3* genlerinin ekspresyon düzeyleri analiz edilerek karşılaştırılmıştır (Tablo 4.2).

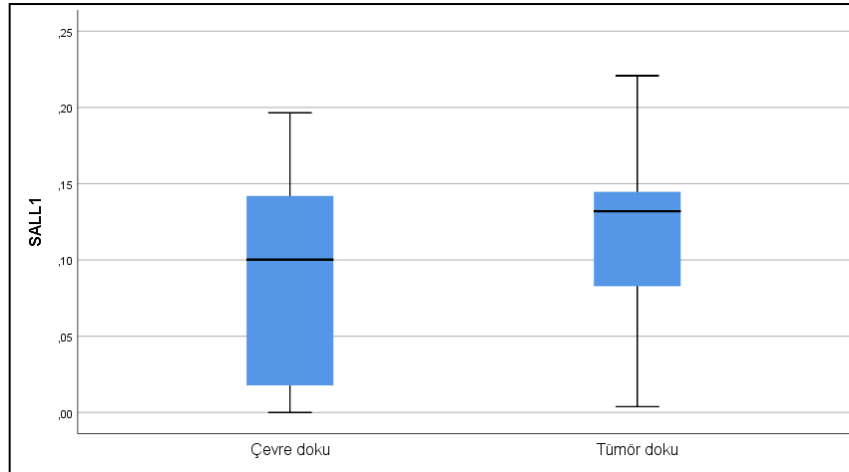
Tablo 4.2: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki *SALL1*, *SALL2* ve *SALL3* Genleri Kopya Sayısı Değerleri.

Gen	Doku Türü	N	Ort. $\pm$ SS	Medyan (Min–Maks)	P Değeri
SALL1	Komşu Normal Doku	25	0,091 $\pm$ 0,066	0,100 (0– 0,200)	0,154

SALL2	Tümör Doku	25	0,120 ± 0,056	0,132 (0–0,220)	<0,001
	Komşu Normal Doku	25	0,046 ± 0,037	0,048 (0,010–0,140)	
SALL3	Tümör Doku	25	0,077 ± 0,022	0,078 (0,030–0,130)	0,008
	Komşu Normal Doku	25	0,068 ± 0,096	0,039 (0,010–0,430)	
	Tümör Doku	25	0,024 ± 0,019	0,022 (0–0,070)	

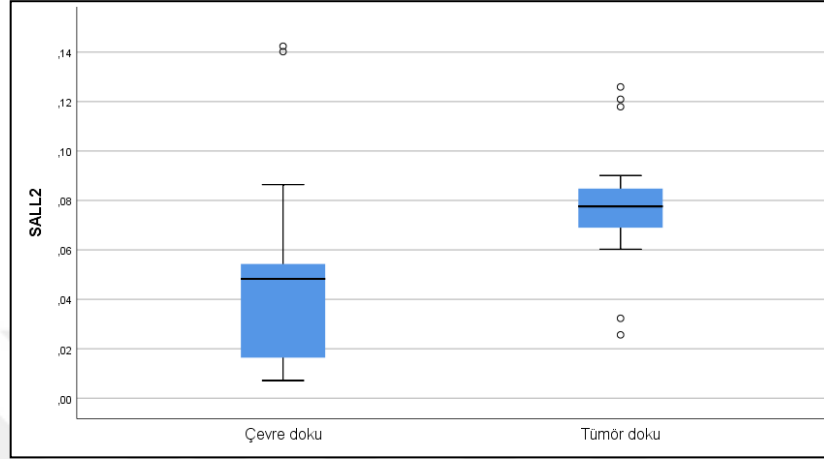
N: Örneklem sayısı; Ort. ± SS: Ortalama ± Standart Sapma; Min–Maks: Minimum–maksimum aralık
Kopya sayısı değerleri GAPDH referans genine göre normalize edilmiştir.

Tümör dokuda *SALL1* geni ekspresyon düzeyi (Ort. ± SS: 0,120 ± 0,056) ile komşu normal dokudaki ekspresyon düzeyi (Ort. ± SS: 0,091 ± 0,066) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır (p=0,154) (Tablo 4.2) (Şekil 4.2).



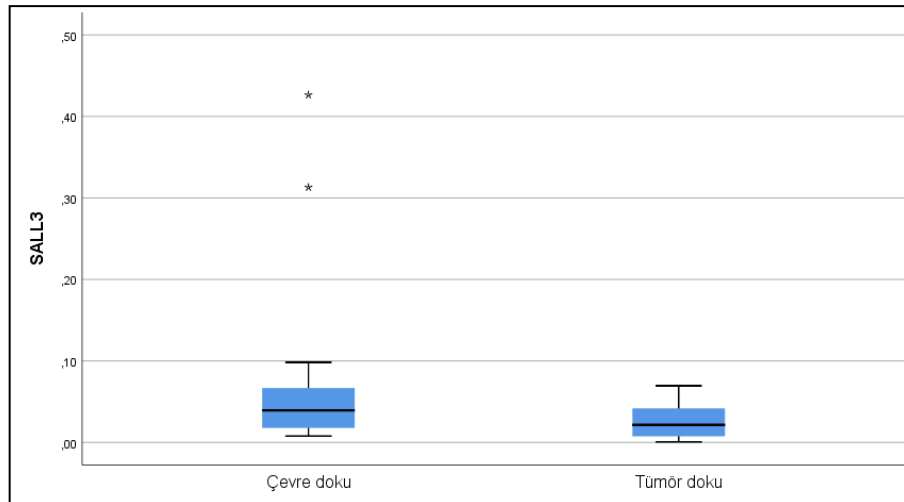
Şekil 4.2: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki *SALL1* Geni Kopya Sayısı Dağılımları.

Tümör dokusunda *SALL2* geni ekspresyon düzeyi (Ort. $\pm$ SS: $0,077 \pm 0,022$) ile komşu normal doku ekspresyon düzeyi (Ort. $\pm$ SS: $0,046 \pm 0,037$) karşılaştırıldığında tümör dokusunda *SALL2* geni ekspresyonu, normal dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış bulunmuştur ($p < 0,001$) (Tablo 4.2) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki *SALL2* Geni Kopya Sayısı Dağılımları.

Tümör dokusunda *SALL3* geni ekspresyon düzeyi (Ort. $\pm$ SS: $0,024 \pm 0,019$) ile komşu normal doku ekspresyon düzeyi (Ort. $\pm$ SS: $0,068 \pm 0,096$) karşılaştırıldığında tümör dokusunda *SALL3* gen ekspresyonu komşu normal dokuya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur ($p = 0,008$) (Tablo 4.2) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki *SALL3* Geni Kopya Sayısı Dağılımları.

Yapılan çalışmada, *SALL4* gen ekspresyon düzeyinin yalnızca 7 hastanın tümör dokusunda ve 4 hastanın komşu normal dokusunda eser miktarda ekspresyon düzeyi tespit edilmiştir. Diğer hastaların tümör ve/veya sağlıklı dokularında *SALL4* gen ekspresyonu olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, yalnızca bir hastada hem tümör hem de komşu normal dokuda eş zamanlı ekspresyon saptanmıştır.

Bu nedenle, veri setinin büyük bir kısmında ekspresyonun tespit edilememesi, istatistiksel analizlerin güvenilirliği açısından *SALL4* geninin analizlerin dışında bırakılmasına neden olmuştur.

4.2. Seçilen miRNA'ların Ekspresyon Analizleri

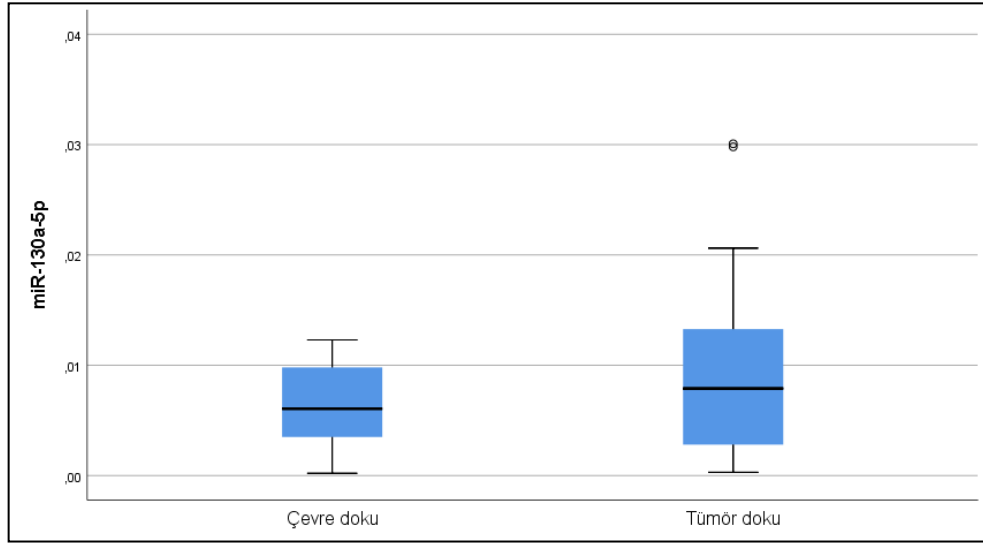
KK hastalarının tümör ve komşu normal doku örneklerinde *miR-5688*, *miR-1305*, *miR-130a-5p* ve *miR-1226-3p* ekspresyon düzeyleri, *U6* referans genine göre normalize edilen değerler kullanılarak analiz edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde *miR-130a-5p* ve *miR-5688* Kopya Sayısı Değerleri.

miRNA	Doku Türü	N	Ort. $\pm$ SS	Medyan (Min–Maks)	p Değeri
miR-130a-5p	Komşu Normal Doku	25	0,006 $\pm$ 0,004	0,006 (0–0,010)	0,318
	Tümör Doku	25	0,009 $\pm$ 0,008	0,008 (0–0,030)	
miR-5688	Komşu Normal Doku	25	0,001 $\pm$ 0,001	0,000 (0–0,000)	0,151
	Tümör Doku	25	0,001 $\pm$ 0,000	0,001 (0–0,000)	

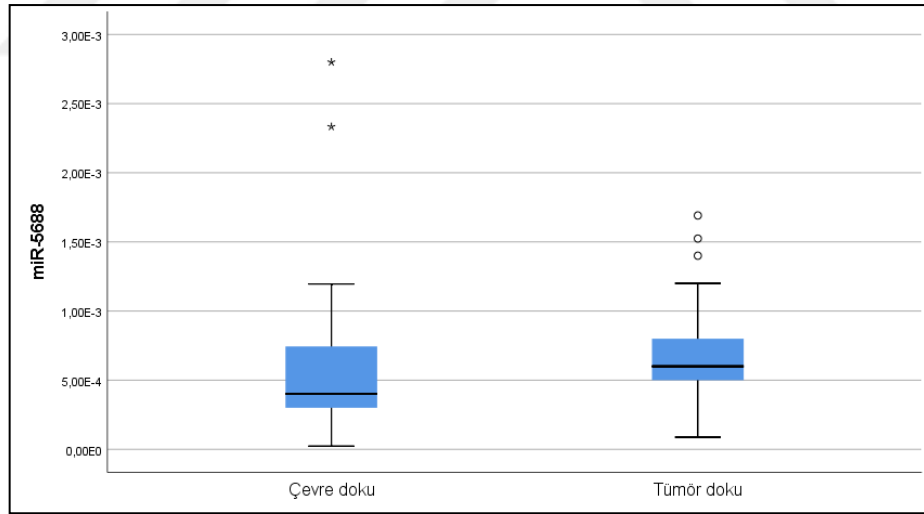
N: Örneklem sayısı; Ort. $\pm$ SS: Ortalama $\pm$ Standart Sapma; Min–Maks: Minimum–maksimum aralık
Kopya sayısı değerleri U6 referans genine göre normalize edilmiştir.

Tümör dokusunda *miR-130a-5p* ekspresyon düzeyi (Ort. $\pm$ SS: 0,009 $\pm$ 0,008) ile komşu normal doku ekspresyon düzeyi (Ort. $\pm$ SS: 0,006 $\pm$ 0,004) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır (p=0,318) (Tablo 4.3) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde *miR-130a-5p* Kopya Sayısı Dağılımları.

Tümör dokusunda *miR-5688* ekspresyon düzeyi (Ort. $\pm$ SS: $0,001 \pm 0,000$) ile komşu normal doku ekspresyon düzeyi ($0,001 \pm 0,000$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p=0,151$) (Tablo 4.3) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Kolon Kanserli Hastaların Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde *miR-5688* Kopya Sayısı Dağılımları.

miR-1226-3p ekspresyon düzeyi, hastalara ait tümör ve komşu normal doku örneklerinde saptanamamıştır. Bu durum, kullanılan dPZR yönteminin yüksek duyarlılığı göz önünde bulundurularak değerlendirildiğinde, söz konusu miRNA'nın ilgili dokularda biyolojik olarak ekspresyon göstermemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

miR-1305 ekspresyonu düzeyi ise yalnızca 3 hastada tespit edilebilmiştir; geri kalan örneklerde ekspresyon düzeyi saptanmamıştır. Bu bulgu da benzer şekilde, ya bu miRNA'nın KK tümör dokularında genel olarak düşük düzeyde ifade edildiğini, ya da dokuya özgü ekspresyon göstermediğini düşündürmektedir. Ancak validasyon kaynaklı tekrarlar sonucunda ekspresyon verilerinin bulunamaması nedeniyle yöntemsel bir hata olasılığı çok düşük olarak değerlendirilmiştir.

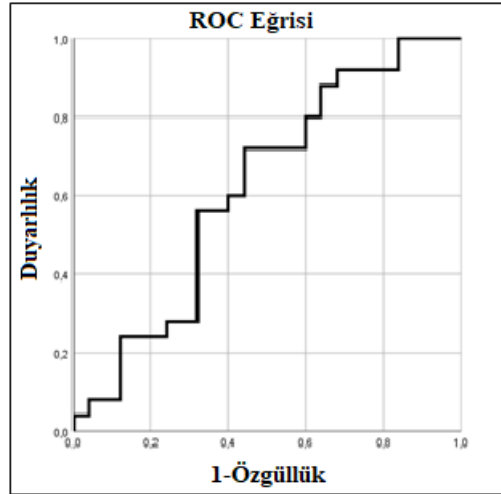
4.3. ROC Analizleri

4.3.1. *SALL1* Genlerine Ait ROC Analizleri

Tablo 4.4: *SALL1* Geninin Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki ROC Analizi.

AUC	Standart Hata	p Değeri	%95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
0,618	0,081	0,154	0,459	0,776

AUC: Eğri Altında Kalan Alan



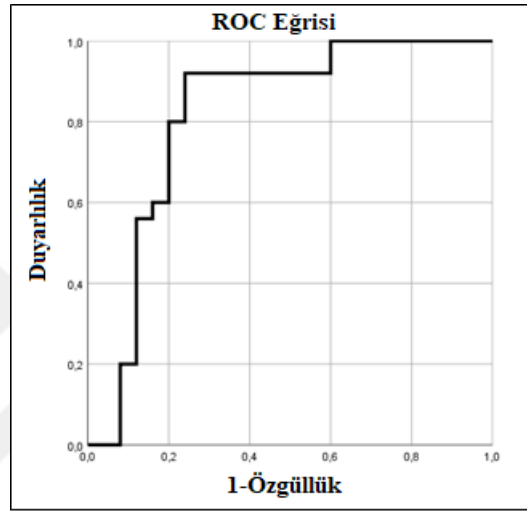
Şekil 4.7: *SALL1* Geni için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinin ROC Analiz Eğrisi.

SALL1 genine ait ROC analizi (AUC=0,618; p=0,154); tümör dokusu ve komşu normal doku arasında düşük bir ayırım gücüne sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 4.4) (Şekil 4.7). Bu nedenle, *SALL1* geni tek başına güvenilir bir biyobelirteç olarak değerlendirilememiştir.

Tablo 4.5: *SALL2* Geninin Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki ROC Analizi.

AUC	Standart Hata	p Değeri	%95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
0,818	0,066	<0,001	0,688	0,818

AUC: Eğri Altında Kalan Alan



Şekil 4.8: *SALL2* Geni için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinin ROC Analiz Eğrisi.

SALL2 genine ait ROC analizi (AUC=0,818; $p<0,001$); tümör doku ve komşu normal doku arasında yüksek bir ayırım gücüne sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 4.5) (Şekil 4.8).

SALL2 genine yönelik gerçekleştirilen analizde, testin ayırt edici performansını değerlendirmek amacıyla Youden indeksi hesaplanmıştır. Bu indeks, tanı testinin hem tümör dokusunu hem de komşu normal dokuyu doğru şekilde sınıflandırma başarısını gösteren önemli bir istatistiksel ölçüttür. *SALL2* geni için elde edilen Youden indeksi 0.68 olup, bu değer testin yüksek düzeyde ayırt edici bir performansa sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Analiz sonuçlarına göre, testin duyarlılığı %92, özgüllüğü ise %76 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, *SALL2* gen ekspresyonuna dayalı testin KK tümör dokusunu

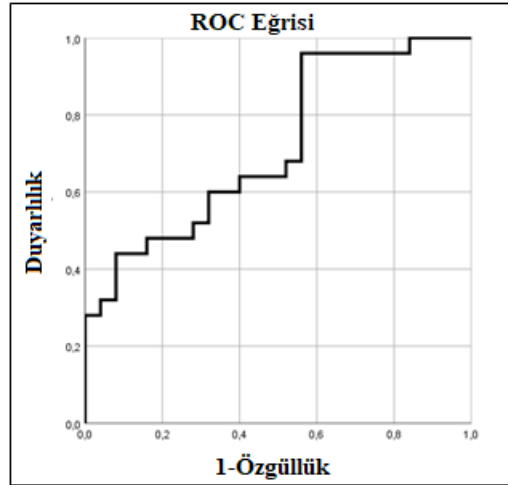
yüksek doğrulukla tespit edebildiğini ve komşu normal dokuyu da büyük ölçüde doğru şekilde tanıyabildiğini göstermektedir. Elde edilen eşik değeri 0.0573 olarak saptanmıştır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, bu sonuçlar *SALL2* geninin tanı amaçlı biyobelirteç olarak güçlü bir potansiyele sahip olduğunu ve tümör ile normal doku arasında yüksek ayırt edicilik sağlayabildiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.6: *SALL3* Geninin Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerindeki ROC Analizi.

