

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DDIT4 GEN EKSPRESYONUNUN KOLOREKTAL KANSERDE PROGNOSTİK VE
TERAPÖTİK ÖNEMİNİN AYDINLATILMASI

Fatma Gülce Demir

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili
Eş Danışman
Dr. Öğretim Görevlisi Nevin Belder

Ocak

2025

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Fatma Gülce Demir

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili danışmanlığında Fatma Gülce Demir tarafından hazırlanan bu çalışma 31/01/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Unvan, Ad, Soyad, Kurum

İmza:

Üye: Unvan, Ad, Soyad, Kurum

İmza:

Üye: Unvan, Ad, Soyad, Kurum

İmza:

Üye: Unvan, Ad, Soyad, Kurum

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Demet Cansaran Duman

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DDIT4 GEN EKSPRESYONUNUN KOLOREKTAL KANSERDE PROGNOTİK VE TERAPÖTİK ÖNEMİNİN AYDINLATILMASI

Fatma Gülce Demir

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili

DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4), kanserlerin patogeneğinde kritik süreçlerde rol oynayan önemli bir biyobelirteç adayı moleküdür. Ancak, DDIT4'ün kolorektal kanser (KRK) patogeneğindeki rolü ve klinik potansiyeli yeterli incelenmemiştir. Bu doğrultuda tez çalışmasında, DDIT4'ün KRK'deki ifade düzeyleri ve klinik-moleküler parametrelerle ilişkisi değerlendirilerek, genin diyagnostik, prognostik ve terapötik potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, biyoinformatik analizlerle TCGA ve GEO KRK veri setlerinde DDIT4 ifadesi tümör ve kontrol dokularında karşılaştırılmış; klinikopatolojik özellikler ve sağkalım sonuçlarıyla ilişkisi incelenmiş ve ayrıca polip-adenokarsinom-metastaz aksisinde ifade paterni analiz edilmiştir. Potansiyel mekanizmalar koekspresyon, GSEA ve gen-protein etkileşim analizleriyle değerlendirilmiştir. DDIT4 ifadesi toplanan tümör ve eşli normal dokularda (n=60) ve KRK hücre hatlarında qRT-PCR ve western blot ile doğrulanmış; lokalizasyon ilişkisi bağımsız bir KRK kohortu FFPE örneklerinde (n=126) retrospektif olarak analiz edilmiştir. Bulgularımız, on beş farklı KRK transkriptom analizinde DDIT4 ifadesinin yüksek olduğunu (p<0.05) ve tümör diferansiyasyonu, hastalık nüksü ve kötü sağkalım oranlarıyla anlamlı bir ilişkisi olduğunu göstermiştir. Sağ kolon tümörlerinde DDIT4'ün artmış ifadesi ve MSI, CIMP ve BRAF mutasyonu gibi agresif özelliklerle ilişkisi ilk kez çalışmamızda ortaya konmuştur. Biyoinformatik analizler, DDIT4'ün KRK patogeneğinde hipoksi, epitelyal-mezenkimal geçiş ve mTOR yollarıyla bağlantılı olduğunu göstermiştir. İn vitro analizler ve KRK eşli tümör-normal dokusunda (n=60) RNA ve protein düzeylerinde kanserde yüksek ifade profili doğrulanmıştır (p<0.05). Sağ kolonda yüksek DDIT4 ifadesi trendi gözlenmiş, ancak istatistiksel anlamlılıkla doğrulanamamıştır. Bu çalışma, DDIT4'ün KRK'de yüksek düzeyde ifade edildiğini, kötü prognoz ve nüks ile ilişkili olduğunu, sağ kolon tümörlerinde daha yüksek bir profil sergilediğini ve bölgesel farklılıkları da içeren kritik bir biyobelirteç olduğunu göstermiştir. Ayrıca, ileri çalışmalar için terapötik bir hedef olarak değerlendirilebilme potansiyeli sergilemiştir.

2025, 138 sayfa

Anahtar kelimeler: DDIT4, Kolorektal Kanser, Terapötik Hedef, Biyobelirteç

ABSTRACT

MSc Thesis

Elucidating The Prognostic and Therapeutic Significance of DDIT4 Gene Expression in Colorectal Cancer

Fatma Gülce Demir

Ankara University, Biotechnology Institute

Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili

DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4) is an important biomarker involved in critical processes in cancer pathogenesis. However, its role and clinical potential in colorectal cancer (CRC) pathogenesis remain insufficiently explored. This study aims to investigate the expression levels of DDIT4 in CRC and its association with clinical-molecular parameters, evaluating its diagnostic, prognostic, and therapeutic potential. Bioinformatics analyses were performed on TCGA and GEO CRC datasets, comparing DDIT4 expression in tumor and control tissues, and examining its correlation with clinicopathological features and survival outcomes. Additionally, expression patterns were analyzed along the polyp-adenocarcinoma-metastasis axis. Potential mechanisms were assessed using co-expression, GSEA, and gene-protein interaction analyses. DDIT4 expression was validated in collected tumor and matched normal tissues (n=60) and CRC cell lines using qRT-PCR and western blot, with its localization relationship analyzed retrospectively in an independent CRC cohort of FFPE samples (n=126). Our findings revealed that DDIT4 expression was significantly higher in 15 different CRC transcriptome analyses ($p<0.05$), and increased expression was correlated with tumor differentiation, disease recurrence, and poor survival. For the first time, we found an association between elevated DDIT4 expression in right colon tumors and aggressive features such as MSI, CIMP, and BRAF mutations. Bioinformatics analyses indicated that DDIT4 is linked to hypoxia, epithelial-mesenchymal transition, and mTOR signaling pathways. In vitro analyses confirmed a high expression profile in cancer tissues ($p<0.05$). This study demonstrates that DDIT4 is a critical biomarker for CRC, associated with poor prognosis and recurrence, and shows potential as a therapeutic target for future studies

2025, 138 pages

Keywords: DDIT4, Colorectal Cancer, Therapeutic Target, Biomarker

TEŞEKKÜR

İlk olarak; yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyuncaengin bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren, yardımcı olan; bu süreçte yalnızca akademik değil, hayatımın diğer alanlarında da bana desteğini ve yardımlarını hissettiren, her zaman duygu ve düşüncelerimi özgürce paylaşabileceğim konforlu bir alanı bana sağlayan, hem profesyonel hem de özel yaşamıyla rol model aldığım Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili'ye, akademinin ve hayatın doğası gereği yaşanan stresli ve zorlu süreçleri beni her zaman motive ederek ve bana güven vererek atlatmama yardımcı olduğu için çok teşekkür ederim.

Bana projesinde yer veren, değerli emeğini ve vaktini esirgemeyen Sayın Eş Danışman Hocam Dr. Nevin Belder'e,

Her bir öğrencisinin derdini dikkatle dinleyip çözüm üretmek için çabalayan, varlığını ve desteğini bize her zaman hissettiren Sayın Enstitü Müdürümüz Prof. Dr. Demet Cansaran Duman'a,

Bu tez çalışmasını kapsayan 122S340 numaralı projeyi destekleyen ve aynı zamanda bilimsel gelişimim için gereken kaynakları bana sağlayan, 2210-A kapsamında bursiyeri olduğum TÜBİTAK'a,

Bu süreçte laboratuvarı paylaştığımız, deneyimleriyle bana yardımcı ve arkadaş olan Sevgili Hocam Dr. Berşan Seçil Durel Avcıoğlu'na ve tezimin son deneylerinde bana eşlik eden, desteği ve öğrenme merakıyla beni de motive eden Sevgili Çağrı Ulaş Soysal'a,

Her derdime ortak olan laboratuvar koordinatörümüz Sayın Devrim Aydın ve şefimiz Sayın Fatih Yeşil'e, bana ve tüm öğrencilerine konforlu bir çalışma ortamı sunmak için çabalarını eksik etmeyen tüm SİSBİYOTEK ailesine,

Bana hem profesyonel hem de manevi desteğiyle yol gösteren, rehberlik eden, yardımlarını esirgemeyen ve bana çok sevdiğim rahmetli teyzem Dr. Ayten Küçükkaraslan'ın yokluğunu hissettirmeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Leyla Açık'a,

Enstitünün hayatıma kattığı en güzel şeylerden biri olan, çalışma arkadaşım, psikoloğum, sırdaşım ve dostum Ayşenur Evgin'e ve onun sayesinde hayatıma giren, çözüm önerileri ve bilgi birikimiyle bana çok yardımı dokunan Sevgili Sedat Yılmaz'a,

Bu tezin yazım aşamasındaki uzun süreçlerde çalışmayı keyifli hale getiren, yeri geldiğinde çocuklaşabildiğim, hayatlarımızın farklı dönemlerinde olsak da birbirimize destek olabilmek için ortak bir noktada buluşabildiğimiz Sevgili Study Buddy'm Onur Erkan'a,

Yanımda olabilmek ve bana destek olabilmek için elinden gelen fedakarlığı yapan, bu amaç uğruna sevgili evlatları Polaris ve Paris'i bana bırakan, sevgili kuzenim ve kardeşim Eda İpek Demir'e,

Her derdimi dinleyen, bana her zaman inanan, birlikte hayatta kendi yollarımızı arayıp bulduğumuz, bugüne kadar yanımda olan ve hep yanımda olacaklarını bildiğim, çok sevdiğim bütün dostlarıma,

Ve son olarak, teşekkürün en büyüğünü hak eden, bana benden çok inanan, gurur duyduğum her özelliğimin mimarı olan, varlıklarıyla bana güven veren, kendimi çok şanslı hissetmeme sebep olan, benden hiçbir şeylerini esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan en büyük gücüm olan çok sevdiğim annem Gülcan Demir ve babam Cengiz Demir'e her şey için,

Saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

F. Gülce Demir

Ankara, 2025

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. KOLOREKTAL KANSER	5
2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ.....	5
2.1.2. PATOLOJİ	7
2.2. KRK MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ	12
2.2.1. KROMOZOMAL İNSTABİLİTE YOLAĞI.....	12
2.2.2. MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE YOLAĞI.....	13
2.2.3. CPG ADACIKLARI METİLATÖR FENOTİPİ	14
2.2.4. KRK MOLEKÜLER SINIFLANDIRMASI	15
2.3. LOKALİZASYON	16
2.3.1. KRK LOKALİZASYONUNUN KLİNİKOPATOLOJİK FARKLILIKLARI	17
2.3.2. KRK LOKALİZASYONUNUN MOLEKÜLER FARKLILIKLARI.....	18

2.4. KRK'DE DİYAGNOSTİK VE TERAPÖTİK BİYOBELİRTEÇLERİN ÖNEMİ....	19
2.5. DDIT4.....	20
2.5.1. DDIT4 GENİ REGÜLASYONU	21
2.5.2. KANSER VE DDIT4.....	23
2.5.3. KOLOREKTAL KANSER VE DDIT4	24
<u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	<u>27</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>29</u>
4.1. MATERYAL	29
4.1.1. HÜCRE HATLARI	29
4.1.2. DOKU ÖRNEKLERİ	29
4.2. YÖNTEM.....	31
4.2.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER:	31
4.2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ:.....	34
4.2.3. KOLOREKTAL KANSER HASTALARINDAN DOKU TOPLAMA	35
4.2.4. DDIT4 İFADESİNİN MRNA SEVİYESİNDE VALİDASYONU	36
4.2.5. DDIT4 İFADESİNİN PROTEİN SEVİYESİNDE VALİDASYONU	39
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>44</u>
5.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER.....	44
5.1.1. DDIT4 KOLOREKTAL KANSERDE NORMAL DOKULARA GÖRE YÜKSEK İFADE PROFİLİ SERGİLEMEKTEDİR.....	44
5.1.2. YÜKSEK DDIT4 İFADE SEVİYELERİ KÖTÜ PROGNOZ İLE İLİŞKİLİDİR..	46
5.1.3. DDIT4 İFADESİ SAĞ KOLON YERLEŞİMLİ TÜMÖRLER VE BU TÜMÖRLERİN MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ İLE YAKINDAN İLİŞKİLİDİR.....	52

5.1.4. DDIT4 GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİ VE İFADE SEVİYESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ.....	59
5.1.5. DDIT4 GENİ; MTOR, P53 SİNYAL YOLAĞI, HİPOKSİ, İNFLAMASYON İLE İLİŞKİLİ BİYOLOJİK SÜREÇLER ÜZERİNDEN KOLOREKTAL KANSER GELİŞİMİ VE İLERLEMESİNDE ETKİ EDEBİLİR.....	60
5.2. DDIT4 YÜKSEK İFADESİNİN KRK HASTA DOKULARINDA ARAŞTIRILMASI	64
5.2.1. DDIT4 İFADESİNİN TAZE DONDURULMUŞ TÜMÖR VE EŞLİ NORMAL DOKULARINDA RNA SEVİYESİNDE İNCELENMESİ	64
5.2.2. DDIT4 İFADESİNİN FFPE TÜMÖR DOKULARINDA RNA SEVİYESİNDE İNCELENMESİ	67
5.2.3. DDIT4 İFADESİNİN TAZE DONDURULMUŞ TÜMÖR VE EŞLİ NORMAL DOKULARINDA PROTEİN SEVİYESİNDE İNCELENMESİ.....	69
5.3. DDIT4 YÜKSEK İFADESİNİN KRK VE NORMAL EPİTEL HÜCRE SERİLERİNDE VALİDASYONU	72
5.3.1. DDIT4 İFADESİNİN HÜCRE SERİLERİNDE RNA SEVİYESİNDE İNCELENMESİ	72
5.3.2. DDIT4 İFADESİNİN HÜCRE SERİLERİNDE PROTEİN SEVİYESİNDE İNCELENMESİ	73
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>75</u>
6.1. TARTIŞMA	75
6.2. SONUÇ.....	86
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>87</u>
<u>EKLER.....</u>	<u>105</u>
EK 1: ETİK KURUL KARARI	105

EK 2: DDIT4 GENİNİN FARKLI KANSERLERDEKİ ROLÜ İLE İLGİLİ LİTERATÜR ÖZETİ.....	106
EK 3: TOPLANAN HASTA VE EŞLİ NORMAL DOKULARINDAN İZOLE EDİLEN RNA ÖRNEKLERİNİN NANODROP MİKTAR VE SAFLIK SONUÇLARI.....	108
EK 4: TOPLANAN HASTA VE ELKİ NORMAL DOKULARINDAN İZOLE EDİLEN PROTEİN ÖRNEKLERİNİN BCA DEĞERLENDİRİLMESİ SONUÇLARI	110
EK 5: TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN GEO VERİ SETLERİ.....	112
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>117</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>118</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kolonun kolon kanserine evrilmesi, genetik mutasyonların birikimiyle gerçekleşen uzun bir süreçtir. Bu süreçte adenomatöz poliplerin gelişimi, displazi ve nihayetinde invaziv kansere dönüşüm gözlenir.....	8
Şekil 2.2. KRK diferansiyasyon dereceleri immün histokimya görüntüleri (49).....	11
Şekil 2.3. Sağ ve sol KRK özellikleri (A) ve kolonun anatomik segmentleri (B). (71).....	17
Şekil 5.1. DDIT4 geni ifade seviyesi TCGA kolorektal kanser (COAD-READ) ve 14 farklı, bağımsız GEO KRK verisetinde normal dokular ile karşılaştırılması.	45
Şekil 5.2. TCGA tümörlerinde, DDIT4 geninin tümör ve normal dokular arasındaki gen ekspresyon seviyelerinin dağılımları.	46
Şekil 5.3. KRK kanser verisetlerinde, DDIT4 geni ve kanser evreleri arasındaki ilişki.	47
Şekil 5.4. Artmış DDIT4 ifadesi kolorektal kanserde kötü diferansiyasyon ile ilişkisi.	48
Şekil 5.5. DDIT4 geni, nüks gözlenen hastalardaki ifade profili.	48
Şekil 5.6. Yüksek DDIT4 ifadesinin hasta genel sağkalımı üzerinde etkisi.....	49
Şekil 5.7. KRK dokusunda yüksek DDIT4 ekspresyonu artan düşük hastalıksız sağ kalım ile ilişkisi.	49
Şekil 5.8. Kolorektal kanser hastalarında DDIT4 ekspresyonunun polip-primer tümör-metastaz sürecindeki seviye değişimi.....	51
Şekil 5.9. DDIT4'ün kolorektal kanserde yüksek ifadesi tümörün sağ lokalizasyonu ile ilişkisi.	52
Şekil 5.10. DDIT4'ün yüksek ifade profili, genellikle sağ lokalize tümörlerde gözlenen mikrosatellit instabilitesi ile ilişkisi.....	53
Şekil 5.11. DDIT4 gen ifadesinin yetersiz yanlış eşleşme tamir mekanizması (dMMR) görülen hastalardaki seviyesi.....	54

Şekil 5.12. DDIT4 gen ifadesinin CpG adacıkları metilasyon fenotipi (CIMP) pozitif olan hastalardaki seviyesi.	54
Şekil 5.13. DDIT4 geninin kromozomal instabilite (CIN) görülmeyen hastalardaki seviyesi.	55
Şekil 5.14. DDIT4'ün, sağ kolon tümörlerin sıklıkla geliştiği sessile serrated adenomlardaki ifadesi.	56
Şekil 5.15. BRAF mutasyon ile DDIT4 ifadesi arasındaki ilişki.	57
Şekil 5.16. DDIT4 ekspresyonu CMS1 KKR alt grubundaki ifade profili.	58
Şekil 5.17. KKR'da DDIT4 ekspresyonu ile CNV'ler arasındaki ilişki.	60
Şekil 5.18. Omik verisetlerin DDIT4 ile yapılan korelasyon analizleri.	61
Şekil 5.19. GeneMANIA tarafından belirlenen gen-gen etkileşim ağı (A) ve STRING'den türetilen protein-protein etkileşim ağı (B).	63
Şekil 5.20. GeneMANIA ve STRING yolak analizleri.	64
Şekil 5.21. DDIT4'un tümör dokularında qRT-PCR ile validasyonu.	65
Şekil 5.22. DDIT4'ün artmış gen ifade seviyesinin tez kapsamında toplanan kolorektal kanser hasta doku örneklerinde sa-sol kolon qRT-PCR ile karşılaştırması.	66
Şekil 5.23. Artmış DDIT4 ifadesi kolorektal kanser hastalarında ileri evre ve ileri N evre ile korelasyonu.	66
Şekil 5.24. KKR hastalarına ait FFPE doku örneklerinden elde edilen cDNA'larda yapılan qRT-PCR çalışması.	67
Şekil 5.25. DDIT4 sağ kolonun segmentlerinden çekumdaki ifade seviyesi	68
Şekil 5.26. Artmış DDIT4 ifadesi kolorektal kanser hastalarında farklı parametrelerle korelasyonu.	69
Şekil 5.27. DDIT4 proteini western blot görüntü sonuçları.	71

Şekil 5.28. DDIT4'un KRK hücre serileri (HCT116, LoVo ve SW480) ve sağlıklı kontrol kolon hücre serisindeki (CCD841) ifade seviyesi.	73
Şekil 5.29. Kolorektal kanser (HCT116, SW480, LOVO) ve normal kolon epitel hücrelerinde (CCD841) DDIT4 western blot çalışması.	74



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. TNM evreleme kriterleri (47).....	10
Çizelge 2.2. TNM evrelemelerin AJCC evre karşılığı (48).....	11
Çizelge 4.1. Hücrelerin tipleri ve kullanılan besiyeri bilgileri verilmiştir.....	29
Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen hastaların (taze dondurulmuş dokuların) klinikopatolojik ve demografik özellikleri.....	30
Çizelge 4.3. Çalışmaya dahil edilen FFPE doku örneklerinin klinikopatolojik ve demografik özellikleri.....	31
Çizelge 4.4. Denatürasyon aşamasına hazırlanan örnekler için gereken hacimler.....	38
Çizelge 4.5. cDNA sentezi reaksiyon karışımı için gereken hacimler	38
Çizelge 4.6. cDNA sentezi için gereken reaksiyon koşulları	38
Çizelge 4.7. qRT-PCR reaksiyon koşulları	39
Çizelge 4.8. BSA protein standartlarının hazırlanması için gereken dilüsyon talimatları ..	40
Çizelge 4.9. %5 istifleyici (stacking) jel hazırlamak için gereken hacimler	41
Çizelge 4.10. %12 ayırıştırıcı (resolving) jel hazırlamak için gereken hacimler	41

SİMGELER DİZİNİ

ATCC	American Type Culture Collection (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu)
Bp	Baz çifti
cDNA	Komplementer DNA
CEA	Karsinoembriyonik Antigen
CIN	Kromozomal instabilite
CIMP	CpG Ada Metilatör Fenotip
CHCl ₃	Kloroform
CMS	Konsensus Moleküler Subtip
ddH ₂ O	Çift distile su
DDIT4	DNA damage-inducible transcript 4 (DNA hasarı ile indüklenebilir transkript 4)
DFS	Hastalıklı Sağkalım
dMMR	Yetersiz yanlış eşleşme onarım
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium (Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı)
DMSO	Dimetil sülfoksit
dk	Dakika
FAP	Ailesel adenomatöz polip
GEO	Gene Expression Omnibus (Gen Ekspresyon Veritabanı)
GLOBOCAN	The Global Cancer Observatory (Küresel Kanser Gözlemevi)
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis (Gen Seti Zenginleştirme Analizi)
KRK	Kolorektal kanser
MMR	Yanlış eşleşme onarım
MSI	Mikrosatellit instabil
MSS	Mikrosatellit stabil

MSigDB	The Molecular Signatures Database (Moleküler İmza Veri Tabanı)
OS	Genel sağkalım
RNA	Ribonükleik asit
TCGA	Kanser Genom Atlas
TNM	Tümör Nod Metastaz
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK); dünya genelinde insidans ve mortalite bakımından önde gelen kanserlerden biridir. 2022 yılı verilerine göre, yaklaşık 2 milyon yeni tanı ile, en yaygın görülen 3. kanser iken, ölüm ile sonuçlanan 900 bin vaka ile akciğer kanserinden sonra gelen en yüksek mortaliteye sahip kanserdir (1). Kalın bağırsağın kolon ve rektum bölgelerinde, genellikle iyi huylu poliplerden başlayan, müdahale edilmediği durumda ise malignite özelliği kazanarak agresifleşen bir kanser türüdür. Bu yüzden, diğer kanserlerde olduğu gibi, erken tanı ve düzenli tarama protokolleri başarılı bir tedavi sonucu elde edebilmek için önem taşımaktadır. Kolonoskopi, sigmoidoskopi, fekal immünokimyasal test, BT kolonoskopi, gaytada gizli kan bakılması gibi yöntemler günümüzde sıklıkla başvurulanan KRK tarama yöntemleridir. Fakat bu yöntemlerin bir kısmı invaziv olması bakımından hastada acı ve komplikasyonlara neden olurken, bir kısmı kanser öncüsü polipleri tespit etmekte yetersiz kalıp yanlış pozitif/negatif sonuçlar verebilmektedir. Bazısı ise maliyeti dolayısıyla erişilebilir yöntemler arasında yer almamaktadır (2). Bu tarama yöntemleri dışında halihazırda kullanılan bazı moleküler belirteçler de mevcuttur. Bunlardan biri olan, basit bir kan testi ile seviyesi ölçülebilen CEA (Carcinoembryonic Antigen); genellikle kolorektal kanser tedavisi sonrası tedaviye yanıtın veya nüks ihtimalinin araştırılması için kullanılmaktadır. İnvaziv olmayan ve görece kolay ulaşılabilir bir yöntem olsa da erken evre kanserlerin tespitinde yetersiz kalmaktadır ve sigara kullanımına ve çeşitli iltihaplara bağlı olarak da yükselebildiği için kanser spesifitesi düşük ve tek başına yeterli bir belirteç değildir. Kanda seviyesi yükseldiği bilinen CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9) biyobelirteci de ilk olarak kolorektal kanserde tanımlanmasına rağmen çoğunlukla pankreas, karaciğer, safra yolu ve mide kanserleriyle ilişkilidir. Bu sebeple CA19-9 testi de kolorektal kanser için düşük spesifite göstermekte ve yetersiz kalmaktadır. KRK hastarında tedavi seçiminde KRAS mutasyon durumun belirlenmesi tedavi seçimine rehberlik edecek öngörücü belirteçlere iyi bir örnek teşkil etmektedir (3). KRAS mutasyonu dışında, BRAF analizi ve mikrosatellit kararsızlığı (MSI) yaygın kullanılan testlerdir. MSI, Lynch Sendromu tanısında kullanılırken, BRAF mutasyonu metastatik KRK'de kötü sağkalımı gösteren güçlü bir prognostik faktör ve anti-EGFR tedavisine yanıt için öngörücü bir belirteçtir (4). Günümüzde PIK3CA, PTEN ve HER2 gibi EGFR aksisinde yer alan diğer moleküller de ek değerlendirmeden geçmekte ve şu anda klinik denemeler bazında değerlendirilen biyobelirteçlerdir. KRK'li hastaların %10-18'inde PIK3CA mutasyonu