AUC	Standart Hata	p Değeri	%95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
0,718	0,072	0,008	0,577	0,860

AUC: Eğri Altında Kalan Alan



Şekil 4.9: *SALL3* Geni için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinin ROC Analiz Eğrisi.

SALL3 genine ait ROC analizi (AUC=0,718; p=0,008); tümör doku ve komşu normal doku arasında yüksek bir ayırım gücüne sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 4.6) (Şekil 4.9).

SALL3 genine ilişkin yapılan analizde, testin tanısal etkinliğini değerlendirmek amacıyla Youden indeksi hesaplanmıştır. *SALL3* geni için belirlenen Youden değeri 0.40 olup, bu sonuç testin sınırlı düzeyde ayırt ediciliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Analiz bulgularına göre testin duyarlılığı %96 gibi oldukça yüksek bir seviyede gerçekleşmiş, buna karşılık özgüllüğü %44 düzeyinde kalmıştır. Bu durum, testin tümör dokusunu tanıma konusunda yüksek başarı gösterdiğini; ancak komşu normal dokuyu doğru şekilde sınıflandırmada yetersiz kaldığını ortaya koymaktadır.

SALL3 genine ait analizlerde eşik değer 0.055 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, *SALL3* geninin tanısal amaçla tek başına kullanımından ziyade, diğer biyobelirteçlerle birlikte değerlendirilmesinin daha uygun olabileceğini düşündürmektedir.

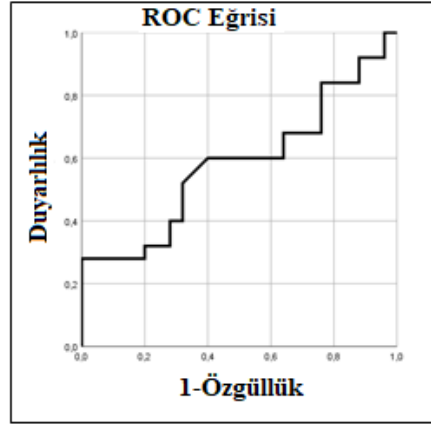
Çalışmamızda *SALL4* geninin ekspresyon düzeyinin yalnızca 7 hastanın tümör dokusunda ve 4 hastanın komşu normal dokusunda tespit edilebilmiştir. Üstelik yalnızca bir hastada her iki doku grubunda eş zamanlı olarak ekspresyon saptanmıştır. Bu durum, *SALL4* genine ait ROC analizinin yapılmasını metodolojik olarak olanaksız hale getirmiştir. Zira ROC analizi, karşılaştırmalı değerlendirme gerektirdiğinden, her iki grupta da yeterli sayıda ölçüm verisi bulunması zorunludur. Ancak çalışmamızda *SALL4* geni için bu koşul sağlanamamış; elde edilen düşük sayıda ölçüm, istatistiksel analiz açısından hem anlamlılık hem de güvenilirlik bakımından yetersiz bulunmuştur. Bu nedenle, *SALL4* geni ROC analizine dahil edilmemiştir.

4.3.2. miRNA'lara Ait ROC Analizleri

Tablo 4.7: *miR-130a-5p* için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde ROC Analizi.

AUC	Standart Hata	p Değeri	%95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
0,582	0,083	0,318	0,421	0,744

AUC: Eğri Altında Kalan Alan



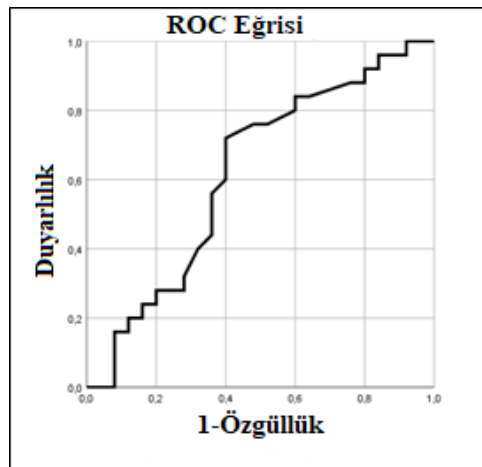
Şekil 4.10: *miR-130a-5p* için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde ROC Analiz Eğrisi.

miR-130a-5p'ye ait ROC analizi ($AUC=0,582$; $p=0,318$); tümör doku ve komşu normal doku arasında düşük bir ayırım gücüne sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 4.7) (Şekil 4.10). Bu nedenle, *miR-130a-5p* tek başına güvenilir bir biyobelirteç olarak değerlendirilememektedir.

Tablo 4.8: *miR-5688* için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde ROC Analizi.

AUC	Standart Hata	p Değeri	%95 Güven Aralığı	
			Alt sınır	Üst sınır
0,618	0,081	0,151	0,459	0,778

AUC: Eğri Altında Kalan Alan



Şekil 4.11: *miR-5688* için Tümör ve Komşu Normal Doku Örneklerinde ROC Analiz Eğrisi.

miR-5688'e ait ROC analizi (AUC=0,618; p=0,151); tümör doku ve komşu normal doku arasında düşük bir ayırım gücüne sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 4.8) (Şekil 4.11). Bu nedenle, *miR-5688* tek başına güvenilir bir biyobelirteç olarak değerlendirilememektedir.

Ayrıca, *miR-1226-3p* ve *miR-1305* için ROC analizi gerçekleştirilmemiştir. Bunun temel nedeni, *miR-1226-3p*'nin hiçbir örnekte ekspresyon göstermemesi ve *miR-1305*'in yalnızca 3 hastada saptanabilmesidir. ROC analizi, iki grup arasında biyobelirteç düzeylerindeki ayırımı test etmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir ve bu analiz için yeterli sayıda ve her iki grupta da karşılaştırılabilir ölçümler gereklidir. Ancak söz konusu iki miRNA için elde edilen veri sayısı, istatistiksel olarak anlamlı ve güvenilir bir ROC eğrisi oluşturmak için yetersiz bulunmuştur. Bu nedenle, istatistiksel anlam taşımayacak ve yanıltıcı olabilecek analizlerden kaçınılmıştır.

4.3.3. Hastaların Klinik Özellikleri Açısından Gen ve miRNA Ekspresyon Analizleri

Çalışmamızda, *SALL1*, *SALL2* ve *SALL3* genleri ile *miR-130a-5p* ve *miR-5688*'in ekspresyon düzeylerinin; hastalara ait klinik parametrelere (cinsiyet, sigara içme durumu, tümör evresi, ailede kanser öyküsü ve histopatolojik tümör tipi) ile olası ilişkileri araştırılmıştır. Klinik değişkenler doğrultusunda oluşturulan bağımsız grup arasındaki farklılıklar, Mann-Whitney U testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve p<0.05 değeri anlamlılık kriteri olarak esas alınmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: Cinsiyete Göre Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi Sonuçları).

Gen/miRNA	Cinsiyet	N	Ort. ± SS	Medyan (Min–Maks)	p Değeri
SALL1	Erkek	12	0,126 ± 0,047	0,124 (0,060–0,220)	0,810
	Kadın	13	0,115 ± 0,064	0,132 (0,000–0,180)	
SALL2	Erkek	12	0,080 ± 0,026	0,081 (0,030–0,130)	0,611
	Kadın	13	0,075 ± 0,020	0,078 (0,030–0,120)	
SALL3	Erkek	12	0,024 ± 0,019	0,015 (0,000–0,050)	0,769
	Kadın	13	0,024 ± 0,021	0,024 (0,000–0,050)	

miR-130a-5p	Erkek	12	0,011 ± 0,011	0,008 (0,000–0,030)	0,810
	Kadın	13	0,008 ± 0,005	0,008 (0,000–0,020)	
miR-5688	Erkek	12	0,001 ± 0,000	0,000 (0,000–0,000)	0,852
	Kadın	13	0,001 ± 0,000	0,001 (0,000–0,000)	

N: Örneklem sayısı; Ort. ± SS: Ortalama ± Standart Sapma ; Min–Maks: Minimum–maksimum aralık

Cinsiyet değişkenine göre yapılan analizde, kadın ve erkek grupları arasında *SALL1* (p=0,810), *SALL2* (p=0,611) ve *SALL3* (p=0,769) genleri ile *miR-130a-5p* (p=0,810) ve *miR-5688* (p=0,852) ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.10: Tümör Evresine Göre Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi Sonuçları).

Gen/miRNA	Evre	N	Ort. ± SS	Medyan (Min–Maks)	p Değeri
SALL1	Erken Evre (Evre 1–2)	6	0,137 ± 0,053	0,157 (0,060–0,180)	0,494
	Geç Evre (Evre 3–4)	16	0,119 ± 0,059	0,131 (0,000–0,220)	
SALL2	Erken Evre (Evre 1–2)	6	0,081 ± 0,034	0,076 (0,030–0,120)	0,858
	Geç Evre (Evre 3–4)	16	0,080 ± 0,015	0,078 (0,060–0,130)	
SALL3	Erken Evre (Evre 1–2)	6	0,032 ± 0,025	0,034 (0,000–0,070)	0,294
	Geç Evre (Evre 3–4)	16	0,021 ± 0,018	0,015 (0,000–0,050)	
miR-130a-5p	Erken Evre (Evre 1–2)	6	0,007 ± 0,053	0,004 (0,000–0,010)	0,590
	Geç Evre (Evre 3–4)	16	0,011 ± 0,059	0,009 (0,000–0,030)	
miR-5688	Erken Evre	6	0,001 ± 0,034	0,001 (0,000–0,000)	0,407

(Evre 1–2)	
Geç Evre	16 0,001 ± 0,015 0,001 (0,000–0,000)
(Evre 3–4)	

N: Örneklem sayısı; Ort. ± SS: Ortalama ± Standart Sapma; Min–Maks: Minimum–maksimum aralık

Tümör evresi açısından yapılan karşılaştırmalarda, erken evre (evre 1–2) ile geç evre (evre 3–4) tümörler arasında *SALL1* (p=0,494), *SALL2* (p=0,858), *SALL3* (p=0,294) genleri ile *miR-130a-5p* (p=0,590) ve *miR-5688* (p=0,407) ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.11: Tümör Tipine Göre Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi Sonuçları).

Gen/miRNA	Tümör Tipi	N	Ort. ± SS	Medyan (Min–Maks)	p Değeri
SALL1	Metastatik	3	0,124 ± 0,015	0,132 (0,110–0,130)	0,718
	Primer	19	0,124 ± 0,061	0,137 (0,000–0,220)	
SALL2	Metastatik	3	0,079 ± 0,007	0,081 (0,070–0,080)	1,000
	Primer	19	0,080 ± 0,022	0,078 (0,030–0,130)	
SALL3	Metastatik	3	0,039 ± 0,013	0,042 (0,030–0,050)	0,132
	Primer	19	0,022 ± 0,020	0,014 (0,000–0,070)	
miR-130a-5p	Metastatik	3	0,006 ± 0,005	0,008 (0,000–0,010)	0,523
	Primer	19	0,010 ± 0,009	0,009 (0,000–0,030)	
miR-5688	Metastatik	3	0,001 ± 0,000	0,001 (0,000–0,000)	0,408
	Primer	19	0,001 ± 0,000	0,001 (0,000–0,000)	

N: Örneklem sayısı; Ort. ± SS: Ortalama ± Standart Sapma; Min–Maks: Minimum–maksimum aralık

Primer ve metastatik tümöre sahip hastalar arasında yapılan değerlendirmede, *SALL1* (p=0,718), *SALL2* (p=1,000), *SALL3* (p=0,132) genleri ve *miR-130a-5p* (p=0,523) ve *miR-5688* (p=0,408) ekspresyon seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.11).

Tablo 4.12: Aile Öyküsüne Göre Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi Sonuçları).

Gen/miRNA	Aile Öyküsü	N	Ort. $\pm$ SS	Medyan (Min–Maks)	p Değeri
SALL1	Yok	13	0,121 $\pm$ 0,053	0,131 (0,000–0,220)	0,693
	Var	10	0,127 $\pm$ 0,061	0,139 (0,000–0,190)	
SALL2	Yok	13	0,075 $\pm$ 0,020	0,078 (0,030–0,120)	0,376
	Var	10	0,085 $\pm$ 0,021	0,078 (0,060–0,130)	
SALL3	Yok	13	0,026 $\pm$ 0,019	0,025 (0,000–0,050)	0,648
	Var	10	0,023 $\pm$ 0,022	0,014 (0,000–0,070)	
miR-130a-5p	Yok	13	0,008 $\pm$ 0,008	0,008 (0,000–0,030)	0,376
	Var	10	0,011 $\pm$ 0,009	0,010 (0,000–0,030)	
miR-5688	Yok	13	0,001 $\pm$ 0,000	0,001 (0,000–0,000)	0,257
	Var	10	0,001 $\pm$ 0,000	0,001 (0,000–0,000)	

N: Örneklem sayısı; Ort. $\pm$ SS: Ortalama $\pm$ Standart Sapma; Min–Maks: Minimum–maksimum aralık

Ailede tümör öyküsü olup olmaması durumuna göre yapılan analizlerde de *SALL1* (p=0,693), *SALL2* (p=0,376), *SALL3* (p=0,648) genleri ve *miR-130a-5p* (p=0,376) ve *miR-5688* (p=0,257) düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4.12).

Tablo 4.13: Sigara Kullanımına Göre Gen ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi Sonuçları).

Gen / miRNA	Sigara Kullanımı	N	Ort. $\pm$ SS	Medyan (Min–Maks)	p
SALL1	Kullanmayan	11	0,132 $\pm$ 0,047	0,133 (0,060–0,220)	0,833
	Kullanan	12	0,116 $\pm$ 0,063	0,124 (0,000–0,190)	
SALL2	Kullanmayan	11	0,071 $\pm$ 0,016	0,076 (0,030–0,090)	0,190
	Kullanan	12	0,087 $\pm$ 0,022	0,080 (0,070–0,130)	
SALL3	Kullanmayan	11	0,025 $\pm$ 0,023	0,014 (0,000–0,070)	0,928
	Kullanan	12	0,024 $\pm$ 0,017	0,023 (0,000–0,050)	
miR-130a-5p	Kullanmayan	11	0,009 $\pm$ 0,009	0,008 (0,000–0,030)	0,608
	Kullanan	12	0,010 $\pm$ 0,008	0,009 (0,000–0,030)	
miR-5688	Kullanmayan	11	0,001 $\pm$ 0,000	0,001 (0,000–0,001)	0,608
	Kullanan	12	0,001 $\pm$ 0,000	0,001 (0,000–0,001)	

N: Örneklem sayısı; Ort. $\pm$ SS: Ortalama $\pm$ Standart Sapma; Min–Maks: Minimum–maksimum aralık

Sigara kullanımı açısından yapılan değerlendirmede, sigara kullanan ve kullanmayan hastalar arasında *SALL1* ($p=0,833$), *SALL2* ($p=0,190$), *SALL3* ($p=0,928$) genleri ve *miR-130a-5p* ($p=0,608$) ve *miR-5688* ($p=0,608$) ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 4.13).

Sonuç olarak; cinsiyet, tümör evresi, primer- metastatik durumu, aile hikayesi ve sigara kullanımı açısından hedef genlerin ve miRNA'ların ekspresyonları karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlılık görülmemiştir. Örneklem sayısının düşük olması ($n=25$) ve karşılaştırılan gruplardaki hasta oranının bu anlamlılık düzeylerinin etkilemesi sebebiyle, karşılaştırma analizlerinin yüksek kohortlu gruplarda yapılması önerilmektedir.

4.4. Lojistik Regresyon Modellemesi

SALL1, *SALL2*, *SALL3* genleri ile *miR-130a-5p* ve *miR-5688*'in ekspresyon düzeylerinin, tümör dokusu ile komşu normal dokular arasındaki ayırt edici potansiyele sahip olup olmadığı lojistik regresyon modeli ile incelenmiştir. Lojistik regresyon,

bağımlı değişkenin kategorik yapıda olduğu durumlarda (örneğin tümör doku / komşu normal doku) kullanılan ve belirleyici faktörlerin sınıflandırma üzerindeki etkisini ortaya koymayı amaçlayan parametrik bir analiz yöntemidir. Bu analizde, ilgili gen ve miRNA'ların ekspresyon seviyeleri bağımsız değişken olarak modele dahil edilirken, doku tipi bağımlı değişken olarak tanımlanmıştır. Yapılan modelleme çalışmaları kapsamında, söz konusu moleküllerin ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıkları senaryolarda ayırt edici güçleri değerlendirilmiştir. Ancak uygulanan regresyon analizleri sonucunda, modellerin istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı görülmüştür.

4.5. Korelasyon Analizleri

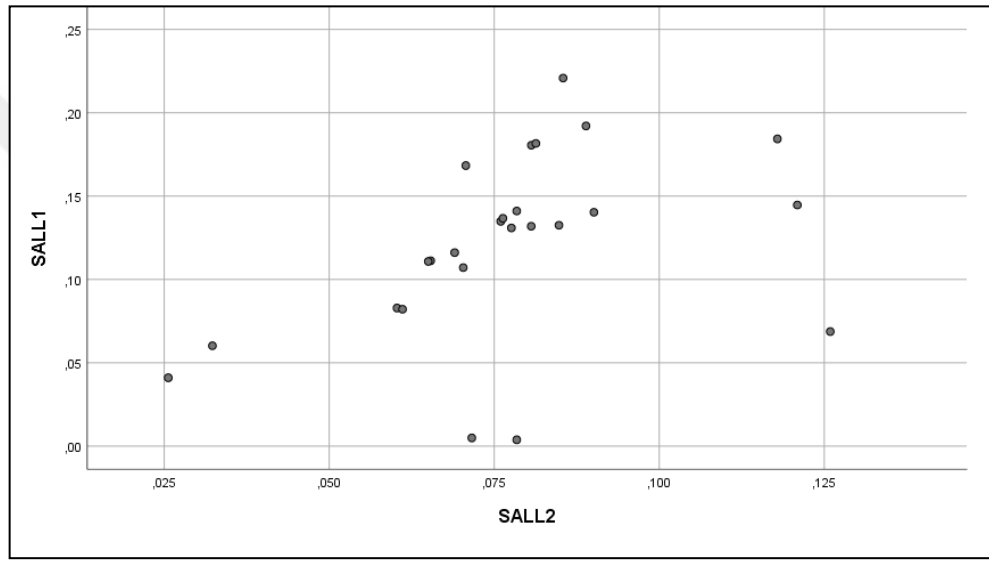
Yapılan analiz detayları Tablo 4.14'te özetlenmiştir.

Tablo 4.14: Kolon Kanseri Tümör Dokularında *SALL1*, *SALL2*, *SALL3* Genleri ile *miR-130a-5p* ve *miR-5688* Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Analizleri.

Gen / miRNA		SALL1	SALL2	SALL3	miR-130a-5p	miR-5688
SALL1	Korelasyon katsayısı (r)	1,000	0,601	0,439	0,072	0,130
	p Değeri	<0,001	0,002	0,028	0,734	0,537
SALL2	Korelasyon katsayısı (r)	0,601	1,000	0,188	0,069	0,160
	p Değeri	0,002	<0,001	0,368	0,742	0,444
SALL3	Korelasyon katsayısı (r)	0,439	0,188	1,000	-0,240	-0,132
	p Değeri	0,028	0,368	<0,001	0,248	0,528
miR-130a-5p	Korelasyon katsayısı (r)	0,072	0,069	-0,240	1,000	0,723
	p Değeri	0,734	0,742	0,248	<0,001	<0,001

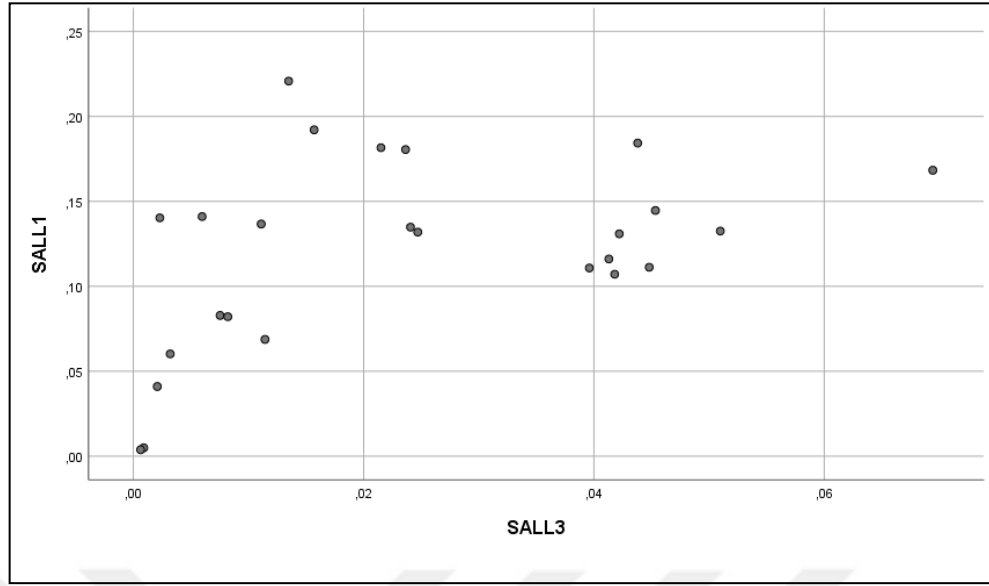
miR-5688	Korelasyon katsayısı (r)	0,130	0,160	-0,132	0,723	1,000
	p Değeri	0,537	0,444	0,528	<0,001	<0,001

KK hastalarının tümör dokusunda *SALL1* gen ekspresyon düzeyi arttıkça *SALL2* gen ekspresyon düzeyi de istatistiksel olarak anlamlı derecede artmaktadır ve bu ilişkinin derecesi yüksektir ($p=0,002$; $r=0,601$) (Tablo 4.14) (Şekil 4.12).



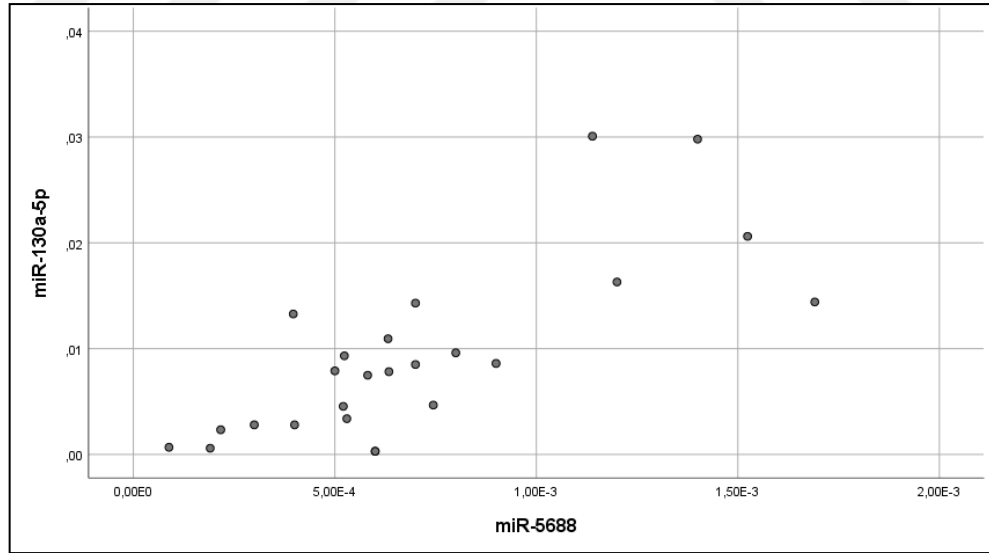
Şekil 4.12: *SALL1* ve *SALL2* Gen Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Pozitif Korelasyonu Gösteren Dağılım Grafiği.

SALL1 ve *SALL3* genlerinin ekspresyonu arasında orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif korelasyon görülmüştür ($r=0,439$; $p=0,028$) (Tablo 4.14) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: *SALL1* ve *SALL3* Gen Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Pozitif Korelasyonu Gösteren Dağılım Grafiği.

Tümör dokusunda miRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında *miR-130a-5p* değeri arttıkça *miR-5688* değeri de istatistiksel olarak anlamlı derecede artmaktadır ve bu ilişkinin derecesi yüksektir ($r=0,723$; $p<0,001$) (Tablo 4.14) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: *miR-130a-5p* ve *miR-5688* Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Pozitif Korelasyonu Gösteren Dağılım Grafiği.

Genler ve miRNA'lar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon görülmemiştir.

4.5.1. Kat Değişimi Analizi

Buna ek olarak, gen ve miRNA'ların dokulardaki kat değişimleri hesaplanmış ve bu değişimlerin birbirleriyle olan ilişkileri analiz edilmiştir. Bu analizle, moleküler düzeydeki farklılıkların yön ve şiddet açısından birbiriyle tutarlı olup olmadığı değerlendirilmeye çalışılmıştır. *SALL1*, *SALL2*, *SALL3* genleri ile *miR-130a-5p* ve *miR-5688* ekspresyonlarının kat değişimleri ile gerçekleştirilen korelasyon analizi sonuçları Tablo 4.15'te sunulmuştur.

Tablo 4.15: *SALL1*, *SALL2* ve *SALL3* Genleri ile *miR-130a-5p* ve *miR-5688* Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Kat Değişimleri Analizi.

	SALL1_FC	SALL2_FC	SALL3_FC	miR-130a-5p_FC	miR-5688_FC
SALL1_FC	1,000	0,360	0,562	0,010	-0,092
p	<0,001	0,092	0,005	0,964	0,677
SALL2_FC	0,360	1,000	0,093	0,115	0,327
p	0,092	<0,001	0,658	0,585	0,111
SALL3_FC	0,562	0,093	1,000	-0,383	-0,387
p	0,005	0,658	<0,001	0,059	0,056
miR-130a-5p_FC	0,010	0,115	-0,383	1,000	0,780
p	0,964	0,585	,059	<0,001	<0,001
miR-5688_FC	-0,092	0,327	-0,387	0,780	1,000
p	0,677	0,111	0,056	<0,001	<0,001

FC: Fold Change (Kat Sayısı Değişimi)

Tümör dokusunda, *SALL1* ve *SALL3* genleri kat değişimi arasında orta düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif korelasyon görülmüştür ($r=0,562$; $p=0,005$) (Şekil 4.15).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, kolon tümör dokusu ve komşu normal doku örnekleri arasında gen ve miRNA düzeyindeki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesinin yanı sıra, *SALL* gen ailesi (*SALL1*, *SALL2*, *SALL3* ve *SALL4* genleri) ile daha önce kolon kanserinde incelenmemiş dört miRNA (*miR-5688*, *miR-1305*, *miR-130a-5p* ve *miR-1226-3p*) arasındaki potansiyel düzenleyici ilişkileri analiz edilmiştir. Bu sayede, söz konusu moleküllerin kolon karsinogenezindeki olası rolleri değerlendirilerek; aynı zamanda tanı, prognoz ve tedaviye yönelik yeni biyobelirteç adaylarının ve düzenleyici mekanizmaların ortaya konmasına katkı sağlanmıştır.

T. Ma ve arkadaşları tarafından farklı kanser türlerinde TCGA veritabanlı yapılan çalışma sonucunda *SALL* gen ailesinin, tümörün ait olduğu dokuya özgü farklı işlevler üstlenebileceği ortaya konmuştur (T. Ma ve ark., 2021).

SALL1 geni, embriyonik gelişim başta olmak üzere, hücrel farklılaşma ve tümör oluşumu gibi biyolojik süreçleri *Wnt/β-katenin* sinyal yolu aracılığıyla yürütmektedir. Ayrıca, *NuRD* kompleksi aracılığıyla *SALL1* geninin baskılayıcı etkisi gerçekleşmektedir (Lauberth & Rauchman, 2006; Sato ve ark., 2004).

SALL1 geni çift işlevli fonksiyon göstermektedir. Potansiyel tümör baskılayıcı rolüne işaret eden Y. Wang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; *SALL1* gen ekspresyonunun artışı yoluyla KRK progresyonunun engellenmesi ve *miR-503-5p*'nin baskılanmasına yol açtığı bulunmuştur (Y. Wang ve ark., 2022). Genin potansiyel onkogenik rolüne işaret eden Yuan ve arkadaşlarının *in vivo* modellerde yürüttüğü çalışmada ise, Toll-like reseptör yolunun baskılanması sonucunda *SALL1* geninde aşırı ekspresyon meydana geldiği ve bu durumun hücre proliferasyonu ve invazyonunu artırdığı belirlenmiştir (Yuan ve ark., 2023). Liu ve arkadaşlarının yürüttükleri risk skorlama analizinde, uzun sağkalım süreleri ve düşük risk profili ile ilişkilendirilen KRK hastalarında, *SALL1* gen ekspresyonunun yüksek olduğu saptanmıştır (Liu ve ark., 2021).

Aynı zamanda, *SALL1* geninin KRK'de epigenetik mekanizmalarla baskılandığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Örneğin, Hill ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada, *SALL1* gen promotör bölgesi metilasyonunun, KRK örneklerinde %80'den fazla oranda gözlemlenirken, bu oranın normal dokularda %30 civarında olduğu raporlanmıştır (Hill ve ark., 2010). C. Zhang ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada,

SALL1 geninin ekspresyon ve metilasyon düzeylerindeki farklılıklar aracılığıyla KK'de düşük ve yüksek riskli hasta gruplarını ayırt etmede kullanılabilecek biyobelirteç potansiyeli ortaya koyulmuştur (C. Zhang ve ark., 2015).

Çalışmamızda, *SALL1* geninin ekspresyon düzeyleri ortalamaları, tümör ve komşu normal dokuda sırasıyla Ort. $\pm$ SS: $0,120 \pm 0,056$ ve Ort. $\pm$ SS: $0,091 \pm 0,066$ olarak belirlenmesine karşın (Tablo 4.2) (Şekil 4.2), ROC analizinde ayırt edicilik gücünün düşük olduğu gözlemlenmiştir (AUC=0,618) (Tablo 4.4) (Şekil 4.7). Bu nedenle *SALL1* geninin KK'de tek başına güvenilir bir biyobelirteç olarak değerlendirilemeyeceği sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte, tümör dokusunda saptanan hafif ekspresyon artışı, genin sınırlı ifadesinden dolayı KK dokularında tamamen baskılanmadığını düşündürmektedir. Literatürde, *SALL1* geninin metilasyon yoluyla baskılandığı ve düşük ekspresyonunun daha iyi prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir. Ancak çalışmamızda anlamlı ekspresyon farkı gözlenmemesi, bu genin dokuya özgü epigenetik regülasyonlara (örneğin metilasyon temelli bir baskılanma mekanizmasına) tabi olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, Hill ve arkadaşlarının çalışmasında, KKK'de *SALL1* geninin promotör bölgesinde bildirilen yüksek düzeyde hipermetilasyon bulgularıyla da uyumludur (Hill ve ark., 2010). Dolayısıyla, bu hipotezin desteklenmesi için ileride yapılacak çalışmalarda *SALL1* geninin metilasyon düzeyinin doğrulanması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Ayrıca, bazı çalışmalarda *SALL1* geninin hücre proliferasyonunu artırıcı yönde etkilerinin raporlanması, tümör mikroçevresi, hücre tipi, sinyal yolları, genetik altyapı ya da epigenetik gibi faktörlere bağlı olarak bu genin onkogenik ya da tümör baskılayıcı etkiler gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Nitekim, *SALL1* geninin tümör baskılayıcı etkisinin özellikle MSI-H alt tiplerinde belirgin olabileceği de bildirilmektedir (Liu ve ark., 2021). Dolayısıyla, *SALL1* geninin KK'deki klinik önemini daha net ortaya koyabilmek için; moleküler alt tipler ayrımı da gözetilerek, metilasyon durumu ile hasta prognoz verilerinin birlikte değerlendirildiği ileri düzey, geniş örneklemli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda ayrıca, *SALL1* ve *SALL3* genlerinin ekspresyonu arasında orta düzeyde ve istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ($r=0,439$; $p=0,028$) gözlenmiştir (Tablo 4.9) (Şekil 4.13). Bu bulgu, hem onkogen hem de tümör baskılayıcı olarak çift rollere sahip olan bu genlerin, benzer transkripsiyonel veya epigenetik düzenleme

mekanizmalarına tabi olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim literatürde, *SALL3* geninin hipermetilasyon ile hepatoselüler karsinom başta olmak üzere baş-boyun ve serviks kanseri gibi pek çok tümörde baskılandığı saptanmıştır. Ayrıca, düşük ekspresyon seviyesinin tümöre karşı immün yanıtı azalttığı gösterilmiştir (Shikauchi ve ark., 2009; Misawa ve ark., 2017; Wei ve ark., 2015). *SALL1* geni ile *SALL3* geni arasındaki bu korelasyon, *SALL1* geninin de benzer epigenetik baskı mekanizmalarına maruz kaldığı hipotezini desteklemektedir.

Çalışmamızda, tercih edilen dPZR yöntemi ile hedef gen ve miRNA'ların ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Hedeflenen molekülleri, küçük ve çok miktarda reaksiyon birimine bölen bu yöntem, çok düşük ekspresyon seviyelerini dahi hassasiyetle ölçebilmektedir. Özellikle, çalışmamızda düşük ekspresyon düzeyine sahip olduğu belirlenen *SALL1* geninde, klasik yöntemler kullanıldığında gözden kaçabilecek minör farklılıklar bu dPZR sayesinde daha net şekilde değerlendirilebilmiştir. Bu sayede, biyobelirteç potansiyeli değerlendirilen gen ve miRNA'ların doğru karakterizasyonuna katkı sağlayan dPZR yönteminin çalışmamıza önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Çalışmamızda *SALL2* geninin KK tümör dokularında, komşu normal dokulara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ekspresyon düzeyine sahip olduğu bulunmuştur (Ort. $\pm$ SS: $0,077 \pm 0,022$ vs. Ort. $\pm$ SS: $0,046 \pm 0,037$) (Tablo 4.2) (Şekil 4.3). ROC analizinde elde edilen yüksek AUC değeri (0,818) (Tablo 4.5 ve Şekil 4.8) bu genin ayırt edici gücünü desteklemektedir.

Suva ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, glioblastoma kanser türünde onkogen işleviyle yüksek ekspresyon seviyesi bildirilen *SALL2* geninin, over kanserinde ise hiç ekspresyon göstermediği ortaya konmuştur (Suvà ve ark., 2014). Bu genin, yüksek ekspresyon seviyesi gösterdiği kanser türleri arasında ayrıca testis, timus ve beyin tümörleri de yer almaktadır. KRK tümörlerinde ise ekspresyon düzeyinin belirgin şekilde azaldığı ifade edilmektedir (E. Hermosilla ve ark., 2018). Farkas ve arkadaşlarının, biyoinformatik analizler ile ortaya koyduğu çalışma sonucunda da *SALL2* geninin KRK örneklerinde ekspresyonunun anlamlı şekilde azaldığı ifade edilmiştir (Farkas ve ark., 2021).

İlginç bir şekilde, *SALL2* geninin tümör hücresel süreçleri yanı sıra tümör-stroma etkileşimlerinde etkili olduğu, kolon ve rektum adenokarsinomlarında gerçekleştirilen daha güncel bir biyoinformatik çalışmada bildirilmiştir (T. Ma ve ark., 2021). Ayrıca,

büyüme faktörlerinin eksikliği veya hücrel stres gibi durumlarda *SALL2* geninin ifade düzeyinin farklılık gösterdiği kanıtlanmıştır (Escobar ve ark., 2015; C. K. Sung ve ark., 2011).