mevcuttur ve KRK'nin bir PIK3CA mutasyonu içermesi durumunda, ameliyat sonrası aspirin kullanan hastalarında hayatta kalma olasılığının arttığını göstermiştir. Bununla birlikte, yalnızca PIK3CA mutasyonunun varlığına dayanarak bu hastalara anti-EGFR tedavisini reddetmek için henüz yeterli veri yoktur. PIK3CA mutasyonu, KRK hastalarının %10-18'inde görülmekte olup, ameliyat sonrası aspirin kullanımının hayatta kalımı artırabileceği gösterilmiştir. Ancak, bu mutasyona dayanarak anti-EGFR tedavisinin reddi için yeterli veri yoktur. PTEN mutasyonu ise hastaların %5-14'ünde görülür ve EGFR antagonistlerine yanıtızlık ile ilişkilidir. PTEN mutasyonunun belirlenmesinde IHC veya FISH yöntemleri kullanılabilir, ancak klinik karar mekanizmalarında etkisi hala araştırılmaktadır (5,6). Öte yandan, HER2 amplifikasyonu ve mutasyonu, KRK'lerin yaklaşık %7'sinde mevcuttur ve KRAS yabancı tip tümörlerinde anti-EGFR tedavisine olası bir direnç yolu olarak araştırılmaktadır ve ek çalışmalar devam etmektedir(6–8). Meme kanseri, kolorektal kanser ve prostat kanserinde kullanılan, farklı genlerin seviyelerine bakarak bir risk skoru hesaplayan, invaziv olmayan Oncotype DX testi ise kolorektal kanser için 12 geni analiz ederek nüks ihtimaliyle ilgili klinisyenlere fikir vermektedir. Evre 2 ve 3 kolorektal kanserler için güvenli sonuçlar vermekle birlikte, her hastanın test için uyumlu olmaması ve yüksek maliyeti nedeniyle standart prosedürlerin yerini almakta yetersiz kalmaktadır. Görüldüğü üzere yakın zamanda erken ve ileri kolorektal kanserli hastaların sağkalım sonuçlarını iyileştirmeye yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiştir; ancak dünya genelinde yılda bir milyondan fazla yeni vaka ve %33'e varan hastalığa özgü ölüm oranıyla KRK önemli bir sağlık yükü olmaya devam etmektedir. 2035 yılında yeni KRK vakalarının 2,5 milyona ulaşacağı da öngörülmektedir. KRK için 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %64 iken, metastatik hastalarda bu oran %12'ye kadar düşmektedir. Bu veriler, kötü prognozlu hastaların erken teşhisi ve etkili tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için daha fazla araştırmanın gerekliliğini ortaya koymakta ve hem literatür bazında hem de uygulamada önemli sorular ve doldurulması gereken boşluklar bulunduğu belirtilmektedir (9–11). Ayrıca; Güncel kullanılan belirteçlerin ve tarama yöntemlerinin dezavantajları düşünüldüğünde; klinisyenlerin kullanabileceği, komplikasyon bakımından daha az riskli ve maliyet açısından daha erişilebilir diyagnostik yöntemlere, kolorektal kanserin erken tanısında ve prognostik öngörüsünde kullanabileceği yeni moleküler biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Bu bağlamda keşfedilecek etkin biyobelirteçler; diyagnostik ve prognostik öngörü sağlaması dışında, kişiselleştirilmiş ve hasta için en uygun tedavi yönteminin seçilmesinde

veya uygulanan tedavinin işe yararlılığının değerlendirilmesinde de kullanılarak hastanın ihtiyaçlarına yönelik stratejilerin belirlenmesinde de fayda sağlama potansiyeli taşıyabilir.

KRK, karsinogenez sürecinde birçok hücre içi metabolik yolağın regülasyonunun bozulduğu ve yüksek tümör heterojenitesine sahip bir kanserdir. Kolon kanserine dönüşüm süreci genellikle yıllar içinde yavaş yavaş ilerler ve genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle şekillenir. Bu süreç; genellikle kolon mukozasında başlayan, başlangıçta iyi huylu olan, kolon duvarındaki hücrelerin kontrolsüz büyümesi sonucu ortaya çıkan adenomatöz poliplerin gelişimi ile başlar. Başlangıçta benign olan bu polipler, zamanla genetik mutasyonlara uğrar. DNA'da biriken hasarlara bağlı olarak displazi denen bir duruma geçer. Displazi, hücrelerin düzensiz bir şekilde büyüdüğü ve anormal özellikler kazandığı bir evredir. Displazi süreci ilerledikçe, hücreler tamamen anormal hale gelir ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlar. Bu aşamaya karsinoma *in situ* adı verilir, yani kanser hücreleri kolon duvarının dışına yayılmamış, lokal kalmış durumdadır. Bu aşamada tespit edilip tedavi edilmezse, kanser hücreleri kolon duvarının daha derin katmanlarına yayılmaya başlar ve invaziv kolon kanseri gelişmiş olur. Sağlıklı kolon mukozasından başlayarak malign özellikler kazanana kadar moleküler boyutta gerçekleşen değişimler, kolorektal kanserin olduğu bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Kolorektumun sağ (proksimal) bölgesine kaynaklanan tümörlerde mikrosatelit instabilitesine, CpG adacık metilasyonuna, CMS1 alt tipine ve *BRAF* mutasyonuna daha sık rastlanırken; sol (distal) bölgesine kaynaklanan tümörlerde ise kromozomal instabiliteye, CMS2 alt tipine ve *p53/KRAS* mutasyonlarına daha sık rastlanmaktadır. Aynı zamanda; lokasyona göre, hastalığın kaynaklandığı polip türü, prognozu ve immün yanıtı da değişmektedir (12,13). Sağ ve sol kolorektal kanserler bu özellikleri bakımından farklı terapi yöntemleriyle tedavi edilebilmektedir. Sağ kolorektal kanserin semptom vermeden ilerlemesi ve genelde kötü prognozla karakterize edilen daha agresif bir hastalık olması; sağ kolona lokalize tümörlere spesifik bir biyobelirteç keşfetmenin önemini göstermektedir.

KRK'nın yüksek morbidite ve mortalite oranları ile birlikte yeni ve etkin biyobelirteçlerin keşfinin önemi göz önünde bulundurulduğunda kapsamlı bir literatür taraması ile birlikte DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4) geninin KRK için potansiyeli bu tez çalışması kapsamında değerlendirilmiştir.

Bazı kanserlerde yüksek ifade profili gösterdiği ve bazı durumlarda onkogen gibi davrandığı raporlanan *DDIT4* geni; stres durumunda ifadesi artan ve kanser tedavi stratejilerinde sıklıkla bir hedef olarak kullanılan mTOR yolağının ana regülatörüdür. Aynı zamanda önemli tümör baskılayıcı bir gen olan *p53* ile arasında geribildirim mekanizması olduğu bilinen bir genidir (14,15). Bu kilit moleküller dışında da ileriki bölümlerde ayrıntılı ele alınacak olan önemli stres genleri ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Farklı kanser türlerinde farklı ifade seviyesi göstermekte ve bu ifade profili kanserlerin evre ve diferansiyasyon derecesine göre değişiklik göstermektedir. Bu özellikleri ile *DDIT4* geni, bir kanserin prognozu ile ilgili öngörü oluşturmada kullanılabilecek veya hedeflendiği durumda karsinogenez sürecini veya ilaç direncini etkileyebilecek bir **biyobelirteç olabilme potansiyeli taşıdığını göstermektedir.**

Bu bilgiler ışığında; tez çalışmasının temel amacı, *DDIT4* geninin KRK patogenezindeki rolünü ve bu genin KRK için olası bir diyagnostik ve prognostik biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini incelemektir. Bu amaç doğrultusunda, The Cancer Genome Atlas (TCGA) bağımsız Gene expression Omnibus (GEO) KRK veri setlerinde *DDIT4* geninin ifade düzeyi farklı klinikopatolojik parametreler açısından analiz edilmiş, elde edilen bulgular kendi hasta kohortlarımız ve hücre kültürü çalışmalarımızla doğrulanmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda, *DDIT4* geninin biyobelirteç potansiyeline ilişkin literatüre yeni bilgiler kazandırılması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KOLOREKTAL KANSER

Kolorektal kanser (KRK), sindirim sisteminin alt kısmını oluşturan kalın bağırsak (kolon) ve rektumun (kalın bağırsağın son kısmı) iç yüzeyindeki hücrelerin kontrolsüz bölünmesiyle ortaya çıkan, zamanla vücudun farklı yerlerine yayılım gösterebilen bir kanser türüdür. KRK dünya genelinde en sık rastlanan solid tümörlerden biridir. Tarama ve tedavi yaklaşımlarındaki gelişmelere rağmen, insidans ve mortalite bakımından hala ilk sıralarda yerini koruyarak ciddi bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir. Genel batı toplumlarındaki bireylerin yaşam boyu KRK tanısı alma riski %5-6 iken, ailede KRK hikayesi bulunan bireylerde bu oran %30'lara çıkmaktadır (16). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre kolorektal kanser riskini artıran faktörler arasında yaş, aile geçmişi, kişisel geçmiş ve yaşam tarzı yer almaktadır. 50 yaşın üzerindeki bireylerde risk artarken, ailede 1. derecede kolorektal kanser öyküsü olması, Lynch sendromu veya ailesel adenomatöz polipozis (FAP) gibi genetik koşullar riski daha da yükseltir. Daha önce kolorektal kanser geçirmiş veya belirli türde polipleri olan bireyler de yüksek risk altındadır. Ayrıca, işlenmiş et bakımından zengin ve meyve-sebze bakımından fakir bir diyet, hareketsiz yaşam tarzı, obezite, sigara içme ve aşırı alkol tüketimi de riski artıran yaşam tarzı faktörlerindendir (17).

2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ

Kolorektal kanser; 2022 yılında tespit edilen yaklaşık 2 milyon yeni vaka ile akciğer ve meme kanserinden sonra en yaygın görülen kanser iken, 900 bin vaka ile mortalite bakımından, akciğer kanserinden sonra ilk sırada gelmektedir (1). Genetik, yaşam tarzı ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimlerle karakterize edilen, küresel olarak önemli bir halk sağlığı sorunu teşkil eden KRK'nin insidansı, diyet alışkanlıkları, sosyoekonomik durum ve sağlık hizmetlerine erişim gibi faktörlerle etkilenen belirgin bir coğrafi değişkenlik göstermektedir; bu da hastalığın epidemiyolojik durumunu anlamayı zorlaştırmaktadır. Çalışmalar, gelişmekte olan ülkelerde KRK prevalansının arttığını ve Batı tipi diyet kalıplarının benimsenmesiyle kırmızı ve işlenmiş et tüketimi, obezite ve hareketsiz yaşam tarzı gibi risklerin yükseldiğini göstermektedir (18–20). Epidemiyolojik veriler, KRK'nin sınırlı tarama programlarının bulunduğu düşük gelirli popülasyonlarda da giderek yaygınlaştığını göstermektedir. Örneğin, Çin'de KRK insidansındaki artış, kentleşme ve

diyet değişiklikleri nedeniyle artan alkol tüketimi ve obezite ile ilişkilendirilmiştir (19,20). Ayrıca, bu bölgelerde etkili tarama programlarının eksikliği durumu daha da kötüleştirmekte; sosyoekonomik durum ve CRC insidansı arasındaki pozitif korelasyon, daha yüksek gelir seviyelerinin daha iyi tarama ve sağlık hizmetlerine erişimle ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (19,21).