Çalışmamızda *SALL2* geninin KK tümör dokularında normal dokulara kıyasla anlamlı düzeyde yüksek eksprese edildiği tespit edilmesine rağmen, bu artışın tümör evresi ve metastaz ile istatistiksel olarak ilişkili bulunmamış olması, bu genin tümör progresyonundan ziyade erken karsinogenez süreçlerinde etkili olabileceğine işaret etmektedir. Bu bağlamda, *SALL2* geninin tümör evresine göre değişmeyen ekspresyon profili, erken evrede aktive olan bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görmesi ve ileri evrelerde baskınlanan diğer moleküler mekanizmaların devreye girmesiyle ilişkili olabilir. Bununla birlikte, bu durumun sadece istatistiksel anlamlılık p-değerleriyle değil, klinik gözlemler ve hasta gruplarının detaylı sınıflandırmalarıyla da desteklenmesi gerekmektedir. Mevcut çalışmamızdaki sınırlı sayıda örnekte klinik evre dağılımının homojen olmaması, bu ilişkinin güçlü biçimde saptanamamasına yol açmış olabilir. Bu nedenle, *SALL2* geninin prognostik potansiyelinin netleştirilebilmesi için ileri evre-varyasyon ilişkilerini ele alan daha geniş örneklemler, evre bazlı alt grup analizlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde *SALL2* gen ekspresyonunun KK'de genellikle azaldığı yönündeki biyoinformatik bulgular, çalışmamızdaki ekspresyon artışıyla çelişiyor gibi görünmektedir. Ancak bu fark, çeşitli faktörlerle açıklanabilir. Öncelikle, bu biyoinformatik analizlerde kullanılan veri setlerinde hasta örneklem dağılımları, RNA kalitesi, analiz algoritmaları ve platform farklılıkları gibi teknik sınırlılıklar mevcuttur. Ayrıca, çalışmamızda incelenen Türk hasta grubunun genetik altyapısı ve epigenetik profili, literatürdeki Avrupalı veya Amerikan kökenli kohortlardan farklılık gösterebilir. Bu bağlamda, *SALL2* ekspresyonunun Türk popülasyonuna özgü varyantlar veya metilasyon farklılıklarıyla düzenlenebileceği, bu farklılıkların da gen ekspresyon düzeylerini etkileyebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, tümör alt tipleri, mutasyon statüsü ve mikroçevre farklılıklarının da *SALL2* gen ekspresyonunda etkili olabileceği, özellikle tümör-stroma gibi parametrelerin bu genin biyolojik rolünü değiştirebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenlerle, *SALL2* gen ekspresyonunun klinik ve biyolojik karşılığının daha net anlaşılabilmesi için, popülasyon çeşitliliğini ve moleküler alt

grupları içeren, bütüncül biyoinformatik ve fonksiyonel analizlerin entegre edildiği çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda ayrıca, KK hastalarının tümör dokusunda *SALL1* gen ekspresyon düzeyi arttıkça *SALL2* geni ekspresyonu düzeyi de istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı ve bu ilişkinin derecesi yüksek olduğu ($p=0,002$; $r=0,601$) saptanmıştır (Tablo 4.9) (Şekil 4.12).

Bu bulgu, her iki genin ekspresyon düzeylerinin KK tümör dokularında benzer yönelimler gösterdiğini ortaya koymakta olup, bu genlerin ortak veya birbirini tamamlayan sinyal yollarında görev alabileceği hipotezini güçlendirmektedir. Literatürde *NuRD* kompleksi aracılığıyla *SALL1* geninin susturulması ve bu genin *Wnt/β-katenin* sinyal yolunun düzenlenmesi gibi mekanizmalar üzerinden epiteliyal tümörlerde çift yönlü işlevler üstlendiği gösterilmiştir. *SALL2* geni ise KK özelinde daha az çalışılmış olmakla birlikte, Yang ve arkadaşlarının hematolojik maligniteler üzerine yaptığı çalışmada, *SALL2* gen ekspresyonunun *GDF15/PI3K/AKT* sinyal yoluna yanıt olarak azaldığı ve tümör mikroçevresinde yer aldığı raporlanmıştır (S. Yang ve ark., 2020). Bu veriler, her iki genin yalnızca hücre içi proliferatif sinyal yolları değil, aynı zamanda tümör-stroma etkileşimlerini de etkileyebilecek çok yönlü transkripsiyon faktörleri olduğunu göstermektedir.

Elde ettiğimiz güçlü korelasyon, bu genlerin KK'de birlikte regülasyonuna işaret edebilir. Ayrıca, *SALL1* geninin ROC analizinde düşük düzeyde ayırt ediciliğe sahip olması ($AUC=0.618$) göz önüne alındığında, *SALL2* geni ile birlikte panel olarak değerlendirilmesinin biyobelirteç potansiyelini artırabileceği düşünülmektedir. Genin tek başına sınırlı prediktif kapasitesi yerine, çoklu gen paneli kullanımı da modern biyobelirteç stratejilerine uyum sağlamaktadır. *SALL1* ve *SALL2* genlerinin birlikte ele alınması, yalnızca ekspresyon düzeyleri açısından değil, potansiyel epigenetik regülasyon mekanizmaları ve ortak sinyal yolları üzerinden de bütüncül olarak değerlendirilmelidir. Bu kapsamda, bu iki genin metilasyon durumlarının, protein düzeylerinin ve klinik değişkenlerle ilişkilerinin yüksek sayıdaki hasta popülasyonu ile yapılacak çalışmalarla ortaya konması, KK biyolojisinin daha derinlemesine anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca bu korelasyonun, terapötik stratejiler açısından da dikkate değer çıkarımları bulunmaktadır. Hücre döngüsü ve proliferasyon gibi süreçleri etkileyen bu genlerin birlikte hedeflenmesi, özellikle kombinasyon temelli tedavi yaklaşımlarında yeni

moleküler hedefler olarak değerlendirilebilir. Bu doğrultuda, ekspresyon ve epigenetik modifikasyon düzeyinde müdahale edilen hücre modelleriyle gerçekleştirilecek çalışmalarla *SALL1* ve *SALL2* genlerini ortak hedeflemesinin tümör progresyonuna veya ilaç yanıtına etkileri araştırılmalıdır. Bu tür yaklaşımlar, tanıdaki değerinin yanı sıra prognozun belirlenmesi ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımları için de bir değere sahip olacaktır.

Çalışmamızda, *SALL3* geninin tümör dokularında anlamlı düzeyde baskılandığı saptanmıştır. Elde edilen bulgulara göre, *SALL3* gen ekspresyon düzeyi ortalaması tümör dokusunda Ort. $\pm$ SS: $0,024 \pm 0,019$, komşu normal dokulardaki ekspresyon düzeyi Ort. $\pm$ SS: $0,068 \pm 0,096$ kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur ($p=0,008$) (Tablo 4.2) (Şekil 4.4). ROC analizinde de yüksek ayırt edicilik düzeyi ($AUC=0,718$) (Tablo 4.6 ve Şekil 4.9) göstererek, bu genin KK'de biyobelirteç potansiyeli taşıyabileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar, *SALL3* geninin tümör baskılayıcı bir gen olabileceğine dair literatürdeki bulgularla tutarlıdır.

Yukarıda *SALL3* geninin baskılandığı kanser türleri dışında, Jean-Pierre ve arkadaşlarının prostat kanserinde yaptığı çalışmada da, *SALL3* genin hipermetilasyona bağlı olarak baskılanması sonucu ekspresyon düzeyinin azaldığı ve hatta tümör agresifliği arttıkça, ekspresyon düzeyinin de anlamlı şekilde düştüğü saptanmıştır (Jean-Pierre et al., 2024).

Çalışmamızda gözlemlenen düşük ekspresyon profili, bu genel eğilimi KK özelinde de doğrulamakta ve *SALL3* geninin potansiyel bir tümör baskılayıcı gen olabileceğini desteklemektedir. Bu sonuçlar, *SALL3* geninin ekspresyon düzeylerindeki azalmanın, KK progresyonuyla ilişkili olabileceği yönünde önemli ipuçları sunmaktadır. *SALL3* geninin tümör dokusunda baskılanmış olması ve yüksek ayırt edicilik gücüne rağmen ($AUC=0,718$), klinik değişkenlerle anlamlı bir ilişki göstermemesi; bu genin genetik veya epigenetik düzeyde tümör baskılayıcı bir role sahip olabileceğini, ancak klinik ilerleme ile doğrudan bağlantılı olmayabileceğini ortaya koymaktadır. Literatürde, *SALL3* gen ekspresyonunun birçok tümörde metilasyonla baskılandığı gösterilmiştir. Bu bilgiyle birlikte düşünüldüğünde, KK tümörlerinde gözlenen baskılanmanın da promotör bölge metilasyonu gibi epigenetik mekanizmalarla ilişkili olabileceği hipotezi güç kazanmaktadır. Ayrıca, ROC analizinden elde edilen yüksek ayırt edicilik değeri, bu genin tümör ve komşu normal doku arasında biyobelirteç olarak potansiyel

taşıyabileceğine işaret etmektedir. Genin KK'de düşük düzeyde ekspresyon profili göstermesi, klasik yöntemlerle tespitini zorlaştırabileceğinden, çalışmamızda kullanılan yüksek duyarlılığa sahip dPZR teknolojisinin bu sonuçların elde edilmesinde kritik rol oynadığı düşünülmektedir. Bu doğrultuda, *SALL3* geninin tanısal ve prognostik biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin; ekspresyon, metilasyon ve protein düzeyi analizleri içeren daha geniş hasta gruplarındaki çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

Çalışmamızda yapılan ROC analizleri, *SALL2* (AUC=0,818) (Tablo 4.5 ve Şekil 4.8) ve *SALL3* (AUC=0,718) (Tablo 4.6 ve Şekil 4.9) genlerinin KK tanısında istatistiksel olarak anlamlı ve klinik açıdan anlamlı düzeyde ayırt ediciliğe sahip olduğunu göstermiştir. Bu yüksek AUC değerleri, bu genlerin yalnızca istatistiksel değil, aynı zamanda tanı destekleyici biyobelirteç olarak da değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Özellikle *SALL2* ve *SALL3* genlerinin kombine kullanımı, hem tümör hem de komşu normal dokular arasında moleküler düzeyde ayırım gücünü artırabilir ve gelecekte geliştirilmesi planlanan lojistik regresyon temelli biyobelirteç panelleri için öncü bir temel oluşturabilir. Nitekim her iki genin ROC analizlerinde tek başına yüksek AUC değerlerine ulaşmış olması, bu genlerin lojistik regresyonla birleştirilerek oluşturulacak bir tanı skoru içinde kombine edilmesini desteklemektedir. Bu tür bir yaklaşım, biyobelirteç panelinin duyarlılık ve özgüllüğünü artırma potansiyeline sahiptir. Çalışmamızda, hasta sayısının sınırlı olması ve genetik heterojenite gibi etkenler nedeniyle, bu genlerin kombinasyonlarıyla oluşturulan lojistik regresyon modellerinde istatistiksel anlamlılık sağlanamamıştır. Buna rağmen, her iki genin ROC analizlerinde bağımsız olarak gösterdiği yüksek ayırt edicilik gücü, ileri düzey ve daha geniş örneklem içeren çalışmalarda kombine biyobelirteç paneli olarak değerlendirilme potansiyelini korumaktadır.

Ek olarak, elde edilen pozitif korelasyon verileri özellikle çoklu gen hedefli tedavi stratejileri açısından önemlidir. Nitekim *SALL* gen ailesinin *PI3K/AKT*, *Wnt/β-katenin* gibi kanserle ilişkili sinyal yollarında aktif rol oynadığı kanıtlanmış olup, bu yollar hedef alınarak geliştirilecek kombinasyon tedavilerinde genetik profillemenin önemi artmaktadır. Korelasyonların klinik karşılığı, örneğin tedavi yanıtı tahmininde ya da evreleme süreçlerinde kullanılabilecek moleküler alt sınıflandırmaların belirlenmesi açısından önemli bir çıkış noktası sunmaktadır.

Gelecekte yapılacak çalışmalar için, bu ön bulguların geniş hasta gruplarında doğrulanması gereklidir. Özellikle, *SALL2* ve *SALL3* genlerinin tanısal panel olarak kullanımı, 500'ün üzerinde KK hastasını kapsayacak çok merkezli çalışmalarda ROC eğrileri üzerinden validasyon gerektirmektedir. Fonksiyonel düzeyde ise, bu genlerin CRISPR-Cas9 ile gen susturma ve gen yerleştirme teknikleri uygulanarak tümör büyümesi, invazyon ve metastaz üzerindeki etkilerinin hücre kültürü ve hayvan modellerinde izlenmesi önerilmektedir. Ayrıca, *SALL3* geninin epigenetik baskılanma mekanizmalarının aydınlatılması için bisülfid dizileme veya metilasyon-spesifik PZR gibi tekniklerle promotor bölgesindeki metilasyon durumunun incelenmesi önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda *SALL2* ve *SALL3* genlerinin ekspresyon düzeyleri ve korelasyonları, bu genlerin erken tanı, prognostik değerlendirme ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinde potansiyel taşıdığını göstermektedir. KK için bu veriler ışığında, genetik alt sınıflamaları temel alacak ve çoklu biyobelirteç panelleriyle geliştirilecek ileri çalışmalar önem arz etmektedir.

Çalışmamızda, KK hastalarında *SALL4* gen ekspresyonu yalnızca sınırlı sayıda örnekte (tümör dokusunda 7 hasta ve komşu normal dokuda 4 hasta) tespit edilebilmiş, birçok örnekte ise ekspresyon görülmemiştir. Ayrıca, yalnızca bir hastada hem tümör hem de komşu normal dokuda eş zamanlı *SALL4* gen ekspresyonu saptanmıştır. Çoğu örnekte ekspresyonun belirlenememesi nedeniyle, *SALL4* geni istatistiksel analizlere dahil edilmemiştir. Bu durum, *SALL4* geninin heterojen bir ekspresyon paternine sahip olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde de *SALL4* ekspresyonuna dair benzer tutarsızlıklar bildirilmektedir.

SALL4 geni, birçok kanser türünde yüksek ekspresyon seviyesi göstermekte olup, malignite gelişiminde işlevsel rol oynamaktadır. Bu sayede, tedaviye yönelik potansiyel molekül hedefi haline gelebileceği belirtilmektedir. Örneğin, Khales ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada, KRK hastalarının kan numunelerinde *SALL4* gen düzeylerinin anlamlı ölçüde yüksek olduğunu bildirilmiş ve bu genin hastalığın erken evre tespiti için yeni bir biyobelirteç olabileceği ileri sürülmüştür (Ardalan Khales ve ark., 2015). Meme kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada ise *SALL4* genindeki ekspresyonun, hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak, proliferasyonu önlediği açıklanmıştır (Kobayashi ve ark., 2011). *SALL4* geninin yüksek ekspresyon gösterdiği bir diğer kanser türü metastatik

endometrial kanser olarak bildirilmiş ve ayrıca normal dokuda ekspresyon göstermemesi nedeniyle terapötik hedef olarak değerlendirilmiştir (A. Li ve ark., 2015). *SALL4* gen ekspresyonunun, ileri evre ve mortalite ile pozitif korelasyonun saptandığı bir diğer kanser türü de seröz over karsinomu olarak bildirilmiştir (M. Yang ve ark., 2016). Ayrıca, bu genin, mide kanseri patogenezinde ve metastazında biyobelirteç olarak potansiyeli taşıdığı ortaya konmuştur (L. Zhang ve ark., 2014).

Ancak KRK özelindeki literatürlerde, *SALL4* geninin ekspresyon seviyelerinde tutarsızlıklar saptanmıştır. Forghanifard ve arkadaşlarının KRK doku örnekleriyle yürüttüğü bir çalışmada, yüksek *SALL4* gen ekspresyon düzeyinin lenf nodu metastazıyla anlamlı düzeyde ilişkili olduğunu bildirilmiştir (Forghanifard ve ark., 2013). Buna karşılık; Habano ve arkadaşlarının KRK doku çalışmasında, *SALL4* geninin hipermetilasyon ile baskılanması sonucunda, tümör dokularda *SALL4* gen ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı bildirilmiştir. Metilasyon düzeyinin ise normal dokularda oldukça düşük bulunduğu raporlanmıştır. Bu bulguların sonucunda genin, kromozomal stabilitenin korunmasından sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (Habano ve ark., 2007).

Bu epigenetik düzenleme, genin ekspresyonunun bazı örneklerimizde tamamen saptanamamasını açıklayabilecek güçlü bir mekanizmadır. Nitekim çalışmamızda da *SALL4* gen ekspresyonu 25 hastanın yalnızca 7'sinde saptanabilmiş, 18 hastada ise gözlenmemiştir. Bu durumun, Habano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da bildirdiği üzere, *SALL4* geninde görülen hipermetilasyon gibi epigenetik baskılayıcı mekanizmalarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. *SALL4* genine ait promotör bölgesindeki metilasyon düzeylerinin bisülfid dizileme gibi epigenetik analizlerle değerlendirilmesi, bu hipotezin doğrulanabilmesi açısından önem arz etmektedir.

Ek olarak; Hao ve arkadaşlarının 150'ye yakın KRK hastası verisiyle gerçekleştirdiği bir analizde, *SALL4* gen ekspresyonunun tümör dokularında belirgin şekilde azaldığı belirtilmiştir. Normal dokuda %79 olarak ifade edilen ekspresyon oranı, KRK tümör dokuda %46 seviyelerindedir (Hao ve ark., 2016).

SALL4 geninin, farklı çalışmalarda hem yüksek hem de düşük ekspresyon profili rapor edilmesi; söz konusu genin KK'de evreye, tümör alt tipine, mikrosatellit stabilite durumuna, stromal bileşenlere veya epigenetik düzeydeki regülasyonlara bağlı olarak değişken ifade edilebileceğini düşündürmektedir. Özellikle, normal dokularda *SALL4* gen

ekspresyonunun sınırlı olması ve sadece bazı tümör alt tiplerinde yeniden aktive olması, bu genin spesifik moleküler fenotiplere özgü çalışabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda *SALL4* gen ekspresyonunun çok düşük düzeyde ve sadece az sayıda örnekte gözlenmiş olması, genin KK'nin tamamında değil, belirli alt gruplarında aktif olabileceğine işaret etmektedir. Bu alt gruplar; tümör kökenli kök hücrelerin bulunduğu ya da epigenetik susturulmanın henüz gerçekleşmediği örnekler olabilir. Dolayısıyla, bu genin biyobelirteç ya da tedavi hedefi olarak değerlendirilebilmesi için, daha geniş hasta gruplarında, özellikle tümör alt tiplerine göre sınıflandırılmış ve epigenetik profillemesi yapılmış örneklerle ileri analizlerin yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda, miRPatchDB 2.0 in siliko aracıyla yapılan hedef tarama sonuçlarına göre, *miR-130a-5p*'nin *SALL4* gen ekspresyonunu düzenleme potansiyeli olduğu öngörülmüştür. *miR-130a-5p*'nin ekspresyon düzeyi incelenmiş, KK tümör dokusunda *miR-130a-5p* ekspresyon düzeyi (Ort. $\pm$ SS: $0,009 \pm 0,008$) ile komşu normal doku ekspresyon düzeyi (Ort. $\pm$ SS: $0,006 \pm 0,004$) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p=0,318$) (Tablo 4.3) (Şekil 4.5).

Ayrıca, *miR-130a-5p*'ye ait ROC analizi (AUC =0,582; $p=0,318$); tümör doku ve komşu normal doku arasında düşük bir ayırım gücüne sahip olduğunu göstermiştir (Tablo 4.7 ve Şekil 4.10). Bu nedenle *miR-130a-5p* tek başına güvenilir bir biyobelirteç olarak değerlendirilememektedir. Bu durum, *miR-130a-5p*'nin *SALL4* geni üzerindeki olası baskılayıcı etkisini bu çalışma kapsamında doğrudan ortaya koyamamaktadır.

Xian ve arkadaşlarının gastrik kanser hücreleri üzerinde yürüttüğü bir çalışmada, *miR-130a-5p*'nin *Cannabinoid Reseptör 1 (CB1R)* gen ekspresyonunu baskıladığı belirlenmiştir. *Wnt/ β -katenin* sinyal yolunu aşırı aktivasyonuna yol açan *CB1R* geni, tümör hücrelerinin biyolojik işlevlerini arttırmaktadır (Xian ve ark., 2018). Qayoom ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada, *Wnt/ β -katenin* sinyal yolunun, *SALL4* geninin ifadesini belirgin şekilde etkilediği gösterilmektedir. Bu sinyal yolu aktif hale geldiğinde, *SALL4* geninin aşırı düzeyde ifade edildiği belirtilmiştir (Qayoom ve ark., 2024). Buna karşın *miR-130a-5p*'nin, *Çinko Parmak E-Kutu Bağlayıcı Homeobox 1 (ZEB1)* gen ekspresyonunu baskılayarak tümör ilerlemesini sınırladığı da kanıtlanmıştır (Shi ve ark., 2023). T. T. Yan ve arkadaşlarının meme kanseri üzerinde yürüttüğü çalışmada, *SALL4* geninin, EMT'yi destekleyerek *ZEB1* ve *B hücre*sine özgü *Moloney fare lösemi virüsü entegrasyon bölgesi 1 (BMI1)* genlerinin ekspresyon seviyelerinde artışa sebep olduğu

kanıtlanmıştır (T. T. Yan ve ark., 2018). *SALL4*'ün *ZEB1* geni üzerinde transkripsiyonel etkisini incelemek amacıyla Itou ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, *SALL4* geninin *ZEB1* gen ekspresyonunu aktive ettiği ve pozitif yönde düzenlediği saptanmıştır. Ayrıca, *SALL4* geninin baskılandığı durumlarda *ZEB1* ve *BMI1* genlerini ekspresyon düzeylerinde de azalma gözlemlenmiştir (Itou ve ark., 2013).

Bu literatürler temelinde değerlendirildiğinde, *miR-130a-5p* ve *SALL4* geninin EMT süreci üzerinden zıt işlevler üstlenebileceği söylenebilir. Ancak çalışmamızda *SALL4* geninin çoğu örnekte eksprese edilmemesi ve *miR-130a-5p* düzeyindeki artışın istatistiksel anlamlılık göstermemesi, bu ilişkiye dair klinik düzeyde güçlü bir çıkarım yapmamıza olanak tanımamaktadır. Bu durum, hem *miR-130a-5p*'nin tek başına bir prognostik biyobelirteç olarak değerlendirilemeyeceğini hem de *SALL4* geni ile olan ilişkisini ortaya koyabilmek için daha geniş ve homojen hasta gruplarında, moleküler düzeyde analizler yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Özellikle, çift-lusiferaz raporlayıcı sistemi gibi hedef gen ve miRNA etkileşimlerini kanıtlayan testlerin kullanılması önerilmektedir.

Çeşitli kanser türlerinde *miR-5688*'in farklı moleküler sinyal yollarını etkileyerek tümör biyolojisinde rol oynadığı görülmektedir. Dutta ve arkadaşlarının meme kanseri hücreleri üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada, *Forkhead kutusu C1 (FOXC1)* geninin hedef alan *miR-5688* ile çalışılmıştır. *miR-5688* ekspresyon seviyesindeki artışın bu geni baskıladığı ve *TGF- β /Smad2/3* ve *Snail* sinyal yollarını inhibe ettiği kanıtlanmıştır. Bu sayede, kanser progresyonunun ve ilaç direncinin azaldığı görülmüştür (Dutta ve ark., 2025). Buna ek olarak; M. Zhao ve arkadaşlarının küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde yaptığı çalışmada, tümör progresyonunu sağlayan yüksek *İnterlökin 11 (IL-11)* gen ekspresyonunun, azalan *miR-5688* düzeyi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (M. Zhao ve ark., 2020). Bu veriler, *miR-5688*'in sinyal yollarına duyarlı bir şekilde regüle edildiğini ve çeşitli tümör tiplerinde farklı genleri baskılayarak tümörün ilerleyişini etkileyebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, miRPathDB 2.0 isimli in siliko aracıyla yapılan hedef tarama sonuçlarına göre, *miR-5688*'in *SALL1* ve *SALL4* gen ekspresyonunu düzenleme potansiyeli olduğu öngörülmüştür. Bu analizler, çalışma kapsamındaki gen ve miRNA seçimlerinin bilimsel temellere dayalı olduğunu göstermektedir. Ancak deneysel düzeyde yapılan ROC analizinde, *miR-5688*'in AUC değeri 0.618 olup istatistiksel anlamlılık

göstermemiştir ($p=0,151$). Bu durum, *miR-5688*'in KK'de tek başına güçlü bir ayırt edici biyobelirteç olamayacağını ortaya koymaktadır.

Bununla birlikte, sunulan literatür çalışmaları, *miR-5688*'in biyolojik etkilerinin tümör tipine ve hedeflediği genlere bağlı olarak farklılık gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, *miR-5688*'in biyobelirteç potansiyeli tümöre özgü yönleriyle ele alınmalı; stromal hücrelerle olan etkileşimleri, mikroçevresel faktörler ve sinyal yolları ile olan ilişkisi bütüncül olarak değerlendirilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. *SALL* gen ailesi özelinde değerlendirildiğinde, çalışmamızda *SALL1* ve *SALL4* üzerinde anlamlı bir regülasyon saptanamamıştır. Ancak farklı hücre soylarında yapılacak fonksiyonel analizlerle *miR-5688*'in *SALL* gen ailesi üzerindeki doğrudan etkilerinin ortaya konması, bu miRNA'nın olası biyobelirteç veya terapötik hedef olarak değerlendirilmesine katkı sağlayabilir.

Çalışmamızda, tümör dokusuna ait miRNA ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, *miR-130a-5p* ile *miR-5688* arasında pozitif yönlü ve güçlü bir korelasyon saptanmıştır ($r=0,723$; $p<0,001$) (Tablo 4.14, Şekil 4.14).

Literatürde, *miR-5688*'in, küçük hücre dışı akciğer kanseri dokularında, normal dokuya göre baskılanmış olduğu, kanser progresyonunu engelleyici etki gösterdiği bildirilmiştir (M. Zhao ve ark., 2020). Öte yandan, *miR-130a-5p*'nin, mide kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde *Wnt/ β -katenin* sinyal yolunu hedef alarak hücrel süreçleri modüle ettiği gösterilmiştir (W. Wang ve ark., 2022). Bu bilgiler ışığında, her iki miRNA'nın da kanser biyolojisinde tümör baskılayıcı işlevler üstlenebileceği öne sürülebilir.

Bu çalışmada gözlemlenen istatistiksel korelasyon, her iki miRNA'nın aynı transkripsiyon faktörleri tarafından regüle ediliyor olabileceğini ya da ortak epigenetik mekanizmalara maruz kalabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, bu iki miRNA'nın aynı sinyal yollarında rol alması ya da hedefledikleri genlerin işlevsel olarak kesişmesi de olasıdır. Bu durum, miRNA-ağ etkileşimleri açısından değerlendirildiğinde daha geniş kapsamlı biyoinformatik analizlerle desteklenebilir. Bununla birlikte, korelasyonun nedenine yönelik net bir biyolojik açıklama yapılabilmesi için, fonksiyonel deneyler ve hedef gen analizleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Mevcut bulgular, yalnızca birbirine paralel davranış gösteren iki miRNA'nın varlığını ortaya koymakta; ancak bu ilişkinin nedenselliğini açıklamak için daha ileri düzeyde moleküler düzeyde çalışmalar gereklidir.

Çalışmamızda, miRPathDB 2.0 in siliko aracıyla yapılan hedef tarama sonuçlarına göre; *miR-1226-3p*'nin *SALL1* ve *SALL2* gen ekspresyonunu ve *miR-1305*'in *SALL1* ve *SALL4* genlerini düzenleme potansiyeli olduğu öngörülmüştür. Tez çalışması kapsamında değerlendirilen *miR-1226-3p*, hem tümör hem de komşu normal doku örneklerinde hiçbir hastada ekspresyon göstermemiştir. Literatürde ise bu miRNA'nın osteosarkom gibi bazı tümörlerde yüksek düzeyde ifade edildiği ve onkogenik bir rol oynayabileceği belirtilmektedir (Y. Li ve ark., 2021). Buna karşın, meme kanseri çalışmalarında tümör baskılayıcı etkiler gösterebileceği yönünde bulgular da mevcuttur (Jin et al., 2010). Bu çelişkili sonuçlar, *miR-1226-3p*'nin kanser türüne özgü farklı işlevler üstlenebileceğini ve etkisinin büyük olasılıkla doku tipi, tümör mikroçevresi gibi faktörlere bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Bu çalışmada *miR-1226-3p*'nin ekspresyon göstermemesi, KK dokusunda epigenetik mekanizmalarla baskılanması, transkripsiyonel olarak susturulması ya da biyolojik olarak bu dokuda anlamlı bir rol oynamaması ile açıklanabilir. Bu bulgu aynı zamanda *miR-1226-3p*'nin kolon dokusunda ekspresyon profili göstermeyeceğini ya da bu dokuda işlevselliğe sahip olmadığını da düşündürmektedir.

Benzer şekilde, *miR-1305* ekspresyonu sadece üç hastada saptanmış ve bu hastaların klinik özellikleri incelendiğinde, ortak veya ayırt edici herhangi bir klinik faktör gözlemlenmemiştir. Literatürde, *miR-1305*'in mide kanserinde tümör baskılayıcı bir rol oynadığı açıklanmıştır (Shi ve ark., 2021). Mevcut bulgular, bu miRNA'ların KK bağlamında sınırlı veya heterojen bir ekspresyon profiline sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, bu moleküllerin tanısal veya prognostik açıdan tek başına anlamlı biyobelirteçler olmayabileceğini, ancak daha geniş hasta grupları ve moleküler alt tipler temelinde yapılacak ileri çalışmalarla potansiyel rollerinin daha net biçimde ortaya konabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, *SALL1*, *SALL2*, *SALL3* genleri ile *miR-130a-5p* ve *miR-5688* miRNA'larının klinik ve demografik parametrelerle ilişkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen lojistik regresyon analizlerinde; cinsiyet, tümör evresi (erken ve ileri), metastatik durum, ailede tümör öyküsü ve sigara kullanımı gibi değişkenlere göre gen/miRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ayrıca, gen ve miRNA'ların ikili ve üçlü kombinasyonlarıyla oluşturulan modellerde de tümör ve sağlıklı dokuyu ayırt etme açısından anlamlılık düzeyine ulaşamamıştır.

Bu bulgular sonucunda, *SALL* genlerinin yalnızca evreye ya da metastaza bağlı olarak değil, erken karsinogenez süreciyle ilişkili temel düzenleyici işlevler üstlendiği hipotezi bu bağlamda önem kazanmaktadır. Bu durum genlerin, erken tanı biyobelirteci olarak potansiyellerini destekleyen bir bulgudur.

Ayrıca, kombine modellerde anlamlılığın sağlanamaması; hasta sayısının sınırlılığı, genetik heterojenite, moleküler alt tip ayrımının yapılmamış olması gibi metodolojik sınırlamalarla açıklanabilir. Bu nedenle, genlerin kombine kullanım potansiyeli dışlanmamalı, aksine daha geniş örneklemler, alt tip ayrımı yapılmış çalışmalarda ROC eğrileri üzerinden yeniden değerlendirilmelidir.

Sonuç olarak, elde edilen veriler doğrultusunda; *SALL* gen ailesi üyelerinin ekspresyon düzeylerinin evre, metastaz ya da diğer klinik parametrelerden bağımsız seyretmesi, bu genlerin KK karsinogenez sürecindeki temel transkripsiyonel kontrol işlevlerine işaret etmekte ve erken tanıya yönelik biyobelirteç geliştirme çalışmalarında dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Aghagolzadeh, P., & Radpour, R. (2016). New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(25), 5678. <https://doi.org/10.3748/WJG.V22.I25.5678>
- Aguila, J. R., Liao, W., Yang, J., Avila, C., Hagag, N., Senzel, L., & Ma, Y. (2011). SALL4 is a robust stimulator for the expansion of hematopoietic stem cells. *Blood*, 118(3), 576–585. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-01-333641>
- Al-Baradie, R., Yamada, K., St. Hilaire, C., Chan, W. M., Andrews, C., McIntosh, N., Nakano, M., Martonyi, E. J., Raymond, W. R., Okumura, S., Okihiro, M. M., & Engle, E. C. (2002). Duane radial ray syndrome (Okihiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family. *American Journal of Human Genetics*, 71(5), 1195–1199. <https://doi.org/10.1086/343821>
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2014). Challenges in circulating tumour cell research. *Nature Reviews Cancer* 2014 14:9, 14(9), 623–631. <https://doi.org/10.1038/nrc3820>
- Al-Joufi, F. A., Setia, A., Salem-Bekhit, M. M., Sahu, R. K., Alqahtani, F. Y., Widyowati, R., & Aleanizy, F. S. (2022). Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer with an Emphasis on Recent Advances in Biomarkers, as Well as Nanotechnology-Based Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Nanomaterials* 2022, Vol. 12, Page 169, 12(1), 169. <https://doi.org/10.3390/NANO12010169>
- Al-Mulla, F., AlFadhli, S., Al-Hakim, A. H., Going, J. J., & Bitar, M. S. (2006). Metastatic recurrence of early-stage colorectal cancer is linked to loss of heterozygosity on chromosomes 4 and 14q. *Journal of Clinical Pathology*, 59(6), 624–630. <https://doi.org/10.1136/JCP.2005.033167>
- Álvarez, C., Quiroz, A., Benítez-Riquelme, D., Pincheira, R., Riffo, E., & Castro, A. F. (2021). SALL Proteins; Common and Antagonistic Roles in Cancer. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 6292, 13(24), 6292. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13246292>
- Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., Byrd, D. R., & Winchester, D. P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), 93–99. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21388>

- Andreyev, H. J. N., Norman, A. R., Cunningham, D., Oates, J. R., & Clarke, P. A. (1998). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(9), 675–684. <https://doi.org/10.1093/JNCI/90.9.675>
- Ardalan Khales, S., Abbaszadegan, M. R., Abdollahi, A., Raeisossadati, R., Tousi, M. F., & Forghanifard, M. M. (2015). SALL4 as a new biomarker for early colorectal cancers. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(2), 229–235. <https://doi.org/10.1007/S00432-014-1808-Y>
- Arias, J. L. (2008). Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 13(10), 2340–2369. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES13102340>
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683–691. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2015-310912>
- Baker, M. (2012). Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*, 9(6), 541–544. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2027>
- Barras, D. (2015). BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Biomarkers in Cancer*, 7(Suppl 1), BIC.S25248. <https://doi.org/10.4137/BIC.S25248>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Baserga, R. (1999). The IGF-I receptor in cancer research. *Experimental Cell Research*, 253(1), 1–6. <https://doi.org/10.1006/EXCR.1999.4667>
- Bertagnolli, M. M., Redston, M., Compton, C. C., Niedzwiecki, D., Mayer, R. J., Goldberg, R. M., Colacchio, T. A., Saltz, L. B., & Warren, R. S. (2011). Microsatellite instability and loss of heterozygosity at chromosomal location 18q: Prospective evaluation of biomarkers for stages II and III colon cancer - A study of CALGB 9581 and 89803. *Journal of Clinical Oncology*, 29(23), 3153–3162. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.0092/ASSET/BF301474-1A94-48F1-85E6-B0445556FE2B/ASSETS/IMAGES/ZLJ9991014300004.JPEG>
- Bertrand, F. E., Angus, C. W., Partis, W. J., & Sigounas, G. (2012). Developmental pathways in colon cancer: crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(23), 4344–4351. <https://doi.org/10.4161/CC.22134>