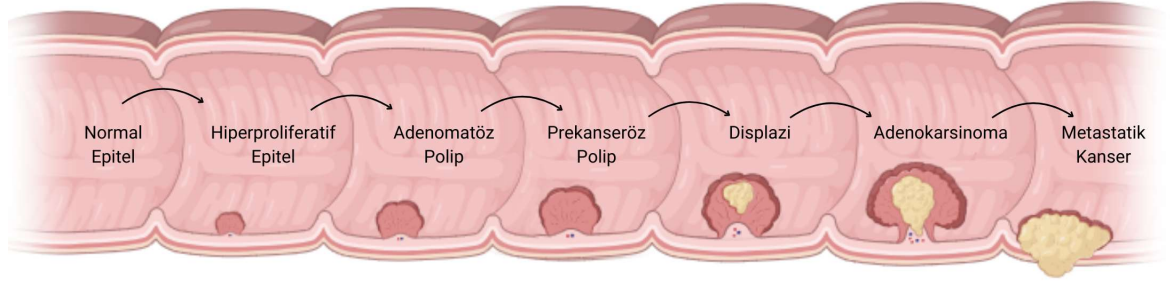
Genetik yatkınlık, KRK epidemiyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Kolorektal kanser aile öyküsü olan bireylerde risk önemli ölçüde artmış olup, çalışmalar KRK hastalarının birinci derece akrabalarının hastalığa yakalanma riskinin 2-3 kat daha yüksek olduğunu göstermektedir (22,23). *APC* ve *BRAF* gibi belirli genlerdeki mutasyonlar, bireysel KRK duyarlılığını anlamada kritik belirteçler olarak tanımlanmıştır (23,24). Ayrıca, genetik yatkınlıklar ve diyet, fiziksel aktivite gibi yaşam tarzı faktörleri arasındaki etkileşim, KRK riskinin multifaktöriyel doğasını vurgulamaktadır (23,25). KRK ile ilişkili en önemli kalıtsal sendromlar arasında Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Lynch Sendromu (kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser, HNPCC) yer almaktadır. Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP), esas olarak 5. kromozom üzerinde bulunan tümör oluşumunu baskılama rolü olan *adenomatöz polipozis koli (APC)* genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. FAP'li bireyler, genellikle ergenlik dönemlerinden itibaren kolon ve rektumda yüzlerce adenomatöz polip geliştirirler. Tedavi edilmezse, 40 yaşına gelindiğinde kolorektal kansere dönüşme riski neredeyse %100'dür (26,27). FAP'in yüksek penetransı, risk altındaki ailelerde genetik testlerin ve izlemenin önemini vurgulamaktadır. *APC* mutasyonlarının erken tespiti, kanser riskini önemli ölçüde azaltabilen koruyucu kolektomi gibi zamanında müdahalelere olanak tanır (28). Lynch Sendromu, ise *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ve *PMS2* gibi DNA yanlış eşleşme onarım (MMR) genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Bu sendrom, tüm kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %2-5'ini oluşturur ve kolorektal kanserin yanı sıra endometriyal, over ve diğer kanser türlerinin gelişmesine de sebep olur (29,30). Lynch Sendromu olan bireylerde yaşam boyu kolorektal kanser geliştirme riski %70'i aşabilir (31,32). Lynch Sendromu için genetik testler kritik öneme sahiptir. Bu testlere göre uygun tarama protokolleri belirlenir ve kolorektal kanseri erken aşamada teşhis etmek hedeflenir (33).

2.1.2. PATOLOJİ

Kolorektal kanser; genellikle iyi huylu, precancerous poliplerden gelişir. Polipler, sporadik olarak veya bazı sendromlar sonucu kolon mukozasında biriken ve büyüyen anormal hücrelerin kolon lümenine doğru çıkıntı yaptığı yapılardır. Polipler, çaplarına göre dimunitif (5 mm veya daha küçük), small (6-9 mm arası) ve large (1 cm veya daha büyük) olarak sınıflandırılır. Şekillerine göre ise sapsız (sesil), saplı (pedunculated) ve düz (flat) olarak adlandırılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı rehberine göre ise adenomalar morfolojik olarak %25'ten daha az villöz yapı içeriyorsa tübüler, %25-75 villöz yapı içeriyorsa tübülo-villöz, %75'ten daha fazla villöz yapı içeriyor ise villöz adenom olarak sınıflandırılmaktadır (34–37).

Malignite potansiyeli göz önüne alındığında ise klasik adenomalara ek serrated polipler de dikkat çekmektedir. Serrated lezyonlar; sesil serrated polipler, hiperplastik polipler ve traditional serrated adenomalar olmak üzere üç alt tipte gözlenmektedir. Bunlardan en yaygın rastlanana 5mm'den daha küçük çapta olup genellikle distal (sol) kolonda rastlanan hiperplastik poliplerdir ve bazı durumlarda sesil serrated lezyon prekürsörü olma özelliği taşımaktadır. Sesil serrated lezyonlar ise kolorektal kanser prekürsörü olarak kabul edilen, sıklıkla BRAF mutasyonu, mikrosatelit instabilitesi ve CpG adacıkları metilasyon fenotipi ile karakterize lezyonlardır. Düz bir yapıya sahip olmaları nedeniyle ülserleşme ve kanama riskleri düşük olduğundan tespit edilmesi daha zor bir polip türüdür. Traditional serrated adenomalar ise görece daha nadir rastlanan ve kolorektal kansere dönüşme bakımından sesil serrated lezyonlarla yaklaşık olarak benzer riskler taşıyan ve genellikle *KRAS* mutasyonu ile karakterize edilen bir polip türüdür (38).

Zaman içerisinde; normal epitel doku-displazi-adenoma sıralamasını takip eden ve farklı moleküler mutasyonlar biriktiren hücreler, invazyon yeteneği kazanarak kolorektal kanser oluşumuna sebep olur ve önce lokal lenf düğümlerine, ardından uzak metastatik bölgelere yayılabilir (37,39).



Şekil 2.1. Kolonun kolon kanserine evrilmesi, genetik mutasyonların birikimiyle gerçekleşen uzun bir süreçtir. Bu süreçte adenomatöz poliplerin gelişimi, displazi ve nihayetinde invaziv kansere dönüşüm gözlenir.

2.1.2.1. Kolorektal Kanserın Patolojik Sınıflandırması

Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı sınıflandırmaya göre kolorektal kanser; histopatolojisi bakımından farklı varyantlara sahiptir. Bunlardan en yaygın görüleni, kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %85'ini oluşturan adenokarsinomlardır. En sık rastlanan ikinci tip ise tümör bölgesinin en az %20'sinin ekstraselüler mürin içeren büyük glandüler yapılar ile karakterize olan ve kolorektal kanser vakalarının %10-15'ini oluşturan mürinöz karsinomadır (40). Mürinöz karsinoma, çeşitli oranlarda taşlı yüzük hücre tiplerini de içinde barındırabilmektedir (41). Mürinöz karsinomalar genellikle sağ kolonda görülmekle birlikte Lynch sendromu olan hastaların %22-40'ında rastlanmaktadır. Yüksek mikrosatelit instabilitesi ve adenokarsinomalara göre daha sık rastlanan *KRAS*, *BRAF* ve *PI3K* mutasyonları ile karakterizedir (40). Kolorektal kanser vakalarının %1'i ise; tümör bölgesinin en az %50'sinde intrasitoplazmik mürin barındırdığı durumlarda tanı alan taşlı yüzük hücreli adenokarsinomalardan oluşmaktadır (41). Mürinöz karsinomalarda olduğu gibi; taşlı yüzük hücreli adenokarsinomalar da genellikle sağ hemikolonda rastlanmakta ve *KRAS*, *BRAF* mutasyonları ve yüksek mikrosatelit instabilitesi göstermektedir. Adenokarsinomalara kıyasla daha kötü prognoza sahip olmakla birlikte genellikle metastaz eğilimi göstermektedir (40). Nöroendokrin tümörler ise son yıllarda artış gösterse de hala kolorektal kanser vakalarının %1'inden azını oluşturan ve kısıtlı literatür bilgisi bulunan bir histolojik tiptir (42). Adenokarsinomalarla birlikte karışık şekilde bulunarak bir histolojik spektrum oluşturmaktadırlar. Genellikle metastatik seyirli ve sıklıkla rektumda gözlenirken *KRAS*, *BRAF*, *p53* mutasyonları oranı bakımından adenokarsinomalardan pek bir farkı yoktur (40). Adenosküamoz karsinomalar ise oldukça seyrek rastlanan (kolorektal kanser vakalarının %0.1'inden az), nöroendokrin tümörlerde olduğu gibi adenokarsinomalarla bir

spektrum halinde bulunabilen ve sıklıkla proksimal (sağ) kolonda gözlenen bir histolojik tiptir (40). Bir diğer KRK histolojik alt tipi ise mikrosatellit instabilitesi yüksek olan, veziküler nükleus ve belirgin nükleol ve intraepitelyal lenfosit infiltrasyonu ile karakterize olan medüler karsinomadır. Diferansiyasyon derecesinden bağımsız olarak iyi prognozu olan ve yüksek immün yanıtı gösteren bir patolojik alt tiptir (41,43). Son yıllarda KRK sınıflandırmasına dahil edilen ve çalışmalara konu olan bir KRK alt tipi ise mikropapiller karsinomadır. Bu kanser türü; küçük tümör hücre gruplarının stromal boşluklarda vasküler kanalları taklit etmesiyle karakterizedir. Hem adenokarsinoma hem müsinöz karsinoma, %5 ve daha fazla oranda mikropapiller karaktere sahipse mikropapiller karsinoma olarak adlandırılır. Lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazlarına yatkınlığı sebebiyle genellikle kötü prognoza sahip olan, KRK vakalarının %5-20'sini oluşturan bir alt türdür (40,44). Kolorektal kanserin son morfolojik alt tipi ise serrated karsinomalardır. Serrated poliplerin, “Serrated Neoplastic Pathway” olarak isimlendirilen malignant dönüşümleri sonucunda oluşur ve hem müsinöz hem de müsinöz olmayan durumda gözlenebilir. Genellikle proksimal lokasyonda bulunarak; CIMP fenotipi, *BRAF* ve *KRAS* mutasyonu bakımından adenokarsinomaya göre daha yüksek oranlara sahiptir. Terapilere karşı dirençli ve düşük 5 yıllık sağ kalıma sahip bir türdür (40,45,46). Kolorektal kanserin hangi morfolojik sınıfa ait olduğunu belirlemek uygun tanı, tedavi ve prognoz hakkında klinisyenlere rehber olmakta ve kişiselleştirilmiş tıbbi yaklaşımlara fayda sağlamaktadır. Uygun tedavi ve prognostik öngörülerin belirlenmesi için, morfolojik sınıflandırmalara ek kanserin evresi ve diferansiyasyon derecesi de önem arz etmektedir. Kolorektal kanser evrelemesinde altın standart; tümör boyutu, lenf nodu yayılımı ve metastaz hakkında bilgi veren TNM/AJCC evrelemesidir. TNM evreleme kriterleri Çizelge 2.1.’de ve AJCC evreleme karşılığı Çizelge 2.2.’de verilmiştir.

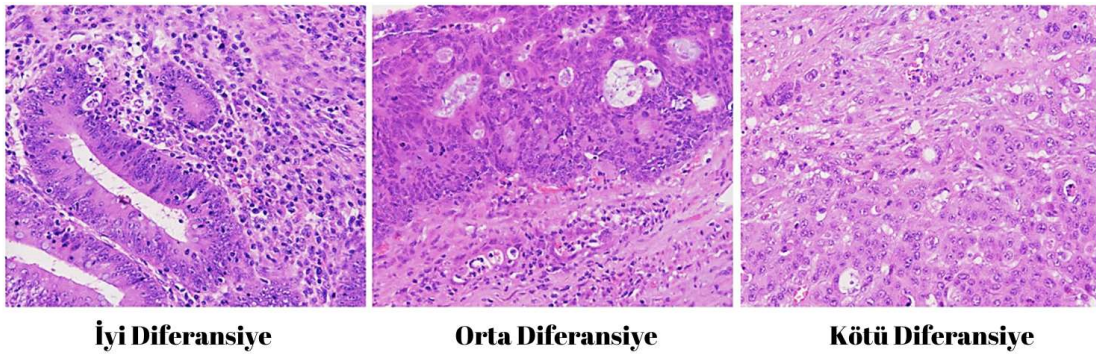
Çizelge 2.1. TNM evreleme kriterleri (47)

Kategori		Kriter
T	Tis	Kolon ve rektum iç yüzeyini kaplayan epitel veya lamina propriada kanser hücreleri bulunur.
	T1	Tümör submukozaya invazedir.
	T2	Tümör muskularis propriaya invazedir.
	T3	Peritonla kaplı bölgede subserozaya, Peritonla kaplı olmayan kolon ve rektum bölgelerinde perikolik ve perirektal dokuya invazedir.
	T4a	Tümör periton dışına doğru invazedir. (Seroza/Visseral Periton)
	T4b	Farklı organ metastazı vardır.
N	N0	Lenf nodu metastazı yoktur.
	N1a	1 adet perirektal ya da perikolik lenf nodu metastazı vardır.
	N1b	2-3 adet perirektal ya da perikolik lenf nodu metastazı vardır.
	N1c	Lenf nodunda tümör yoktur ancak kolon/rektum yakınındaki dokularda tümör bulunmaktadır.
	N2a	4-6 adet perirektal ya da perikolik lenf nodu metastazları vardır.
	N2b	7 ve daha fazla perirektal ya da perikolik lenf nodu metastazı vardır.
M	M0	Farklı organ metastazı yoktur.
	M1a	Periton içerisinde kolon ve rektum dışında 1 organda metastaz vardır.
	M1b	Periton içerisinde kolon ve rektum dışında 1^den fazla organda metastaz vardır.
	M1c	Periton içerisinde uzak organda veya vücudun başka bir bölgesinde metastaz vardır.