- Bhalerao, U., Bhalerao, A., Bhalerao, S., Srivastava, M., Singh, M., Lavuri, S. T., Barman, M. K., Burada, A. P., Sonkar, S. C., & Bhukya, P. L. (2021). Diagnosis of colorectal cancer using molecular techniques. *Colon Cancer Diagnosis and Therapy*, 2, 143–170. https://doi.org/10.1007/978-3-030-64668-4_7
- Bolocan, A., Ion, D., Stoian, R. V., & Serban, M. B. (2011). Map syndrome (MYH Associated Polyposis) colorectal cancer, etiopathological connections. *Journal of Medicine and Life*, 4(1), 109. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3056415/>
- Bommer, G. T., & Fearon, E. R. (2008). Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. *The Molecular Basis of Cancer*, 409–421. <https://doi.org/10.1016/B978-141603703-3.10031-7>
- Boparai, K. S., Mathus-Vliegen, E. M. H., Koornstra, J. J., Nagengast, F. M., Van Leerdam, M., Van Noesel, C. J. M., Houben, M., Cats, A., Van Hest, L. P., Fockens, P., & Dekker, E. (2010). Increased colorectal cancer risk during follow-up in patients with hyperplastic polyposis syndrome: a multicentre cohort study. *Gut*, 59(8), 1094–1100. <https://doi.org/10.1136/GUT.2009.185884>
- Borowiec, A. M., Wang, C. S. K., Yong, E., Law, C., Coburn, N., Sutradhar, R., Baxter, N., Paszat, L., & Tinmouth, J. (2016). Colonic Stents for Colorectal Cancer Are Seldom Used and Mainly for Palliation of Obstruction: A Population-Based Study. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1945172>
- Botzenhart, E. M., Green, A., Ilyina, H., König, R., Lowry, R. B., Lo, I. F. M., Shohat, M., Burke, L., McGaughran, J., Chafai, R., Pierquin, G., Michaelis, R. C., Whiteford, M. L., Simola, K. O. J., Rösler, B., & Kohlhasse, J. (2005). SALL1 mutation analysis in Townes-Brocks syndrome: twelve novel mutations and expansion of the phenotype. *Human Mutation*, 26(3), 282. <https://doi.org/10.1002/humu.9362>
- Brenner, H., & Tao, S. (2013). Superior diagnostic performance of faecal immunochemical tests for haemoglobin in a head-to-head comparison with guaiac based faecal occult blood test among 2235 participants of screening colonoscopy. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 49(14), 3049–3054. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2013.04.023>
- Bustin, S. A., & Dorudi, S. (2004). Gene expression profiling for molecular staging and prognosis prediction in colorectal cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4(5), 599–607. <https://doi.org/10.1586/14737159.4.5.599>

- Cai, Y., Hao, Y., Ren, H., Dang, Z., Xu, H., Xue, X., & Gao, Y. (2019). miR-1305 inhibits the progression of non-small cell lung cancer by regulating MDM2. *Cancer Management and Research*, 11, 9529–9540. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S220568>,
- Cantwell-Dorris, E. R., O’Leary, J. J., & Sheils, O. M. (2011). BRAFV600E: Implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(3), 385–394. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0799>
- Chang, S., Sun, G., Zhang, D., Li, Q., & Qian, H. (2020). MiR-3622a-3p acts as a tumor suppressor in colorectal cancer by reducing stemness features and EMT through targeting spalt-like transcription factor 4. *Cell Death and Disease*, 11(7). <https://doi.org/10.1038/S41419-020-02789-Z>,
- Chen, L. P., Zhang, N. N., Ren, X. Q., He, J., & Li, Y. (2018). miR-103/miR-195/miR-15b Regulate SALL4 and Inhibit Proliferation and Migration in Glioma. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 2938, 23(11), 2938. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23112938>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., ... Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18(10), 997–1006. <https://doi.org/10.1038/CR.2008.282>
- Chi, D., Zhang, W., Jia, Y., Cong, D., & Hu, S. (2019). Spalt-Like Transcription Factor 1 (SALL1) Gene Expression Inhibits Cell Proliferation and Cell Migration of Human Glioma Cells Through the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Medical Science Monitor Basic Research*, 25, 128–138. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.915067>
- Costas-Chavarri, A., Temin, S., & Shah, M. A. (2019). Treatment of patients with early-stage colorectal cancer: ASCO resource-stratified guideline summary. *Journal of Oncology Practice*, 15(5), 290–292. https://doi.org/10.1200/JOP.19.00011/SUPPL_FILE/DS_JOP.19.00011.DOCX
- Cox, A. D., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J., & Der, C. J. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(11), 828–851. <https://doi.org/10.1038/NRD4389>
- Creemers, E. E., Tijssen, A. J., & Pinto, Y. M. (2012). Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation Research*, 110(3), 483–495. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.247452>

- Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., & Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2013 10:8, 10(8), 472–484. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.110>
- Danese, E., Montagnana, M., & Lippi, G. (2019). Circulating molecular biomarkers for screening or early diagnosis of colorectal cancer: which is ready for prime time? *Annals of Translational Medicine*, 7(21), 610. <https://doi.org/10.21037/ATM.2019.08.97>
- Dizon, D. S., & Kamal, A. H. (2024). Cancer statistics 2024: All hands on deck. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(1), 8. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21824>
- Duan, B., Zhao, Y., Bai, J., Wang, J., Duan, X., Luo, X., Zhang, R., Pu, Y., Kou, M., Lei, J., & Yang, S. (2022). Colorectal Cancer: An Overview. *Gastrointestinal Cancers*, 1–12. <https://doi.org/10.36255/EXON-PUBLICATIONS-GASTROINTESTINAL-CANCERS-COLORECTAL-CANCER>
- Durán, J. D. G., Arias, J. L., Gallardo, V., & Delgado, A. V. (2008). Magnetic colloids as drug vehicles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2948–2983. <https://doi.org/10.1002/JPS.21249>
- Dutta, A., Chakraborty, S., Bhattacharya, A., Basak, U., Pati, S., Mukherjee, S., Guha, D., Banerjee, S., Chaudhuri, N. R., Sarkar, D., Jana, K., Sa, G., Dastidar, S. G., & Das, T. (2025). hsa-miR-5688 inhibits FOXC1-OCT4/SOX2 feedforward loop that drives chemoresistance in breast cancer stem cells. *Molecular Therapy Oncology*, 33(2). <https://doi.org/10.1016/J.OMTON.2025.200982>,
- E. Hermosilla, V., Salgado, G., Riffo, E., Escobar, D., Hepp, M. I., Farkas, C., Galindo, M., Morín, V., García-Robles, M. A., Castro, A. F., & Pincheira, R. (2018). SALL2 represses cyclins D1 and E1 expression and restrains G1/S cell cycle transition and cancer-related phenotypes. *Molecular Oncology*, 12(7), 1026–1046. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12308>,
- El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F., & Thierry, A. R. (2013). Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 424, 222–230. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2013.05.022>
- Escobar, D., Hepp, M. I., Farkas, C., Campos, T., Sodir, N. M., Morales, M., Álvarez, C. I., Swigart, L., Evan, G. I., Gutiérrez, J. L., Nishinakamura, R., Castro, A. F., & Pincheira, R. (2015). Sall2 is required for proapoptotic Noxa expression and genotoxic stress-induced apoptosis by doxorubicin. *Cell Death & Disease*, 6(7). <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2015.165>

- Farkas, C., Quiroz, A., Alvarez, C., Hermosilla, V., Aylwin, C. F., Lomniczi, A., Castro, A. F., Hepp, M. I., & Pincheira, R. (2021). Characterization of SALL2 Gene Isoforms and Targets Across Cell Types Reveals Highly Conserved Networks. *Frontiers in Genetics*, 12, 613808. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.613808/BIBTEX>
- Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, S. E., Simons, J. W., Ruppert, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Thomas, G., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1990). Identification of a Chromosome 18q Gene that Is Altered in Colorectal Cancers. *Science*, 247(4938), 49–56. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2294591>
- Fodde, R., Smits, R., & Clevers, H. (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 1(1), 55–67. <https://doi.org/10.1038/35094067>
- Forghanifard, M. M., Moghbeli, M., Raeisossadati, R., Tavassoli, A., Mallak, A. J., Boroumand-Noughabi, S., & Abbaszadegan, M. R. (2013). Role of SALL4 in the progression and metastasis of colorectal cancer. *Journal of Biomedical Science*, 20(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-6/TABLES/3>
- Gan, X., Wang, T., Chen, Z. Y., & Zhang, K. H. (2020). Blood-derived molecular signatures as biomarker panels for the early detection of colorectal cancer. *Molecular Biology Reports*, 47(10), 8159–8168. <https://doi.org/10.1007/S11033-020-05838-0>
- Garzon, R., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2009). MicroRNAs in Cancer. *Annual Review of Medicine*, 60, 167–179. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MED.59.053006.104707>
- Gilbert, J. A. (2013). SALL4, a new target in aggressive liver cancer. *The Lancet Oncology*, 14(8), e300. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(13\)70304-8](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(13)70304-8)
- Goss, K. H., & Groden, J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(9), 1967–1979. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.9.1967>
- Grady, W. M., & Carethers, J. M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079–1099. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2008.07.076>
- Habano, W., Sugai, T., Jiao, Y. F., & Nakamura, S. I. (2007). Novel approach for detecting global epigenetic alterations associated with tumor cell aneuploidy. *International Journal of Cancer*, 121(7), 1487–1493. <https://doi.org/10.1002/IJC.22847>
- Hamilton, S. R., Powell, S. M., Papadopoulos, N., Smith, K. J., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1994). Molecular Determinants of Dysplasia in Colorectal Lesions. *Cancer*

- Research, 54(21), 5523–5526.
<https://mayoclinic.elsevierpure.com/en/publications/molecular-determinants-of-dysplasia-in-colorectal-lesions>
- Hao, L., Zhao, Y., Wang, Z., Yin, H., Zhang, X., He, T., Song, S., Sun, S., Wang, B., Li, Z., & Su, Q. (2016). Expression and clinical significance of SALL4 and β -catenin in colorectal cancer. *Journal of Molecular Histology*, 47(2), 117–128. <https://doi.org/10.1007/S10735-016-9656-5/METRICS>
- Haq, A. I., Schneeweiss, J., Kalsi, V., & Arya, M. (2009). The Dukes staging system: a cornerstone in the clinical management of colorectal cancer. *The Lancet Oncology*, 10(11), 1128. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70157-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70157-3)
- Hermosilla, V. E., Hepp, M. I., Escobar, D., Farkas, C., Rizzo, E. N., Castro, A. F., & Pincheira, R. (2017). Developmental SALL2 transcription factor: a new player in cancer. *Carcinogenesis*, 38(7), 680–690. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGX036>
- Hill, V. K., Hesson, L. B., Dansranjav, T., Dallol, A., Bieche, I., Vacher, S., Tommasi, S., Dobbins, T., Gentle, D., Euhus, D., Lewis, C., Dammann, R., Ward, R. L., Minna, J., Maher, E. R., Pfeifer, G. P., & Latif, F. (2010). Identification of 5 novel genes methylated in breast and other epithelial cancers. *Molecular Cancer*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-51/FIGURES/9>
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., ... & Colston, B. W. (2013). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- Hosoe-Nagai, Y., Hidaka, T., Sonoda, A., Sasaki, Y., Yamamoto-Nonaka, K., Seki, T., Asao, R., Tanaka, E., Trejo, J. A. O., Kodama, F., Takagi, M., Tada, N., Ueno, T., Nishinakamura, R., Tomino, Y., & Asanuma, K. (2017). Re-expression of Sall1 in podocytes protects against adriamycin-induced nephrosis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 97(11), 1306–1320. <https://doi.org/10.1038/LABINVEST.2017.69>
- Houston, S. A., Cerovic, V., Thomson, C., Brewer, J., Mowat, A. M., & Milling, S. (2016). The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunology*, 9(2), 468–478. <https://doi.org/10.1038/MI.2015.77>

- How Kit, A., Nielsen, H. M., & Tost, J. (2012). DNA methylation based biomarkers: practical considerations and applications. *Biochimie*, 94(11), 2314–2337. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2012.07.014>
- Huggett, J. F., Cowen, S., & Foy, C. A. (2015). Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clinical Chemistry*, 61(1), 79–88. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221366>
- Huh, J. W., Kim, H. R., & Kim, Y. J. (2013). Prognostic Role of p53 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Patients after Curative Resection for Stage I to III Colorectal Cancer: Association with Colon Cancer Stem Cell Markers. *Journal of the American College of Surgeons*, 216(6), 1063–1069. <https://doi.org/10.1016/J.JAMCOLLSURG.2013.01.058>
- Hundt, S., Haug, U., & Brenner, H. (2009). Comparative evaluation of immunochemical fecal occult blood tests for colorectal adenoma detection. *Annals of Internal Medicine*, 150(3), 162–169. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-150-3-200902030-00005>
- Huynh, C., Segura, M. F., Gaziel-Sovran, A., Menendez, S., Darvishian, F., Chiriboga, L., Levin, B., Meruelo, D., Osman, I., Zavadil, J., Marcusson, E. G., & Hernando, E. (2011). Efficient in vivo microRNA targeting of liver metastasis. *Oncogene*, 30(12), 1481–1488. <https://doi.org/10.1038/ONC.2010.523>
- Issa, J. P. (2008). Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(19), 5939–5940. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1596>
- Itou, J., Matsumoto, Y., Yoshikawa, K., & Toi, M. (2013). Sal-like 4 (SALL4) suppresses CDH1 expression and maintains cell dispersion in basal-like breast cancer. *FEBS Letters*, 587(18), 3115–3121. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2013.07.049>,
- Jain, R. K. (2001). Delivery of molecular medicine to solid tumors: Lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *Journal of Controlled Release*, 74(1–3), 7–25. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00306-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00306-6)
- Jee, B. A., Choi, J. H., Rhee, H., Yoon, S., Kwon, S. M., Nahm, J. H., Yoo, J. E., Jeon, Y., Choi, G. H., Woo, H. G., & Park, Y. N. (2019). Dynamics of genomic, epigenomic, and transcriptomic aberrations during stepwise hepatocarcinogenesis. *Cancer Research*, 79(21), 5500–5512. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0991/653887/AM/DYNAMICS-OF-GENOMIC-EPIGENOMIC-AND-TRANSCRIPTOMIC>

- Jen, J., Kim, H., Piantadosi, S., Liu, Z.-F., Levitt, R. C., Sistonen, P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Hamilton, S. R. (1994). Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 331(4), 213–221. <https://doi.org/10.1056/NEJM199407283310401>
- Jean-Pierre, R., Charbonnier, G., Figiel, S., Lamb, A., Mills, I., Hennion, C., Cancel-Tassin, G., & Cussenot, O. (2024). Multiple Highly Methylated CpG Sites as Potential Epigenetic Markers for the Diagnosis of Prostate Cancer. <https://doi.org/10.20944/PREPRINTS202412.2005.V1>
- Jin, C., Rajabi, H., & Kufe, D. (2010). miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncoprotein and induces cell death. *International Journal of Oncology*, 37(1), 61–69. https://doi.org/10.3892/ijo_00000653
- J.L. Arias. (2011). Clinical Strategies for Cancer Treatment: The Role of Drugs - Cancer Chemotherapy & Biotherapy: Principles & Practices, 4th Edition. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 1–17. doi:10.2174/138955711793564024
- Khan, I. (2022). Understanding and Targeting the Colon Cancer Pathogenesis: A Molecular Perspective. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58. <https://doi.org/10.1590/S2175-97902022E20354>
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), 159–170. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81333-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81333-1)
- Kjellén, L. (2003). Glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferases in heparan sulphate biosynthesis and biology. *Biochemical Society Transactions*, 31(2), 340–342. <https://doi.org/10.1042/BST0310340>
- Knowlton, C. A., Mackay, M. K., Speer, T. W., Vera, R. B., Arthur, D. W., Wazer, D. E., Lanciano, R., Brashears, J. H., Knowlton, C. A., Mackay, M. K., Troicki, F. T., Poli, J., Yaeger, T. E., Yaeger, T. E., Mose, S., Troicki, F. T., Poli, J., Dragun, A. E., Rengan, R., ... Rube, C. (2024). Colon Cancer. *Encyclopedia of Radiation Oncology*, 77–77. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85516-3_1047
- Kobayashi, D., Kuribayashi, K., Tanaka, M., & Watanabe, N. (2011). SALL4 is essential for cancer cell proliferation and is overexpressed at early clinical stages in breast cancer. *International Journal of Oncology*, 38(4), 933–939. <https://doi.org/10.3892/IJO.2011.929>
- Kohlhase, J., Altmann, M., Archangelo, L., Dixkens, C., & Engel, W. (2000). Genomic cloning, chromosomal mapping, and expression analysis of msal-2. *Mammalian*

- Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 11(1), 64–68. <https://doi.org/10.1007/S003350010012>
- Kolligs, F. T. (2016). Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visceral Medicine*, 32(3), 158–164. <https://doi.org/10.1159/000446488>
- Kolodner, R. (1996). Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes & Development*, 10(12), 1433–1442. <https://doi.org/10.1101/GAD.10.12.1433>
- Kondelova, A., Albuquerque-González, B., Vychytilova-Faltejskova, P., García-Solano, J., Prochazka, V., Kala, Z., Pérez, F., Slaby, O., & Conesa-Zamora, P. (2020). miR-181a-2* expression is different amongst carcinomas from the colorectal serrated route. *Mutagenesis*, 35(3), 233–241. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEZ039>
- Krichevsky, A. M., & Gabriely, G. (2009). miR-21: a small multi-faceted RNA. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(1), 39–53. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2008.00556.X>
- Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., de Braud, F., & Wils, J. (2010). Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74(2), 106–133. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2010.01.010>
- Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G. D., Mosconi, S., Mandalà, M., Cervantes, A., & Arnold, D. (2013). Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*, 24(SUPPL.6), vi64–vi72. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDT354>
- Lauberth, S. M., & Rauchman, M. (2006). A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23922–23931. <https://doi.org/10.1074/JBC.M513461200>
- Li, A., Jiao, Y., Yong, K. J., Wang, F., Gao, C., Yan, B., Srivastava, S., Lim, G. S. D., Tang, P., Yang, H., Tenen, D. G., & Chai, L. (2015). SALL4 is a new target in endometrial cancer. *Oncogene*, 34(1), 63–72. <https://doi.org/10.1038/ONC.2013.529>
- Liang, J., Lin, C., Hu, F., Wang, F., Zhu, L., Yao, X., Wang, Y., & Zhao, Y. (2013). APC polymorphisms and the risk of colorectal neoplasia: a HuGE review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 177(11), 1169–1179. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWS382>
- Liao, X., Morikawa, T., Lochhead, P., Imamura, Y., Kuchiba, A., Yamauchi, M., Nosho, K., Qian, Z. R., Nishihara, R., Meyerhardt, J. A., Fuchs, C. S., & Ogino, S. (2012). Prognostic