Çizelge 2.2. TNM evrelemelerin AJCC evre karşılığı (48)

Evre	T	N	M
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1 - T2	N0	M0
Evre IIA	T3	N0	M0
Evre IIB	T4a	N0	M0
Evre IIC	T4b	N0	M0
Evre IIIA	T1 - T2	N1 / N1c	M0
	T1	N2a	M0
Evre IIIB	T3 - T4a	N1 / N1c	M0
	T2 - T3	N2a	M0
	T1 - T2	N2b	M0
Evre IIIC	T4a	N2a	M0
	T3 - T4a	N2b	M0
	T4b	N1 - N2	M0
Evre IVA	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a
Evre IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b
Evre IVC	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1c

Tümör örneklerinin bir başka histolojik değerlendirmesi ise diferansiyasyon derecelerine göre yapılmaktadır. Tümör bölgesinden alınan hücreler normal kolon mukozası hücrelerine benzer ise iyi diferansiye (Grade 1), biraz daha anormal hücreler varsa orta diferansiye (Grade 2), fazlasıyla anormal hücre içeriyor ise kötü diferansiye (Grade 3) şeklinde sınıflandırılır.



Şekil 2.2. KRK diferansiyasyon dereceleri immün histokimya görüntüleri (49).

2.2. KKK MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Kolorektal kanser hem moleküler karakteri hem tedavi yanıtları ve prognozu bakımından oldukça heterojen bir hastalıktır. Benign prekürsör polipler, adım adım biriken genetik ve epigenetik değişimler sonucu agresif kanser lezyonlarına farklılaşır. Bu farklılaşma, mutagenез ve karsinogeneз süreçlerinde; bir dizi moleküler mekanizma ve yolak öne çıkmaktadır. Bunlar; CIN (kromozomal instabilite) yolağı, MSI (mikrosatelit instabilite) yolağı ve CIMP (CpG adacıkları metilatör fenotipi)'dir (50).

2.2.1. KROMOZOMAL İNSTABİLİTE YOLAĞI

Kolorektal kanserin altında yatan farklı moleküler mekanizmalardan en yaygın olanı, sporadik kanserlerin %84'ünde görülen, kromozom sayısı ve yapısında büyük değişikliklerin gözleendiğı kromozomal instabilite (CIN) yolağıdır (51,52). Bu değişiklikler; bir kromozomun veya bir bölgesinin delesyonu, translokasyonu veya somatik kopya sayısı değişimleri şeklinde olmaktadır (52). CIN yolağının bazı tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu veya inaktivasyonu ile tetiklendiğı belirlenmiştir. Bunlardan ilki ve en yaygın görüleni; kolorektum neoplazilerinin erken dönemlerinde gerçekleşen *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) geni mutasyonudur (52). *APC* geninin germ hattı mutasyonları familial adenomatöz polipoze sebep olurken somatik mutasyonu sporadik tümörlerin %72'sinde görülmektedir. Kolorektal kanser ve adenomaların %18'inde ise *APC* gen promotörü hipermetilasyonu aracılığıyla *APC* inaktivasyonuna rastlanmaktadır. Normal *APC* geni; migrasyon, diferansiyasyon, polarite, kromozomal segresyon, apoptoz gibi yolakları düzenleyen WNT sinyal transdüksiyon yolağının önemli bileşenlerinden olan β -catenin'in *GSK-3 β* tarafından fosforile edilip proteozom aracılığıyla degrade olmasını sağlayarak WNT sinyal yolağını negatif olarak regüle eder. *APC* inaktivasyonu sonucu ise sitoplazmik β -catenin seviyesinin artışı; WNT sinyal yolağının fazla aktivasyonu ile sonuçlanarak diferansiyasyon ve proliferasyon süreçlerinde bozulmalara sebep olur. Sonucunda ise adenoma ve sonrasında tümör oluşumunu tetiklenmektedir (52,53). Buna ek olarak; *APC* proteini, mitoz sırasında mikrotübüllerin "+" ucuna gruplanarak eşlenmiş kromozomların iğ ipliklerine bağlanmasını da sağladığı için; gendeki mutasyonlar, kromozomal segresyonda hataya, anöplodiye ve dolayısıyla kromozomal instabiliteye sebep olabilmektedir (51).

APC geni dışında; kromozomal segresyonda bozukluğa sebep olan farklı yollar da kromozomal instabiliteyi tetiklemektedir. Hücre döngüsü kontrol mekanizmasında rol alan *BUB/MAD* ailesi genlerindeki bazı mutasyonlar, G2/M kontrol noktasında hücre döngüsünün durdurulamamasına ve kromozom kopyalarının ayrılmasında sorunlar yaşanmasına sebep olmaktadır (51). Yapılan çalışmalar; hücrede fazla sentrozom bulunmasının veya sentrozom fonksiyonuyla ilişkili *AURKA*, *PLK1* gibi genlerin disregülasyonunun da kromozomal instabiliteye yol açtığını göstermektedir (54,55). Telomer oluşumunu regüle eden *TERC* geninin mutasyonları, DNA tamir mekanizmasında rol alan *ATM*, *BRCA1/2*, *TP53*, *MRE11* genlerinin fonksiyonlarındaki değişiklikler de kromozomal instabilite ile sonuçlanabilmektedir (51).

2.2.2. MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE YOLAĞI

Kromozomal instabiliteden sonra ilk sırada gelen, kolorektal kanserlerin yaklaşık %15-20'sinin oluşmasına sebep olan yolak ise mikrosatellit instabilite (MSI) yolağıdır. Mikrosatellit instabilitesi, DNA yanlış eşleşme onarım (MMR) mekanizmasında gerçekleşen aksaklıklar sonucu oluşur (56). MMR mekanizması; DNA replikasyonu veya rekombinasyonu sırasında yaşanan hatalar sonucu yanlış eşleştirilen bazların tespit edilip düzeltildiği bir mekanizmadır (57). Yanlış eşlemeler ilk olarak *MutS* ailesi proteinleri (*MSH2*, *MSH3* ve *MSH6*) tarafından tanınır. Bölgeye bağlanan proteinler, *MutL* ailesi proteinlerinin (*MLH1*, *MLH3*, *PMS1* ve *PMS2*) bölgeye gelmesini sağlar. Oluşan kompleksle; DNA tamirini sağlayacak diğer enzimlerin bölgeye birikmesi ve onarım mekanizmasının aktifleşmesi gerçekleşir (56). Genomda arka arkaya tekrar eden sekans bölgeleri olarak bilinen mikrosatellitler ise, replikasyon sırasında DNA polimerazın kaymasıyla yanlış eşleşme hatalarına yatkınlık gösteren bölgelerdir. Bu yüzden MMR mekanizmasındaki bozukluklar mikrosatellit bölgelerindeki insersiyon veya delesyonlarla karakterize edilir. *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MLH1*, *MLH3*, *PMS1* ve *PMS2* genleri mutasyonları ya da epigenetik olarak inaktivasyonları MMR mekanizması yetersizliğine veya bozukluğuna yol açarak o dokularda yüksek mikrosatellit instabilitesi görülmesine sebep olur (39,57,58). Ek olarak *EPCAM* geni 3' ucunda gerçekleşen delesyonlar da *MSH2* geni hipermetilasyonuna sebep olarak MSI ile ilişkilendirilir (59). Bu genlerin germ hattı mutasyonları Lynch sendromu (kalıtsal polipsiz olmayan kolorektal kanser (HNPCC)) olarak adlandırılır.

Mikrosatellit instabilitesi belli bir oranın üstünde seyreden tümörler, DNA tamir mekanizmasının düzgün çalışmadığı için mutasyon oranı yüksek (hypermuted (HM)) tümörlerdir. MSI yüksek seyreden tümörler *BRAF* ve *V600E* mutasyonlarını yüksek oranda taşıırken, düşük *APC* ve *KRAS* mutasyonu oranları vardır. HM tümörler, tedavilere verdiği yanıtlar açısından genellikle iyi prognozla ilişkilendirilmektedir (51).

2.2.3. CPG ADACIKLARI METİLATÖR FENOTİPİ

DNA metilasyonu; sitozin halkasının 5. karbonuna DNA metiltransferaz enzimi aracılığıyla metil grubu eklenmesiyle gerçekleşen, kalıtılabilir ve tersinir bir epigenetik değişimdir. Memelilerde zigot oluşumu sırasında yok olur ve embriyonik gelişim sırasında tekrar artarak bazı genlerin ve kromozomların inaktivasyonu ile doku farklılaşmasını sağlar (60,61). Fakat kanser hücrelerinde, genomun metilasyon profili ciddi değişiklikler göstererek metile kalması gereken bölgelerde hipometilasyon, metilasyon olmaması gereken bazı bölgelerde ise hipermetilasyon gerçekleştiği gözlenir. Hipometilasyon, yüksek metilasyon altında kalması gereken satelit veya retrotranspozon bölgelerinde gerçekleşerek onkogenlerin aktivasyonuna ve genomik instabiliteye sebep olurken; hipermetilasyon ise genellikle C-G bakımından zengin, metilasyondan korunan, CpG adacıkları denen promotör bölgelerinde gerçekleşir. CpG adacıklarında gerçekleşen metilasyon ise önemli tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (60,62). Kolorektal kanserde de CpG adacıkları hipermetilasyonuna oldukça sık rastlanmaktadır. Bu duruma CpG adacıkları metilasyon fenotipi (CIMP) denmektedir. Yüksek CIMP gösteren kolorektal kanserler; MMR mekanizmasında rol alan genlerin de metillenmesi sonucu dolaylı olarak mikrosatellit instabilitesi bakımından da zengin bir profil sergilemektedir (63).

Yapılan çalışmalar, yüksek CIMP profili sergileyen kolorektal kanser hastalarının kötü prognoza yatkın olabileceğini ama bu durumun daha çok mikrosatellit instabilitesinin miktarı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. CIMP profili her zaman tek başına yeterli olmasa bile yüksek CIMP profili, yüksek mikrosatellit instabilitesi ile birlikte olduğunda oldukça kötü prognoza ve düşük sağkalımlara etki edebilmektedir (51).

2.2.4. KRK MOLEKÜLER SINIFLANDIRMASI

Kolorektal kanserin oluşumunda rol oynayan yolların, gerçekleşen birçok genetik ve epigenetik değişikliklerin kolorektal kanserin doğasına etkileri sonucu; birçok farklı kanser fenotipleri oluşmaktadır. Hastalığın moleküler heterojenitesi, kolorektal kanseri farklı sınıflara ayırarak ele alma ihtiyacı doğurmuştur. Bu doğrultuda birçok farklı sınıflandırma ortaya çıksa da 4 farklı moleküler alt tipin belirlendiği “Consensus Molecular Subtype (CMS)” altın standart olarak kabul edilmektedir (64).

CMS1: Mikrosatellit İnstabilitesi-İmmün (MSI-Immune):

CMS1 alt tipi, genellikle DNA yanlış eşleşme tamir yetersizliği (MMR) ve dolayısıyla yüksek mikrosatellit instabilitesi ile karakterizedir ve Lynch sendromu olan hastalarda sıklıkla rastlanır. Yüksek CIMP fenotipi sergileyen hiper metilasyona uğramış bir profildir. Bu alt tipe sahip tümörlerde, genellikle immün hücrelerin (özellikle T hücrelerinin) tümör mikroçevresinde yoğun bir varlığı bulunur. Bu yüzden immünolojik yanıtı yüksek olan ve bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri gibi tedavi terapilerine iyi yanıt veren bir alt tiptir. CMS1 tümörleri, metastatik olmayan evrelerde iyi bir prognoza sahiptir, ancak metastatik evreye ulaştıklarında daha kötü bir seyir izleyebilir. Bu alt tip genellikle sağ kolon yerleşimli, kadınlarda daha sık görülen ve erken evrede teşhis edilen tümörlerdir (52,64,65).

CMS2: Klasik (Canonical)

CMS2 alt tipi, kolorektal kanserin en yaygın moleküler alt tipi olup; hücre döngüsü, MYC ve WNT sinyal yolağı aktif olduğu için hücre proliferasyonun hızlı olduğu bir alt tiptir. Genomik olarak stabil olup yüksek kromozomal instabilite (CIN) ile ilişkilidir. Yüksek *EGFR* miktarı ve *TP53* mutasyonu bakımından zengin bir profil sergiler. CMS2 tümörleri, epitelial özellikler gösterir ve daha iyi farklılaşmış hücrelerden oluşur. Bu alt tipteki kanserler genellikle daha iyi prognozla ilişkilendirilir ve tedaviye iyi yanıt verir. Genellikle sol kolon ve rektumda görülür ve erkeklerde daha yaygındır (52,64,65).

CMS3: Metabolik

CMS3 alt tipi, metabolik sinyal yollarının baskın olduğu, epitelial özellikler sergileyen, orta derecede CIMP fenotipi ve düşük MSI profili ile karakterize bir alt tiptir. Hücre

büyümesi ve metabolik süreçlerini etkileyen *RAS* gen mutasyonlarını (özellikle *KRAS* mutasyonu) sıklıkla barındırır. Özellikle glikoz metabolizmasını etkileyen genlerde değişimler gözlenir. CMS3 tümörleri epitelyal özellikler taşısa da CMS2'ye kıyasla daha belirgin metabolik aktiviteye sahiptir. CMS1 ve CMS4 alt tiplerine kıyasla daha iyi prognoz gösterir, ancak CMS2'den daha kötü bir prognostik sonuç sunabilir. Daha çok sol kolon yerleşimlidir ve erkeklerde daha sık görülür (52,64,65).

CMS4: Mezenkimal (Mesenchymal)

CMS4 alt tipi, kolorektal kanserin en agresif alt tipi olup, tümör mikroçevresiyle güçlü etkileşimler ve stromal hücrelerin yoğunluğu ile ilişkilidir. Bu alt tip, invazyon, metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilendirilir. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) özellikleri sergileyerek hücrelerin daha invazif ve metastatik hale gelmesini sağlar. Tümör stroması ile güçlü bir etkileşim içerisindedir ve yüksek düzeyde fibroblast, immün hücreler ve diğer stromal hücreler içerir. Bu alt tip, yüksek anjiyogenez (damar oluşumu) ve bağışıklık baskılanması ile ilişkilidir, bu da tümörlerin daha hızlı büyümesine ve yayılmasına yol açar. CMS4 alt tipine sahip hastalar, diğer alt tiplerle karşılaştırıldığında daha kötü bir prognoza sahiptir. Tedaviye yanıtları da genellikle yetersizdir. Çoğunlukla sol kolon ve rektumda yer alır ve sıklıkla ileri evrelerde tespit edilir (52,64,65).

2.3. LOKALİZASYON

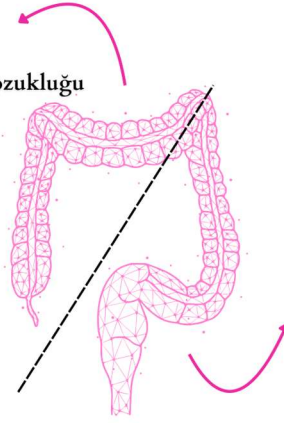
Kalın bağırsak, ince bağırsağın son kısmı olan ileumdan sonra sırasıyla çekum, çıkan kolon, tranvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum olmak üzere altı anatomik bölgeye ayrılmaktadır. Bu anatomik bölgeler farklı embriyolojik kökenlerden gelmektedir. Orta bağırsak (midgut); çekum, çıkan kolon ve transvers kolonun iki bölü üçünü oluştururken, arka bağırsak (hindgut) ise transvers kolonun kalan kısmını, inen kolonu, sigmoid kolonu ve rektumu oluşturmaktadır. Midguttan köken alan kolon bölgesi sağ (proximal) kolorektum olarak, hindguttan oluşan kolon ve rektum ise sol (distal) kolorektum olarak sınıflandırılmaktadır (66,67). Sağ kolon ve sol kolon vaskülarizasyon bakımından da farklar göstermektedir. Sağ kolon bölgeleri süperior mezenterik arter ile beslenirken sol kolorektum bölgesi inferior mezenterik arter ile beslenmektedir (68,69).

İlk olarak, 1990 yılında Bufill'in birçok çalışmayı karşılaştırmalı olarak ele aldığı derleme çalışması ile kolorektal kanserin lokasyona bağımlı değişken özelliklere sahip olabileceğine dikkat çekildi (70). Daha sonra yapılan çeşitli çalışmalarla birlikte bu bulgu; lokasyona bağımlı insidans, mortalite, tümör mutasyon yükü, ilaç direnç ve yanıtlarındaki farklılıklar bakımından valide edildi. Şekil 2.3.'te sağ ve sol lokalize KRK tümörlerinin farkları özetlenmiş olup yazının devamında bu özellikler ayrıntılı şekilde ele alınmıştır.

A.

Sağ lokalize KRK:

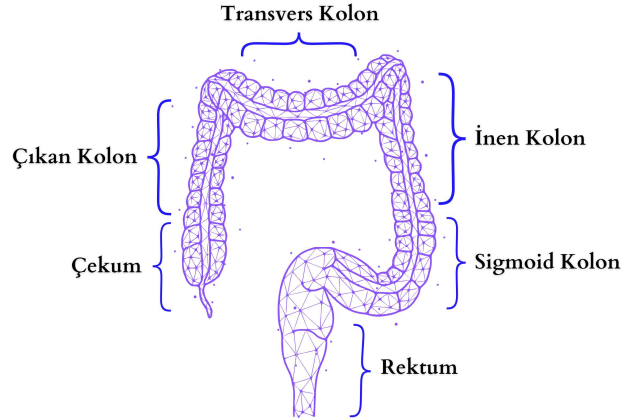
Yüksek mikrosatelit instabilites (MSI) ve DNA yanlış eşleşme tamir mekanizması (MMR) bozukluğu
Yüksek CpG adacık metilasyon profili (CIMP)
BRAF, KRAS mutasyonu
Yüksek tümör mutasyon yükü
Genellikle sessile serrated polipler ve müsinöz yapılı hücreler
CMS1 ve CMS3
Kötü prognoz
Peritoneal metastaz
İmmünoterapi yanıtı yüksek



Sol lokalize KRK:

Yüksek kromozomal instabilite (CIN)
NRAS, APC, TP53 mutasyonu
Düşük tümör mutasyon yükü
Genellikle tübüler ve villöz adenomalar
CMS2 ve CMS4
İyi prognoz
Akciğer ve karaciğer metastazı
Adjuvan ve standart kemoterapi ve hedeflenmiş terapi yanıtı yüksek

B.



Şekil 2.3. Sağ ve sol KRK özellikleri (A) ve kolonun anatomik segmentleri (B). (71).

2.3.1. KRK LOKALİZASYONUNUN KLİNİKOPATOLOJİK FARKLILIKLARI

Sağ kolon lümeni anatomik olarak daha geniş olmasından dolayı sağ lokalize tümörler uzun süreler boyunca semptom vermeden ilerleyebilmektedir. Sol kolon ve rektum ise hem lümen

darlıkları sebebiyle tümörün oluşturduğu obstrüksiyondan hem de rektal kanamalar sebebiyle daha erken fark edilmektedir. Bu yüzden sağ lokalize tümörler, erken evrede semptom vermeyip genellikle ileri evrelerde; kilo kaybı, anemi ve abdominal kitle semptomlarıyla tanı almaktadır (72,73). Sol kolorektal kanser hastalarında hepatik ve pulmoner metastaz oranları daha yüksektir. Fakat sağ kolon bölgesinin retriperitoneal birleşiminden dolayı, sağ lokalize tümörü olan hastalarda peritoneal karsinomatozise daha sık rastlanmakta ve bu da hastalığın sol lokalize tümörlere göre daha kötü prognoza sahip olmasıyla sonuçlanmaktadır (12,13,73). Histopatolojik olarak ise sağ lokalize tümörler genellikle kötü diferansiye adenokarsinomalardan oluşmakta ve taşlı-yüzük hücreleri ve müsinöz yapılarıyla karakterize olmaktadır (73,74).

2.3.2. KRK LOKALİZASYONUNUN MOLEKÜLER FARKLILIKLARI

KRK moleküler sınıflandırmasının altın standardı olan CMS sınıflandırması, lokasyon bakımından incelendiğinde ise CMS1 ve CMS3 alt tiplerinin sağ bölgede, CMS2 ve CMS4'ün ise sol kolon ve rektumda daha sık gözleendiği görülmüştür (65). Sağ taraf kolon kanserlerinde daha sık görülen moleküler alt tip CMS1'dir. Bu alt tip, hipermutasyon, mikrosatellit instabilitesi (MSI) ve güçlü immün aktivasyon ile karakterizedir ve SKK vakalarının %31'inde gözlenirken, sol taraf kolon kanserlerinde bu oran sadece %7'dir. Buna karşılık, CMS2 alt tipi, epitelyal özellikler, belirgin WNT ve MYC sinyal yollarının aktivasyonu ile öne çıkar ve sol lokalize vakalarının %56'sında bulunurken, sağ tümörlerde bu oran %26'dır (12).

Kolorektal kanserin (KRK) karsinogenez sürecini etkileyen “KRK Moleküler Biyolojisi” başlığı altında ayrıntılı bir şekilde ele alınmış olan üç ana mekanizma kabul görmüştür ve bu mekanizmalar sağ ve sol taraflı KRK tümörlerinde farklı oranlarda görülmektedir. DNA tamir mekanizması bozukluğu ve dolayısıyla mikrosatellit instabilitesi (MSI) sağ kolorektal kanserde daha yaygın iken kromozomal instabilite çoğunlukla sol kolorektal kanserde görülmektedir (13,51,64,75,76). Sağ lokalize tümörlerdeki tamir mekanizması bozukluğu ve yüksek MSI sebebiyle ise sağ kolorektal kanserlerin tümör mutasyon yükü sola göre daha yüksektir (12,13). Ek olarak, CpG adacıkları metilasyon profili de sağ kolorektal kanserde sola göre daha yüksek prevalansa sahiptir. Sağ kolorektal kanserin bu hipermetilasyon profili birçok önemli genin promotör bölgelerinin metilasyonuna sebep olarak sağ ve sol tümörlerin

tedavi ve prognozlarının farkı olmasına neden olmaktadır. Örneğin; anti-EGFR terapilerin hedef molekülleri amphiregulin (AREG) ve epiregulin (EREG), sağ lokalize tümörlerin hipermetilasyon karakteri sebebiyle negatif olarak regüle edildiği için bu bölgede bulunan tümörler anti-EGFR terapilere yanıt vermemektedir. EGFR ligandlarını yüksek ifadeleyen sol lokalize kolorektal kanser tümörleri ise anti-EGFR terapilere daha iyi yanıtlar vermektedir (65). Adjuvan kemoterapilerden FOLFOX ise MMR mekanizması bozuk olan dolayısıyla çoğunlukla sağ lokalize tümörlerde iyi sonuçlar vererek, kısmen lokasyon spesifik tedaviler sağlamaktadır (64).

Mutasyonlarının lokasyona göre dağılımlarına bakıldığında ise *TP53*, *BRAFV600*, *KRAS*, *PIK3CA*, *CTNNB1*, *SMAD4*, *PTEN* ve *GNAS* gibi kolorektal kanser karsinogenez sürecinde önemli olan genlerin lokasyona bağımlı olarak değişiklik gösterdiği ortaya çıkmıştır (75). *BRAF* mutasyonları, özellikle *BRAF V600E* mutasyonu, sağ kolon kanserlerinde daha sık görülmektedir. Sağ lokalize tümörlerde *BRAF* mutasyonu oranının yüksekliği ve bu mutasyonun genellikle kötü prognoz ile ilişkilendirilmesi sağ lokalize tümörlerin kötü prognozunun sebeplerinden biri olabilir (51,75). Özellikle çekumdan hepatik fleksuraya doğru *BRAF V600E* mutasyon oranı artmakta ve rektuma ilerledikçe azalmaktadır (75). Benzer olarak *KRAS* mutasyonları da sağ lokalize tümörlerde yüksek prevalansa sahiptir. *KRAS* mutasyon oranları sola doğru ilerledikçe düşerken sigmoid kolon bölgesi ile birlikte rektuma doğru olan bölgelerde tekrar artış gösterse de bütünsel olarak bakıldığında sağ kolon ile karakterize edilebilir (12,75). Sol kolorektal kanser tümörleri klasik adenoma-karsinoma sekansı ile oluştuğu ve bu sekansta *APC* ve *p53* genlerinin rolü büyük olduğu için sol lokalize tümörlerde bu genlerdeki mutasyon oranı daha fazladır. Aynı zamanda CIN nedeniyle de hücre döngüsü mekanizmalarında tümör baskılayıcı olarak görev yapan bu genlerin mutasyonunun sol lokalize tümörlerde daha fazla olduğu düşünülmektedir.

2.4. KRK'DE DİYAGNOSTİK VE TERAPÖTİK BİYOBELİRTEÇLERİN ÖNEMİ

Kolorektal kanser (KRK), dünya genelinde en sık görülen kanser türlerinden biridir ve hem tanı hem de tedavi süreçlerinde biyobelirteçlerin kullanımı giderek daha büyük bir öneme sahip olmaktadır. Biyobelirteçler, hastalığın tanısında, prognoz belirlenmesinde ve en etkili tedavi yönteminin seçilmesinde kritik rol oynayan biyolojik moleküllerdir. Bu belirteçler hem hastalığın erken evrelerde saptanmasında hem de kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli avantajlar sunmaktadır.

Diyagnostik biyobelirteçler, KRK'nin erken teşhisine olanak sağlayarak tedavi başarısını artırabilir. Özellikle kan ve doku örneklerinde bulunan karsinoembriyonik antijen (CEA) ve mikrosatellit instabilitesi (MSI) gibi biyobelirteçler, KRK'nin tanısında sıkça kullanılmaktadır. MSI, tümör hücrelerinde DNA tamir mekanizmasındaki bozulmaları gösterir ve genellikle Lynch sendromu ile ilişkilidir. MSI durumu, hastanın kemoterapiye yanıtını öngörmeye önemli bir rol oynayabilir.