- role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(8), 2257–2268. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2410>
- Li, D., Dower, K., Ma, Y., Tian, Y., & Benjamin, T. L. (2001). A tumor host range selection procedure identifies p150(sal2) as a target of polyoma virus large T antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14619–14624. <https://doi.org/10.1073/PNAS.251447198>
- Li, D., Tian, Y., Ma, Y., & Benjamin, T. (2004). p150Sal2 Is a p53-Independent Regulator of p21WAF1/CIP. *Molecular and Cellular Biology*, 24(9), 3885–3893. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.9.3885-3893.2004>
- Li, M., Li, J. Y., Zhao, A. L., & Gu, J. (2008). Colorectal Cancer or Colon and Rectal Cancer Clinicopathological Comparison between Colonic and Rectal Carcinomas. *Oncology*, 73(1–2), 52–57. <https://doi.org/10.1159/000120628>
- Lim, S. H., Jang, J., Park, J. O., Kim, K. M., Kim, S. T., Park, Y. S., Lee, J., & Kim, H. C. (2014). CD133-positive tumor cell content is a predictor of early recurrence in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 5(6), 447–456. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2078-6891.2014.071>
- Lin, P. C., Lin, J. K., Lin, H. H., Lan, Y. T., Lin, C. C., Yang, S. H., Chen, W. S., Liang, W. Y., Jiang, J. K., & Chang, S. C. (2015). A comprehensive analysis of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) loss in colorectal cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S12957-015-0601-Y>
- Li, T., Liao, X., Lochhead, P., Morikawa, T., Yamauchi, M., Nishihara, R., Inamura, K., Kim, S. A., Mima, K., Sukawa, Y., Kuchiba, A., Imamura, Y., Baba, Y., Shima, K., Meyerhardt, J. A., Chan, A. T., Fuchs, C. S., Ogino, S., & Qian, Z. R. (2014). SMO expression in colorectal cancer: associations with clinical, pathological, and molecular features. *Annals of Surgical Oncology*, 21(13), 4164–4173. <https://doi.org/10.1245/S10434-014-3888-Y>
- Liu, J., Li, Y., Gan, Y., Xiao, Q., Tian, R., Shu, G., & Yin, G. (2021). Identification of ZNF26 as a Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer by an Integrated Bioinformatic Analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 671211. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.671211/BIBTEX>

- Li, Y., Song, D., An, T., Liu, J., Yang, Q., & Nan, S. (2021). MicroRNA-1226-3p has a tumor-promoting role in osteosarcoma. *Oncology Letters*, 21(6), 474. <https://doi.org/10.3892/OL.2021.12735>
- Ma, C., Wang, F., Han, B., Zhong, X., Si, F., Ye, J., Hsueh, E. C., Robbins, L., Kiefer, S. M., Zhang, Y., Hunborg, P., Varvares, M. A., Rauchman, M., & Peng, G. (2018). SALL1 functions as a tumor suppressor in breast cancer by regulating cancer cell senescence and metastasis through the NuRD complex. *Molecular Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-018-0824-Y>
- Markowitz, S. (2000). TGF-beta receptors and DNA repair genes, coupled targets in a pathway of human colon carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1470(1). [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(99\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(99)00031-1)
- Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular Basis of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(25), 2449–2460. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA0804588>
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Brattain, M., & Willson, J. K. V. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5215), 1336–1338. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7761852>
- Ma, T., Shi, S., Jiang, H., Chen, X., Xu, D., Ding, X., Zhang, H., & Xi, Y. (2021). A pan-cancer study of spalt-like transcription factors 1/2/3/4 as therapeutic targets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 711. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2021.109016>
- Matsushita, Y., Komatsu, M., Kiyotani, K., Yoshimaru, T., Suzuki, H., Miyoshi, Y., Sasa, M., & Katagiri, T. (2019). Abstract 5313: Frequent downregulation of SALL3 by genetic and epigenetic alterations is involved in progression and chemoresistance of triple negative breast cancers. *Cancer Research*, 79(13_Supplement), 5313–5313. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-5313>
- Ma, Y., Cui, W., Yang, J., Qu, J., Di, C., Amin, H. M., Lai, R., Ritz, J., Krause, D. S., & Chai, L. (2006). SALL4, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (AML) and induces AML in transgenic mice. *Blood*, 108(8), 2726–2735. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-02-001594>
- Ma, Y., Li, D., Chai, L., Luciani, A. M., Ford, D., Morgan, J., & Maizel, A. L. (2001). Cloning and Characterization of Two Promoters for the Human HSAL2 Gene and Their

- Transcriptional Repression by the Wilms Tumor Suppressor Gene Product. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48223–48230. <https://doi.org/10.1074/JBC.M106468200>
- Meng, M., Zhong, K., Jiang, T., Liu, Z., Kwan, H. Y., & Su, T. (2021). The current understanding on the impact of KRAS on colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 140, 111717. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111717>
- Meng, X., Wu, J., Pan, C., Wang, H., Ying, X., Zhou, Y., Yu, H., Zuo, Y., Pan, Z., Liu, R. Y., & Huang, W. (2013). Genetic and epigenetic down-regulation of microRNA-212 promotes colorectal tumor metastasis via dysregulation of MnSOD. *Gastroenterology*, 145(2). <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2013.04.004>
- Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2007). BRAFE600 in benign and malignant human tumours. *Oncogene* 2008 27:7, 27(7), 877–895. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210704>
- Milella, M., Falcone, I., Conciatori, F., Incani, U. C., Del Curatolo, A., Inzerilli, N., Nuzzo, C. M. A., Vaccaro, V., Vari, S., Cognetti, F., & Ciuffreda, L. (2015). PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Frontiers in Oncology*, 5(FEB). <https://doi.org/10.3389/FONC.2015.00024>
- Misawa, K., Mochizuki, D., Imai, A., Misawa, Y., Endo, S., Mima, M., Kawasaki, H., Carey, T. E., & Kanazawa, T. (2017). Epigenetic silencing of SALL3 is an independent predictor of poor survival in head and neck cancer. *Clinical Epigenetics*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13148-017-0363-1>
- Molina-Cerrillo, J., San Román, M., Pozas, J., Alonso-Gordoa, T., Pozas, M., Conde, E., Rosas, M., Grande, E., García-Bermejo, M. L., & Carrato, A. (2020). BRAF Mutated Colorectal Cancer: New Treatment Approaches. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 1571, 12(6), 1571. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12061571>
- Neal, C. P., Garcea, G., Doucas, H., Manson, M. M., Sutton, C. D., Dennison, A. R., & Berry, D. P. (2006). Molecular prognostic markers in resectable colorectal liver metastases: a systematic review. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 42(12), 1728–1743. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2006.01.056>
- Neumann, J., Wehweck, L., Maatz, S., Engel, J., Kirchner, T., & Jung, A. (2013). Alterations in the EGFR pathway coincide in colorectal cancer and impact on prognosis. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology*, 463(4), 509–523. <https://doi.org/10.1007/S00428-013-1450-0>

- Normanno, N., Cervantes, A., Ciardiello, F., De Luca, A., & Pinto, C. (2018). The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios. *Cancer Treatment Reviews*, 70, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2018.07.007>
- Parrish, M., Ott, T., Lance-Jones, C., Schuetz, G., Schwaeger-Nickolenko, A., & Monaghan, A. P. (2004). Loss of the Sall3 gene leads to palate deficiency, abnormalities in cranial nerves, and perinatal lethality. *Molecular and Cellular Biology*, 24(16), 7102–7112. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.16.7102-7112.2004>
- Qayoom, H., Bashir, S., Mir, M. A., Khan, R., Hussain, M. U., & Wani, S. (2024). Exploring SALL4 as a significant prognostic marker in breast cancer and its association with progression pathways involved in cancer genesis. *Computational Biology and Chemistry*, 112, 108164. <https://doi.org/10.1016/J.COMPBIOLCHEM.2024.108164>
- Reddy, L. H. (2005). Drug delivery to tumours: recent strategies. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(10), 1231–1242. <https://doi.org/10.1211/JPP.57.10.0001>
- Rex, D. K., Boland, C. R., Dominitz, J. A., Giardiello, F. M., Johnson, D. A., Kaltenbach, T., Levin, T. R., Lieberman, D., & Robertson, D. J. (2017). Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients From the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 153(1), 307–323. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2017.05.013/ASSET/F9FD1152-EC4B-4797-A29D-E68675FCFC7F/MAIN.ASSETS/GR1.JPG>
- Rosty, C., Young, J. P., Walsh, M. D., Clendenning, M., Sanderson, K., Walters, R. J., Parry, S., Jenkins, M. A., Win, A. K., Southey, M. C., Hopper, J. L., Giles, G. G., Williamson, E. J., English, D. R., & Buchanan, D. D. (2013). PIK3CA Activating Mutation in Colorectal Carcinoma: Associations with Molecular Features and Survival. *PLoS ONE*, 8(6), e65479. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0065479>
- Saha, S., Bardelli, A., Buckhaults, P., Velculescu, V. E., Rago, C., St. Croix, B., Romans, K. E., Choti, M. A., Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2001). A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), 1343–1346. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1065817>
- Sakorafas, G. H., Zouros, E., & Peros, G. (2006). Applied vascular anatomy of the colon and rectum: clinical implications for the surgical oncologist. *Surgical Oncology*, 15(4), 243–255. <https://doi.org/10.1016/J.SURONC.2007.03.002>

- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K. V., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5670), 554. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1096502>
- Santucci, C., Mignozzi, S., Malvezzi, M., Boffetta, P., Collatuzzo, G., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2024). European cancer mortality predictions for the year 2024 with focus on colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 35(3), 308–316. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2023.12.003>
- Sato, A., Kishida, S., Tanaka, T., Kikuchi, A., Kodama, T., Asashima, M., & Nishinakamura, R. (2004). Sall1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, enhances the canonical Wnt signaling by localizing to heterochromatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.156>
- Sazanov, A. A., Kiselyova, E. V., Zakharenko, A. A., Romanov, M. N., & Zaraysky, M. I. (2017). Plasma and saliva miR-21 expression in colorectal cancer patients. *Journal of Applied Genetics*, 58(2), 231–237. <https://doi.org/10.1007/S13353-016-0379-9>
- Schirripa, M., & Lenz, H. J. (2016). Biomarker in Colorectal Cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 22(3), 156–164. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000190>
- Shikauchi, Y., Saiura, A., Kubo, T., Niwa, Y., Yamamoto, J., Murase, Y., & Yoshikawa, H. (2009). SALL3 interacts with DNMT3A and shows the ability to inhibit CpG island methylation in hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biology*, 29(7), 1944–1958. <https://doi.org/10.1128/MCB.00840-08>
- Shi, H., Huang, S., Qin, M., Xue, X., Guo, X., Jiang, L., Hong, H., Fang, J., & Gao, L. (2021). Exosomal circ_0088300 derived from cancer-associated fibroblasts acts as a miR-1305 sponge and promotes gastric carcinoma cell tumorigenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 676319. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.676319>
- Shi, L., Zhao, Y., Liu, X., Qian, J., Yang, X., & Li, W. (2023). Circular RNA circWHSC1 facilitates colorectal cancer cell proliferation by targeting miR-130a-5p/zeb1 signaling in vitro and in vivo. *Heliyon*, 9(10), e20176. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2023.E20176>
- Siegel Mph, R. L., Giaquinto, A. N., Ahmedin, J., Dvm, J., & Siegel, R. L. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(1), 12–49. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21820>

- Siegel, R. L., Wagle, N. S., Cercek, A., Smith, R. A., & Jemal, A. (2023). Colorectal cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(3), 233–254. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21772>
- Sills, E. S., & Wood, S. H. (2021). *Phenotype from SAMD9 Mutation at 7p21.1 Appears Attenuated by Novel Compound Heterozygous Variants at RUNX2 and SALL1*. <https://doi.org/10.20944/PREPRINTS202109.0458.V1>
- Sood, A., McClain, D., Maitra, R., Basu-Mallick, A., Seetharam, R., Kaubisch, A., Rajdev, L., Mariadason, J. M., Tanaka, K., & Goel, S. (2012). PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 11(2), 143–150. <https://doi.org/10.1016/J.CLCC.2011.12.001>
- Stiegelbauer, V., Perakis, S., Deutsch, A., Ling, H., Gerger, A., & Pichler, M. (2014). MicroRNAs as novel predictive biomarkers and therapeutic targets in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(33), 11727. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I33.11727>
- Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., & Anker, P. (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta*, 313(1–2), 139–142. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00665-9](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00665-9)
- Sun, B., Xu, L., Bi, W., & Ou, W. Bin. (2022). SALL4 Oncogenic Function in Cancers: Mechanisms and Therapeutic Relevance. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS23042053>,
- Sung, C. K., Dahl, J., Yim, H., Rodig, S., & Benjamin, and T. L. (2011). Transcriptional and post-translational regulation of the quiescence factor and putative tumor suppressor p150(Sal2). *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(4), 1275–1283. <https://doi.org/10.1096/FJ.10-173674>
- Sung, C. K., Li, D., Andrews, E., Drapkin, R., & Benjamin, T. (2013). Promoter methylation of the SALL2 tumor suppressor gene in ovarian cancers. *Molecular Oncology*, 7(3), 419–427. <https://doi.org/10.1016/J.MOLONC.2012.11.005>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and

- Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Suvà, M. L., Rheinbay, E., Gillespie, S. M., Patel, A. P., Wakimoto, H., Rabkin, S. D., Riggi, N., Chi, A. S., Cahill, D. P., Nahed, B. V., Curry, W. T., Martuza, R. L., Rivera, M. N., Rossetti, N., Kasif, S., Beik, S., Kadri, S., Tirosh, I., Wortman, I., ... Bernstein, B. E. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*, 157(3), 580–594. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.030>
- Sweetman, D., & Münsterberg, A. (2006). The vertebrate spalt genes in development and disease. *Developmental Biology*, 293(2), 285–293. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2006.02.009>
- Szvicsek, Z., Oszvald, Á., Szabó, L., Sándor, G. O., Kelemen, A., Soós, A. Á., Pálóczi, K., Harsányi, L., Tölgyes, T., Dede, K., Bursics, A., Buzás, E. I., Zeöld, A., & Wiener, Z. (2019). Extracellular vesicle release from intestinal organoids is modulated by Apc mutation and other colorectal cancer progression factors. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 76(12), 2463. <https://doi.org/10.1007/S00018-019-03052-1>
- Tsai, N. W., Lin, T. K., Chen, S. Der, Chang, W. N., Wang, H. C., Yang, T. M., Lin, Y. J., Jan, C. R., Huang, C. R., Liou, C. W., & Lu, C. H. (2011). The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 412(5–6), 476–479. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2010.11.036>
- Tural, D., Batur, S., Erdamar, S., Akar, E., Kepil, N., Mandel, N. M., & Serdengeçti, S. (2014). Analysis of PTEN, BRAF and PI3K status for determination of benefit from cetuximab therapy in metastatic colorectal cancer patients refractory to chemotherapy with wild-type KRAS. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(2), 1041–1049. <https://doi.org/10.1007/S13277-013-1138-8>
- Türkiye İstatistik Kurumu. (2018). *Türkiye Kanseri İstatistikleri 2018*. https://hsqm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/Dokumanlar/Istatistikler/Kanser_Rapor_2018.pdf
- Tzeng, S. T., Tsai, M. H., Chen, C. L., Lee, J. X., Jao, T. M., Yu, S. L., Yen, S. J., & Yang, Y. C. (2013a). NDST4 Is a Novel Candidate Tumor Suppressor Gene at Chromosome 4q26

- and Its Genetic Loss Predicts Adverse Prognosis in Colorectal Cancer. *PLOS ONE*, 8(6), e67040. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0067040>
- Tzeng, S. T., Tsai, M. H., Chen, C. L., Lee, J. X., Jao, T. M., Yu, S. L., Yen, S. J., & Yang, Y. C. (2013b). NDST4 is a novel candidate tumor suppressor gene at chromosome 4q26 and its genetic loss predicts adverse prognosis in colorectal cancer. *PloS One*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0067040>
- Uez, N., Lickert, H., Jürgen, K., de Angelis, M. H., Kühn, R., Wurst, W., & Floss, T. (2008). Sall4 isoforms act during proximal–distal and anterior–posterior axis formation in the mouse embryo. *Genesis*, 46(9), 463–477. <https://doi.org/10.1002/DVG.20421>
- VanSchaeybroeck, S., Kalimutho, M., Dunne, P. D., Carson, R., Allen, W., Jithesh, P. V., Redmond, K. L., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Blayney, J., Michieli, P., Fenning, C., Lenz, H. J., Lawler, M., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2014). ADAM17-Dependent c-MET-STAT3 Signaling Mediates Resistance to MEK Inhibitors in KRAS Mutant Colorectal Cancer. *Cell Reports*, 7(6), 1940–1955. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.05.032>
- Wang, D. S., Yamazaki, K., Nohtomi, K., Shizume, K., Ohsumi, K., Shibuya, M., Demura, H., & Sato, K. (1996). Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblast-like cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 11(4), 472–479. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650110408>
- Wang, W., Tang, W., Shan, E., Zhang, L., Chen, S., Yu, C., & Gao, Y. (2022). MiR-130a-5p contributed to the progression of endothelial cell injury by regulating FAS. *European Journal of Histochemistry : EJH*, 66(2), 3342. <https://doi.org/10.4081/EJH.2022.3342>
- Wang, Y., Li, Y., & Li, X. (2022). Ultrasound microbubble-mediated miR-503–5p downregulation suppressed in vitro CRC progression via promoting SALL1 expression. *Tissue and Cell*, 76, 101811. <https://doi.org/10.1016/J.TICE.2022.101811>
- Ward, R., Meagher, A., Tomlinson, I., O'Connor, T., Norrie, M., Wu, R., & Hawkins, N. (2001). Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*, 48(6), 821–829. <https://doi.org/10.1136/GUT.48.6.821>
- Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Ferrara, N., & Donner, D. B. (1996). Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 29483–29488. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.46.29483>