Terapötik biyobelirteçler ise tedavi seçiminde yönlendirici olur. KRK tedavisinde en yaygın kullanılan biyobelirteçlerden biri, *KRAS* ve *BRAF* mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar, hastaların anti-EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) tedavilerine yanıt verip vermeyeceğini belirlemede kritik bir öneme sahiptir. Örneğin, *KRAS* mutasyonuna sahip hastalar, cetuximab ve panitumumab gibi anti-EGFR tedavilerine yanıt vermezler. Bu nedenle, *KRAS* mutasyon testi, tedavi planlamasında zorunlu bir adım haline gelmiştir. Aynı şekilde, *BRAF* mutasyonu da kötü prognoz ile ilişkilidir ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde dikkate alınmalıdır.

Son yıllarda, dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA) gibi likit biyopsi yöntemleri de klinik pratiğe girmiştir. Bu yöntem, minimal invaziv bir şekilde tümör biyolojisi hakkında bilgi sağlayarak hem tanı hem de tedavi süreçlerinde kullanılmaktadır. ctDNA'nın takip edilmesi, tedaviye yanıtın izlenmesinde ve hastalığın tekrarlama riskinin değerlendirilmesinde umut verici bir araç olarak kabul edilmektedir.

Sonuç olarak, KRK'de biyobelirteçler, hastalığın daha etkin yönetimini sağlamak adına diyagnostik, prognostik ve terapötik alanlarda çok önemli bir role sahiptir. Bu belirteçler sayesinde tedavi daha kişiselleştirilmiş hale gelirken, hastalığın seyri daha yakından izlenebilir ve tedavi başarısı artırılabilir.

2.5. DDIT4

DDIT4 geni ilk olarak 2002 yılında, eşzamanlı olarak iki ayrı araştırma grubu tarafından tanımlanmıştır. Shoshani ve ekibi, C6 sıçan glioma hücrelerinde hipoksiye yanıt olarak HIF-1 tarafından uyarılan ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu düzenleyen *RTP801* genini tanımlamıştır (77). Aynı yıl, Ellisen ve çalışma arkadaşları ise DNA hasarına yanıt olarak *p53* tarafından aktive edilen, embriyogenez ve epidermal farklılaşma sürecinde ise

p63 aracılığıyla düzenlenen ve ROS oluşumunda rol oynayan *REDD1* (Regulated in Development and DNA Damage Response 1) genini tanımlamıştır (78). 2003 yılında yapılan bir başka çalışmada, glukokortikoid aracılı lenfoid hücre apoptozunda yer alan genleri analiz ederken, *RTP801*'in fare homologunun *Dig2* (Dexamethasone-induced Gene 2) geni olduğu belirtilmiştir (79). Sonrasında bu genlerin homolog olduğu doğrulanmış ve HUGO Gen Nomenklatur Komitesi (HGNC) tarafından *DDIT4* (DNA Damage Inducible Transcript 4) ismi resmi olarak verilmiştir (80).

DDIT4 geni normal koşullar altında düşük ifade seviyesi gösterirken hipoksi, kimyasal stres, radyasyon stresi, ısı şoku ve endoplazmik retikulum stresi gibi çeşitli stres durumlarında yüksek ekspresyon seviyesi göstermektedir. Transkripsiyonel regülasyonu; temel olarak HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1) ve p53 faktörleri tarafından yapılmaktadır (14,15). İnsan genomunda 10. kromozomunun q22.1 bölgesinde 2.1 kb uzunluğunda ve evrimsel olarak korunmuş bir gendir (81–84). Proteini, sitoplazma ve mitokondride yoğunlaşmış olarak bulunur. 25kDa boyutunda, 2 antiparalel α -heliks ve 4 β -tabaka bulunan, 232 amino asitten oluşan lizin açısından zengin bir proteindir (80,85–87).

DDIT4 geni, stres durumlarında ifade seviyesi artan ve önemli hücre içi sinyal yollarından biri olan mTOR yolağını negatif olarak regüle eden bir gendir(87). mTOR yolağı; AKT, PI3K, TSC1/TSC2, Rheb, LKB1/AMPK, VAM6/Rag GTPase gibi hücre metabolizmasında önemli kilit moleküllerle etkileşimi bakımından önemli olup, gen transkripsiyon ve translasyonunu arttıran, hücre büyümesini, otofaji ve apoptoz gibi önemli mekanizmaları kontrol eden bir yoldur. mTOR, mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere fonksiyonel olarak farklı özellikleri olan iki kompleksten oluşur. mTORC1 genellikle hücre büyümesi ve hücre metabolizmasından sorumlu iken mTORC2 proliferasyon ve sağkalım gibi özelliklerin kontrolünden sorumludur (88).

2.5.1. DDIT4 GENİ REGÜLASYONU

DDIT4'ün Üst Düzenleyicileri:

DDIT4 geni hipoksi, DNA hasarı gibi durumlarda oluşan çeşitli stres sinyalleri tarafından regüle edilmektedir. Bu düzenlemeler farklı transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonel regülasyonu ile gerçekleşebileceği gibi çeşitli mikroRNA'lar ve GSK3- β aracılı post-

translasyonel modifikasyonlarla da olabilmektedir. Örneğin hipoksi sebepli stres durumunda artış gösteren HIF1 proteinin DDIT4'ü regüle ettiği bilinmektedir. Yeterli oksijenin bulunduğu durumlarda HIF1 proteininin alfa altbirimi hidroksillenir ve böylece E3 ubiquitin ligaz için hedef haline gelerek degrade olmaktadır (89). Hipoksik durumlarda ise ATM'ye (Ataxia Telangiectasia Mutated) bağımlı fosforilasyon ile stabilize edilir ve HIF1 proteini seviyesinde artış gerçekleşir (85,90). Hipoksiye yanıt olarak artan HIF1 transkripsiyon faktörü DDIT4'ün promotör bölgesine bağlanarak DDIT4'ün ekspresyonunu artırır. DNA hasarı durumunda aktivasyonu artan ve önemli tümör baskılayıcı genlerden biri olan p53 geninin de DDIT4'ün transkripsiyon başlangıç bölgesinin yukarısında yer alan olası bir p53-yanıt elemanına bağlanabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Fakat yapılan bir çalışmada p53'ün dolaylı olarak RFX7 aracılığıyla DDIT4'ü regüle ettiği görülmüştür. DNA hasarına yanıt olarak aktive olan p53'ün stabilizasyonunun artmasının RFX7 seviyelerinin artışına yol açtığını ve bunun da DDIT4 ekspresyonunu teşvik ettiğini göstermektedir (91). Yine hipoksik durumda; yetersiz oksijen seviyesinden dolayı düşük oksidatif fosforilasyon seviyelerinden dolayı enerji stresine giren hücrelerde AMPK, Thr¹⁷² bölgesinden fosforile olarak aktive olur. Aktif AMPK, mTOR yolağını baskılayarak enerji homeostazını düzenler (92). AMPK'nin mTOR üzerindeki bu etkisinin altında yatan mekanizmayı aydınlatmak için yapılan çalışmalarda ise AMPK'nin, DDIT4 geni susturulmuş hücrelerde mTOR yolağını baskılamakta başarısız olduğu ve DDIT4 ve AMPK'nin ifade seviyelerinin birbirleriyle korele bir değişim gösterdiği görülmüştür (93). Bu bulgulardan yola çıkarak enerji stresi durumunda ortaya çıkan mTOR aracılı stres yanıtının AMPK'nin DDIT4'ü regüle etmesiyle gerçekleştiği düşünülmektedir (93). Besin yetersizliği, ER stresi gibi farklı stres durumlarında aktive olan ve entegre stres tepkisinde rol alan genlerin ifade seviyesini regüle ederek metabolizmayı ve sağkalımı etkileyen önemli bir transkripsiyon faktörü olan ATF4 (Activating Transcription Factor 4) faktörünün de DDIT4'ün ekspresyonunu arttırdığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (94,95). DDIT4 regülasyonunda çeşitli mikroRNA'ların rol aldığı da gösterilmiştir. Örneğin miR-630'un, DDIT4'ün 3'UTR bölgesine bağlanıp DDIT4'ü negatif olarak regüle ettiğini ve bunun sonucunda apoptozun önlendiği görülmüştür (96). Karaciğer kanseri üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise DDIT4'ün hem protein hem RNA seviyesinde miR-221'in hedefi olduğunu ve DDIT4'ü regüle ettiğini göstermiştir (97). miR-495 ve miR-30c'de çeşitli stres durumlarında DDIT4'ü negatif olarak regüle ettiği bilinen bazı miRNA'lara örnek olarak verilebilir (98,99).

DDIT4'ün Hedefleri:

DDIT4 proteini mTOR yolağı üzerinde negatif regülatör etkisi göstermektedir. Yani DDIT4 ifade seviyesi arttıkça mTOR yolağı aktivasyonu azalmakta ve mTOR yolağı baskılanmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu; DDIT4'ün mTOR yolağı üzerindeki etkisinin TSC1/TSC2 kompleksi aracılığı ile olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu mekanizma ile ilgili iki teori ortaya atılmıştır. İlk teoriye göre; DDIT4, 14-3-3 proteini ile bağlanmak için TSC2 ile yarışmakta ve seviyesi arttığında 14-3-3 ile TSC2'nin birbirinden ayrılmasına sebep olmaktadır. 14-3-3'ten ayrılan TSC2, TSC1 ile fonksiyonel bir kompleks oluşturarak mTORC1'i inhibe etmektedir (86). Fakat daha sonra, protein seviyesinde yapılan fonksiyonel ve yapısal çalışmaların sonucunda; DDIT4 ve 14-3-3'ün fiziksel olarak birbirleriyle interaksiyona giremeyecek protein yapılarına sahip olduğu görülmüştür (87). Bir diğer ve henüz aksi ispatlanamamış teoriye göre ise; DDIT4, PPA2A (phosphatase-2A)'nın birikmesini sağlayarak AKT(Thr³⁰⁸) fosforilasyonunu kaldırmakta ve böylece AKT aktivasyonunu azaltmaktadır. Azalan AKT aktivasyonu ise TSC2'nin fosforilasyonunu ve inhibisyonunu azaltmaktadır bu da mTORC1 sinyal yolağını baskılamaktadır (100).

2.5.2. KANSER VE DDIT4

Günümüzdeki terapötik yaklaşımların bir kısmı DDIT4'ün de hedefi olan mTOR'u hedeflemekte ve işe yarar sonuçlar vermektedir. Hem mTOR'un kemoterapötiklerle regülasyonunun olumlu sonuçlar vermesi hem de mTOR'un hücre içerisindeki doğal regülatörü olan DDIT4'ün akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, meme kanseri gibi birçok malignant kanser dokularında farklı seviyelerde ifadenmesi (83), DDIT4'ü yeni tedaviler için aday molekül yapmaktadır. Fakat mTOR'un negatif regülatörü olması sebebiyle DDIT4 ekspresyonunun kanser oluşumunu inhibe etmesi beklenirken çoğu kanser dokusunda DDIT4, yüksek ifade profili göstermektedir (101). *In vitro* çalışmaların sonuçları, DDIT4'ün kanserde onkojen veya tümör baskılayıcı olarak durum-bağılı zıt bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir (82). Bu paradoksal durum DDIT4'ün, TGF- β gibi durum-bağılı olarak hücrede hem tümör baskılayıcı hem de onkogen gibi davranıyor olabileceğini akıllara getirmektedir (102). TGF- β için bu paradoksal etkinin altında yatan sebepler biraz daha aydınlatılmış olsa da DDIT4 için bu durumun altında yatan mekanizma ve bağlı olduğu koşullar henüz tam olarak açıklanamamıştır.