- Watanabe, T., Wu, T.-T., Catalano, P. J., Ueki, T., Satriano, R., Haller, D. G., Benson, A. B., & Hamilton, S. R. (2001). Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *The New England Journal of Medicine*, 344(16), 1196–1206. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104193441603>
- Weissmann-Brenner, A., Kushnir, M., Yanai, G. L., Aharonov, R., Gibori, H., Purim, O., Kundel, Y., Morgenstern, S., Halperin, M., Niv, Y., & Brenner, B. (2012). Tumor microRNA-29a expression and the risk of recurrence in stage II colon cancer. *International Journal of Oncology*, 40(6), 2097–2103. <https://doi.org/10.3892/IJO.2012.1403>
- Wei, X., Zhang, S., Cao, D., Zhao, M., Zhang, Q., Zhao, J., Yang, T., Pei, M., Wang, L., Li, Y., & Yang, X. (2015). Aberrant Hypermethylation of SALL3 with HPV Involvement Contributes to the Carcinogenesis of Cervical Cancer. *PLOS ONE*, 10(12), e0145700. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0145700>
- Wheeler, J. M. D., Loukola, A., Aaltonen, L. A., McC Mortensen, N. J., & Bodmer, W. F. (2000). The role of hypermethylation of the hMLH1 promoter region in HNPCC versus MSI+ sporadic colorectal cancers. *Journal of Medical Genetics*, 37(8), 588–592. <https://doi.org/10.1136/JMG.37.8.588>
- Xian, X., Tang, L., Wu, C., & Huang, L. (2018). miR-23b-3p and miR-130a-5p affect cell growth, migration and invasion by targeting CB1R via the Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 11, 7503. <https://doi.org/10.2147/OTT.S181706>
- Yang, J., Aguila, J. R., Alipio, Z., Lai, R., Fink, L. M., & Ma, Y. (2011). Enhanced self-renewal of hematopoietic stem/progenitor cells mediated by the stem cell gene Sall4. *Journal of Hematology and Oncology*, 4(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-38/FIGURES/10>
- Yang, J., Gao, C., Chai, L., & Ma, Y. (2010). A Novel SALL4/OCT4 Transcriptional Feedback Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE*, 5(5), e10766. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010766>
- Yang, J., Liao, W., & Ma, Y. (2012). Role of SALL4 in hematopoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 19(4), 287–291. <https://doi.org/10.1097/MOH.0B013E328353C684>
- Yang, M., Xie, X., & Ding, Y. (2016). SALL4 is a marker of poor prognosis in serous ovarian carcinoma promoting invasion and metastasis. *Oncology Reports*, 35(3), 1796–1806. <https://doi.org/10.3892/OR.2016.4545>

- Yang, S., Lu, W., Zhao, C., Zhai, Y., Wei, Y., Liu, J., Yu, Y., Li, Z., & Shi, J. (2020). Leukemia cells remodel marrow adipocytes via TRPV4-dependent lipolysis. *Haematologica*, 105(11), 2572–2583. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2019.225763>,
- Yang, X. X., Sun, J. Z., Li, F. X., Wu, Y. S., Du, H. Y., Zhu, W., Li, X. H., & Li, M. (2012). Aberrant methylation and downregulation of sall3 in human hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 18(21), 2719–2726. <https://doi.org/10.3748/WJG.V18.I21.2719>
- Yan, H., Papadopoulos, N., Marra, G., Perrera, C., Jiricny, J., Boland, C. R., Lynch, H. T., Chadwick, R. B., De La Chapelle, A., Berg, K., Eshleman, J. R., Yuan, W., Markowitz, S., Laken, S. J., Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2000). Conversion of diploidy to haploidy. *Nature*, 403(6771), 723–724. <https://doi.org/10.1038/35001659>
- Yan, T. T., Ren, L. L., Shen, C. Q., Wang, Z. H., Yu, Y. N., Liang, Q., Tang, J. Y., Chen, Y. X., Sun, D. F., Zgodzinski, W., Majewski, M., Radwan, P., Kryczek, I., Zhong, M., Chen, J., Liu, Q., Zou, W., Chen, H. Y., Hong, J., & Fang, J. Y. (2018a). miR-508 Defines the Stem-like/Mesenchymal Subtype in Colorectal Cancer. *Cancer Research*, 78(7), 1751–1765. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2101>
- Yan, T. T., Ren, L. L., Shen, C. Q., Wang, Z. H., Yu, Y. N., Liang, Q., Tang, J. Y., Chen, Y. X., Sun, D. F., Zgodzinski, W., Majewski, M., Radwan, P., Kryczek, I., Zhong, M., Chen, J., Liu, Q., Zou, W., Chen, H. Y., Hong, J., & Fang, J. Y. (2018b). miR-508 defines the stem-like/mesenchymal subtype in colorectal cancer. *Cancer Research*, 78(7), 1751–1765. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2101>,
- Yildizhan, H., Barkan, N. P., Turan, S. K., Demiralp, Ö., Demiralp, F. D. Ö., Uslu, B., & Özkan, S. A. (2018). Treatment strategies in cancer from past to present. *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*, 1–37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00001-X>
- Yuan, J., Li, G., Zhong, F., Liao, J., Zeng, Z., Ouyang, S., Xie, H., Deng, Z., Tang, H., & Ou, X. (2023). SALL1 promotes proliferation and metastasis and activates phosphorylation of p65 and JUN in colorectal cancer cells. *Pathology, Research and Practice*, 250. <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2023.154827>
- Yuan, X., Zhang, X., Zhang, W., Liang, W., Zhang, P., Shi, H., Zhang, B., Shao, M., Yan, Y., Qian, H., & Xu, W. (2016). SALL4 promotes gastric cancer progression through activating CD44 expression. *Oncogenesis*, 5(11). <https://doi.org/10.1038/ONCSIS.2016.69>

- Yuri, S., Fujimura, S., Nimura, K., Takeda, N., Toyooka, Y., Fujimura, Y. I., Aburatani, H., Ura, K., Koseki, H., Niwa, H., & Nishinakamura, R. (2009). Sall4 Is Essential for Stabilization, But Not for Pluripotency, of Embryonic Stem Cells by Repressing Aberrant Trophectoderm Gene Expression. *Stem Cells*, 27(4), 796–805. <https://doi.org/10.1002/STEM.14>
- Zhang, C., Zhao, H., Li, J., Liu, H., Wang, F., Wei, Y., Su, J., Zhang, D., Liu, T., & Zhang, Y. (2015). The identification of specific methylation patterns across different cancers. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0120361>,
- Zhang, D. Y., Shen, X. Z., Wang, J. Y., Dong, L., Zheng, Y. L., & Wu, L. L. (2008). Preparation of chitosan-polyaspartic acid-5-fluorouracil nanoparticles and its anti-carcinoma effect on tumor growth in nude mice. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 14(22), 3554. <https://doi.org/10.3748/WJG.14.3554>
- Zhang, J., Tam, W. L., Tong, G. Q., Wu, Q., Chan, H. Y., Soh, B. S., Lou, Y., Yang, J., Ma, Y., Chai, L., Ng, H. H., Lufkin, T., Robson, P., & Lim, B. (2006). Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nature Cell Biology* 2006 8:10, 8(10), 1114–1123. <https://doi.org/10.1038/ncb1481>
- Zhang, L., Xu, Z., Xu, X., Zhang, B., Wu, H., Wang, M., Zhang, X., Yang, T., Cai, J., Yan, Y., Mao, F., Zhu, W., Shao, Q., Qian, H., & Xu, W. (2014). SALL4, a novel marker for human gastric carcinogenesis and metastasis. *Oncogene*, 33(48), 5491–5500. <https://doi.org/10.1038/ONC.2013.495>
- Zhao, L., & Vogt, P. K. (2008). Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2652–2657. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0712169105>
- Zhao, M., Chang, J., Liu, R., Liu, Y., Qi, J., Wang, Y., Zhang, X., Qiao, L., Jin, Y., An, H., & Ren, L. (2020). miR-495 and miR-5688 are down-regulated in non-small cell lung cancer under hypoxia to maintain interleukin-11 expression. *Cancer Communications*, 40(9), 435. <https://doi.org/10.1002/CAC2.12076>
- Zhu, H., & Xie, Z. (2024). Therapeutic potential of tLyp-1-EV-shCTCF in inhibiting liver cancer stem cell self-renewal and immune escape via SALL3 modulation in hepatocellular carcinoma. *Translational Oncology*, 49, 102048. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2024.102048>

Zhu, X., & Li, S. (2023). Ferroptosis, Necroptosis, and Pyroptosis in Gastrointestinal Cancers: The Chief Culprits of Tumor Progression and Drug Resistance. *Advanced Science*, 10(26). <https://doi.org/10.1002/ADVS.202300824>



HAM VERİLER



FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ!!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Transkripsiyon faktörleri, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, hücrenin fenotipi ve fonksiyonunun belirlenmesinde, hücrelerin çevresel koşullara yanıtında önemli rol oynarlar. Transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar, insersiyon ve delesyonlar, amplifikasyonlar veya epigenetik değişiklikler, karsinogenez, progresyon, metastaz ve tedaviye direnç ile ilişkili bulunmuştur. SALL proteinleri, Spalt benzeri (SALL) ailesine ait ve evrimsel olarak büyük ölçüde korunmuş transkripsiyon faktörleridir. Hücre çoğalması, hayatta kalma ve göç gibi pek çok hücre fonksiyonunda görev alırlar. Bu gen ailesinde meydana gelen genetik değişikliklerin serviks, böbrek, meme ve kolorektal kanserlerin gelişimi ve prognozu ile ilişkili ilgili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Kolorektal kanser, dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen ikinci, erkeklerde üçüncü malignitedir. Yeni terapötik yaklaşımlara rağmen bu hastalarda yüksek oranda nüks görülmektedir. Bu nedenle tanı ve tedaviyi kolaylaştıracak yeni hedeflerin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan son çalışmalar SALL1 genini, kolon kanseri hastalarında sağkalımı öngören dokuz prognostik gen imzasından biri olarak tanımlamıştır. Ayrıca kolon kanseri hastalarının büyük bir kısmında ise SALL4'ün aşırı ekspresyonunun, metastaz ve Dukes evreleri ile pozitif korelasyon gösterdiği çalışmalar mevcuttur. Ancak kolon kanserinde SALL2 veya SALL3 ile ilgili çalışmalar henüz bulunmamaktadır. 18-25 nükleotid uzunluğunda küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olan miRNA'lar, hedef genlerin ekspresyonunu modüle ederek karsinogenez ve progresyonda rol oynayan anahtar düzenleyicilerdir. SALL gen ailesinin düzenlenmesinde de miRNA'lar önemli rol oynamaktadır. SALL gen ailesi hedefli miRNA'lardan hsa-miR-5688, hsa-miR-1305, hsa-miR-130a-5p ve hsa-miR-1226-3p'nin daha önce kolon kanserinde çalışıldığına dair bir yayın bulunmamaktadır. Bu araştırmalardan yola çıkılarak tez çalışmamızda kolon kanserli 25 hastanın tümör ve

normal dokusunda SALL1, SALL2, SALL3 ve SALL4 genlerinin ve bunların düzenlenmesinde rol oynayan hsa-miR-5688, hsa-miR-1305, hsa-miR-130a-5p ve hsa-miR-1226-3p miRNA'larının ekspresyonlarındaki değişikliklerin ve birbiriyle olan etkileşimlerinin araştırılması hedeflenmektedir. Çalışmadan elde edilecek sonuçların kolon kanserinde prediktif ve prognostik açıdan önemli çıktılar sağlamasını ve literatüre katkıda bulunması amaçlanmaktadır.

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

Çalışma, İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Bilim Dalı Laboratuvarlarında yapılacaktır ve aşağıdaki protokolle belirtilen yol izlenecektir. Çalışmada; İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalına başvuran, radyoloji ve biyopsi test sonuçları doğrultusunda kolon kanseri tanısı almış, araştırmaya dahil olmayı kabul eden ve gönüllü onamı imzalamış daha önce kemoterapi ya da radyoterapi tedavisi görmemiş 25 kolon kanser hastasının tümör dokusunda ve yine aynı hastanın tümör eşlenik sağlıklı dokusunda çalışılacaktır. Radyoloji ve biyopsi test sonuçları doğrultusunda kolon kanseri tanısı olan hastaların İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında kolon cerrahisinde alınan ameliyat doku materyallerinden gerçekleştirilecek moleküler işlemler Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Bilim Dalı Laboratuvarlarında analizi edilecektir. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı tarafından kolon rezeksiyon materyalleri alınıp, fiksasyon öncesinde cerrahi rezeksiyon ile alınmış olan tümör dokusunun gerekli kısmı rutin testler için gönderildikten sonra geri kalan rezeksiyon materyali RNA örnekleme için tarafımıza ulaştırılacaktır, canlı tümör dokusundan 1 adet ve tümör dışı kolon parenkiminden 1 adet olmak üzere yaklaşık 3-5 mm boyutunda dokular örneklenerek, RNAlater solüsyonu içerisine alınacak ve uygun koşullarda muhafaza edilecektir. Ardından, tümör ve normal doku kullanılarak gen (mRNA) ve miRNA ekspresyonu çalışması gerçekleştirilecektir. Dijital PCR yöntemi kullanılarak sonuçlar analiz edilecektir.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada 13 erkek ve 12 kadın olmak üzere toplamda 25 gönüllüye ait tümör doku ve tümör dokuya eşlenik komşu sağlıklı doku örnekleri incelenecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMANIZ İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Bu araştırma kapsamında hastanızın tümör doku örneğinin incelenmesine izin vermeniz size doğrudan herhangi bir fayda sağlamayabilir. Kolon kanserinde daha önce araştırılmamış genlerin ve miRNA'ların incelenmesine, kolon kanserinde erken teşhis ve prognozunda rol oynamasına yardımcı olabilir. Bu araştırmanın sonuçları sadece bilimsel amaçlarla kullanılacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMANIZ İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Bu çalışma kapsamında hastanızın tümör doku örneğinin incelenmesine izin vermenizin herhangi bir riski bulunmamaktadır.

ÇALIŞMAYA KATILMANIZ NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu çalışmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMENİZ DURUMUNDA NE YAPMANIZ GEREKİR?

Bu çalışmada hastanın yer alması tamamen kendi isteğine bağlıdır. Hasta çalışmada yer almayı reddedebilir. Reddetmeniz durumunda hastanızın örnekleri standart ve rutin yöntemlerle incelenmeye devam edecektir.

KATILMANIZ HALİNDE HASTANIZIN BİLGİLERİ KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MİDİR?

Hastanıza ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileri gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileri verilmeyecektir. Ancak etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde hastanızın tıbbi bilgilerine ulaşabilir. Siz de istediğinizde hastanıza ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Dr. Öğr. Üyesi Şeref Buğra Tunçer tarafından İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Bilim Dalı Laboratuvarlarında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Sorumlu Araştırmacı Doç. Dr. Şeref Buğra Tunçer’i veya yardımcı araştırmacılar Doç. Dr. Nergis Dağoğlu Sakin’i ve Dr. Öğr. Görevlisi Cemil Burak Külle’yi arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmza ve ulaşım bilgileri

“Kolon Kanserinde SALL Gen Ailesi ve miRNA’ların Rolünün Araştırılması” adlı çalışmada ilgili genetik analiz ve miRNA ekspresyon analizi yaptırmayı:

EVET, ☐ istiyorum;

HAYIR, ☐ istemiyorum

Gönüllünün

Gönüllü

Adı Soyadı : _____ İmzası: _____

Tarih:.....

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı Soyadı: _____ imzası: _____

Tarih:.....

Hastanın Ulaşabileceği Hekim ve İletişim Bilgileri:

Adı Soyadı: Doç. Dr. Şeref Buğra TUNÇER

İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, 34093 Çapa, İstanbul

Not: Bu form bir nüshası hastaya verilmek üzere, diğer nüshası arşivde saklanmak kaydıyla iki nüsha halinde hazırlanmış ve imzalanmıştır.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI, SOYADI		
ADRESİ		
TELEFON		
TARİH		

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASININ		İMZASI
ADI, SOYADI		
ADRESİ		
TELEFON		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACININ		İMZASI
ADI, SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI, SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

ETİK KURUL ONAYI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KOLON KANSERİNDE SALL GEN AİLESİ VE MİRNA'LARIN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

% 10	% 8	% 8	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	ouci.dntb.gov.ua İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	Abderrahman Ouban. "Expression of SALL4 stemness marker in laryngeal squamous cell carcinomas (LSCCs) and its clinical significance", All Life, 2021 Yayın	<% 1
8	Drenka I. Trivanović, Ivana T. Drvenica. "Bone Marrow Adipose Tissue: Impacts on Bone Marrow Stem Cell Niche and Hematopoietic System", Elsevier BV, 2024 Yayın	<% 1
9	iris.uniroma1.it İnternet Kaynağı	<% 1
10	Submitted to University of Suffolk	