Gastrik kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada; DDIT4 geninin susturulduğunda MAPK ve p53 yollarının aktive olması ile hücre proliferasyonunu azalttığı, genin ekspresyonu arttığında ise proliferasyonda artış olduğu gösterilmiş, genin gastrik kanser, ürotelyal karsinom hücrelerinde onkogen gibi görev yaptığı ve kemosenitiviteyi azalttığı belirtilmiştir (83,103). DDIT4 ifadesi yüksek olan akciğer kanseri hücrelerinin iyonize radyasyona direnç gösterdiği ve bunun HSP27, HSP70 ve AKT proteinlerinin miktarlarını arttırarak gerçekleştiği de bilinmektedir (83). DDIT4 sadece tümör sağkalımı ve terapi direncinde etkin olmakla kalmaz, aynı zamanda otofaji, apoptoz, proliferasyon, migrasyon ve invazyon gibi önemli tümör davranışlarında da rol almaktadır (83). DDIT4 için KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veritabanından ilişkili olduğu yollara baktığımızda “*Autophagy – animal (hsa04140)*”, “*mTOR signaling pathway (hsa04150)*”, “*PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151)*” ve “*MicroRNAs in cancer (hsa05206)*” biyolojik yollarında aktif rol aldığı görülmektedir (104). Bu yolların her biri kanser için kritik öneme sahip yollar olup mTOR, fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT yolağının downstream komponentidir ve bu yollar otofaji için de önemlidir. Metabolizma, hareket, çoğalma, büyüme ve hayatta kalma dahil olmak üzere çoklu hücresel süreçleri kontrol eden PI3K–AKT–mTOR sinyal yolu, insan kanserlerinde en sık bozulan olan yollardan biridir ve tedavi hedefi için sıklıkla değerlendirilmektedir. Bu sinyal ağının temel bileşenlerini hedefleyen 40'tan fazla bileşik, farklı kanserlere sahip hasta grupları içeren klinik deneylerde test edilmiştir ve/veya edilmeye devam etmektedir (105).

DDIT4'ün hücre bağlamına dayalı olarak bu ikili eylemleri nasıl tetikleyebileceği tam olarak anlaşılmamıştır ve bu noktada kanser oluşum ve ilerlemesindeki rolünün aydınlatılması yönünde önemli bir ihtiyaç olduğu görülmektedir (106). Bu ihtiyacın karşılandığı noktada kanserin mekanistik profiline ve literatüre önemli bir katkı sağlanabileceği gibi teşhis ve/veya tedavi bağlamında da yeni bir hedef tanımlanması potansiyeli olabileceği düşünülmektedir.

2.5.3. KOLOREKTAL KANSER VE DDIT4

DDIT4 geni, KRK bağlamında önemli bir rol oynamaktadır. Bu genin rolü, hücresel bağlama ve tümör mikroçevresine bağlı olarak hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak değişkenlik gösterebilmektedir. DDIT4'ün KRK'deki etkilerinin anlaşılması, genin

terapötik hedef ve prognostik biyobelirteç olarak potansiyelini ortaya koymak açısından önemlidir.

DDIT4'ün KRK üzerindeki başlıca etkilerinden biri, mTOR sinyal yolunun düzenlenmesi aracılığıyla gerçekleşir ve KRK'deki aşırı ekspresyonu, ileri patolojik özellikler ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin, Fattahi ve arkadaşları, DDIT4 ekspresyonunun, kolorektal kanser kök hücreleri (CSC) açısından zenginleştirilmiş sferoitlerde, standart kanser hücre hatlarına kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir; bu durum, DDIT4 ekspresyonu ile agresif tümör davranışı arasında bir korelasyon olduğunu işaret etmektedir (15). Bu bulgu, DDIT4'ün kanser hücrelerinin kök hücre özelliklerinin korunmasında rol oynayabileceğini, dolayısıyla tümör ilerlemesi ve metastaz için kritik bir etki yaratabileceğini düşündürmektedir. DDIT4'ün yüksek seviyelerde ekspresyonunun, ileri evre kanser ve artmış metastatik potansiyel ile ilişkilendirilmesi, genin agresif hastalık riski taşıyan hastaları belirlemede yardımcı olabilecek potansiyel bir prognostik belirteç olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Ayrıca, KRK dokularında DDIT4 ekspresyonu, proteinin nükleer lokalizasyonu ile ilişkilendirilmiştir; bu da genin hücre altı lokalizasyonuna bağlı olarak farklı fonksiyonel roller üstlenebileceğini düşündürmektedir. Yani tümör dokularında güçlü nükleer boyama veren DDIT4'ün özellikle tümörlerde çekirdekte daha yoğun bulunmasının tümör ilerlemesiyle ilişkili gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayabileceğine dair bir işaret olduğu düşünülmektedir (15).

DDIT4'ün KRK'deki çelişkili doğası, hücrel stres yanıtlarındaki rolüyle daha da öne çıkmaktadır. Hipoksi, oksidatif stres veya DNA hasarı gibi durumlarda DDIT4 ekspresyonu artmakta ve bu da mTOR sinyalinin baskılanmasına ve hücre büyümesi ile hayatta kalma süreçlerinde değişikliklere yol açabilmektedir. Bu stres yanıt mekanizması, KRK'deki kanser hücrelerinin sıklıkla karşılaştığı değişken oksijen seviyeleri ve besin kısıtlamaları gibi zorlu ortamlarda stres durumuna adaptasyonu ile sonuçlanıp hücrelerin hayatta kalmalarını sağlayabilir.

mTOR sinyallemesinin ötesinde, DDIT4'ün KRK ile ilişkili diğer yolların düzenlenmesinde de rol oynadığı öne sürülmektedir. Örneğin, DDIT4'ün, kolorektal kanserde sıklıkla düzensiz hale gelen TGF- β sinyal yoluyla etkileşime girebileceği öne sürülmüştür (107). Bu

etkileşim, DDIT4'ün KRK'deki rolünü daha da karmaşık hale getirebilir; çünkü TGF- β yolağı, kanserin evresine ve hücrel bağlama bağı olarak hem tümör baskılayıcı hem onkogenik etkiler gösterebilir.

DDIT4'ün mTOR yolağını düzenlenmesindeki rolü göz önüne alındığında, DDIT4 ekspresyonunu modüle etmeyi amaçlayan stratejiler, mTOR yolağını hedefleyen mevcut tedavilerin etkinliğini artırabilir. Örneğin, mTOR inhibitörlerinin, DDIT4 ekspresyonunu etkileyen ajanlarla birlikte kullanılması, tedavi sonuçlarını olumsuz etkileyen direnç mekanizmalarının üstesinden gelmeye yardımcı olabilir (15).

Sonuç olarak, DDIT4, kolorektal kanserde karmaşık bir rol oynamaktadır; bağlama bağı olarak hem tümör baskılayıcı hem de onkogenik etkiler gösterebilir. mTOR yolunun düzenlenmesi, stres yanıtlarındaki rolü ve ileri patolojik özelliklerle ilişkisi, genin terapötik hedef ve prognostik biyobelirteç olarak potansiyelini vurgulamaktadır. DDIT4'ün KRK'deki ikili rolünü tam olarak anlamak ve klinik uygulamalardaki potansiyelini keşfetmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK), dünya genelinde üçüncü en yaygın ve ikinci en ölümcül malignite olup, ciddi bir küresel sağlık sorunu teşkil etmektedir. Her yıl 900.000'den fazla kişinin ölümüne neden olan bu hastalık, tanı anında hastaların yaklaşık %20'sinde metastatik evrede teşhis edilmektedir ve bu gruptaki 5 yıllık sağkalım oranı ne yazık ki %20'nin altındadır. Zaman içinde her ne kadar cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi ile hastaların sağkalımı iyileşmiş olsa da hastalar arasında ve hastalığın kendi içinde görülen heterojen ve kompleks profiller; kanserin agresif fenotip karakteristiklerini desteklemekte ve metastaz ile nüksün önüne geçilmesini zorlaştırmaktadır. Bu noktada klinik uygulamada, prognoz değerlendirmesi ve tedavi planlaması Amerikan Kanser Komitesi (AJCC), Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (UICC) ve Tümör-Node-Metastaz (TNM) sınıflandırmalarına dayanmaktadır. Bunun yanı sıra, tümör derecesi, KRAS ve BRAF mutasyon durumu ile MMR veya mikrosatellit durumu gibi ek prognostik faktörler de değerlendirilmektedir. Ancak mevcut yöntemlerin sınırlı prognostik öngörü gücündeki sınırlılıklar ve erken teşhis için yetersiz kalmaları, KRK'nin ölüm nedenleri arasında hala üst sıralarda yer almasına neden olmaktadır. Bu nedenle, kolorektal karsinogenezinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve tanı ile tedavi süreçlerini destekleyecek özgün biyobelirteçlerin geliştirilmesi kritik bir öneme sahiptir. Etkili biyobelirteçlerin kullanımı, yüksek riskli hastaları erken dönemde tespit etmeye, uygun tedavi stratejilerinin seçilmesine ve uzun vadede sağkalımı oranlarının iyileştirilmesine olanak sağlayabilir. Ayrıca, erken teşhisin ekonomik ve invaziv olmayan tedavi seçeneklerini mümkün kılması hem hastalar hem de sağlık sistemi açısından da önem taşımaktadır.

KRK'nın yüksek morbidite ve mortalite oranları ile biyobelirteçlerin önemi göz önünde bulundurulduğunda kapsamlı bir literatür taraması ile birlikte DDIT4 geninin KRK için potansiyeli bu tez çalışması kapsamında değerlendirilmiştir. DDIT4 (DNA damage-inducible transcript 4), 2002 yılında keşfedilen görece yeni bir proteindir. Hücrel streslere, örneğin hipoksi, ısı şoku, endoplazmik retikulum stresi ve kimyasal moleküllere hızlı bir şekilde indüklenen DDIT4; hücre büyümesi, tümör oluşumu, apoptoz ve otofaji gibi temel süreçleri düzenler ve mTORC1 yolunu baskılar. DDIT4 ekspresyonu ile over kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri ve mesane ürotelyal karsinomu gibi bazı tümör türlerinde kötü sağkalım arasında bir ilişki olduğu gösterilmiş ve bu durum, DDIT4'ün kanserle ilişkili bir

protein ve potansiyel biyobelirteç olabileceğini düşündürmüştür. Çeşitli kanser türlerinde, DDIT4 ifadesinin artışı, tümör hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve terapi direnç mekanizmalarını destekleyebileceği gibi, bazı durumlarda tümör baskılayıcı bir rol üstlenebileceği de gösterilmiştir. Bu tez çalışmasının “Ek” bölümünde Ek 2 olarak verilen “DDIT4 geninin farklı kanserlerdeki rolü ile ilgili literatür özeti” isimli tabloda, DDIT4 geninin farklı kanserlerdeki etkileri ayrıntılı olarak listelenmiştir. Tablodaki literatür bilgilerine bakıldığında DDIT4’ün farklı kanserlerde kötü sağkalım, ileri evre ve kötü diferansiyasyonu ile ilişkilendirildiği görülmektedir. Fakat bazı kanserlerde ise anlamlı bir ilişki gözlenmemektedir. Bu paradoksal literatür eşliğinde kolorektal kanser gibi malignitelerde, DDIT4’ün yüksek ekspresyonu bazı çalışmalarda prognoz üzerinde olumsuz etkilerle ilişkilendirilirken, diğerlerinde ise tümör büyümesinin baskılanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu çelişkili bulgular, DDIT4’ün KRK patogeneziindeki kesin rolünü netleştirmeyi ve olası biyobelirteç potansiyelini değerlendirmeyi kritik hale getirmektedir. Bu gerekçeler doğrultusunda tez çalışmasının temel amacı, DDIT4 geninin KRK patogeneziindeki rolünü ve bu genin KRK için olası bir diyagnostik ve prognostik biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini incelemektir. Bu kapsamda:

- Biyoinformatik analizler kullanarak, GEO gibi platformlarda yer alan KRK veri setleri ve TCGA KRK veri setlerinde tümör ve normal doku arasındaki DDIT4 ifadesinin değişimini araştırmak,
- Aynı veri setlerinde, DDIT4 ifade değişiminin; lokalizasyon, evre, sağkalım süreleri gibi klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini incelemek,
- DDIT4 genindeki ifade değişiminin prognostik bir potansiyel taşıyıp taşımadığını ortaya koymak,
- Üç farklı KRK hücre serisi ve tez çalışması kapsamında toplanan eşli tümör ve normal doku örneklerinde DDIT4 ekspresyon değişimini RNA ve protein düzeyinde doğrulamak hedeflenmiştir.

Bu doğrultuda, “DDIT4 geni KRK için prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabilir” hipotezi değerlendirilmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. HÜCRE HATLARI

Tez çalışmamızda kullanılan kanser hücre hatları (kolorektal kanser) ve normal insan kolon hücresi, ATCC'den alınmıştır. Hücrelerin tipleri, nereden temin edildikleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücrelerin tipleri ve kullanılan besiyeri bilgileri verilmiştir.

Hücre hattı	Hücre adı	Kullanılan besiyeri katalog numaraları	Ortam içeriği
HCT 116	Kolon kanseri	Gibco, Cat.No: 41966-029	DMEM +%10FBS + Penisilin/Streptomisin
SW480	Kolon kanseri	Gibco, Cat.No: 41966-029	DMEM +%10FBS + Penisilin/Streptomisin
LoVo	Kolon kanseri	Gibco, Cat.No: 41966-029	DMEM +%10FBS + Penisilin/Streptomisin
CCD 841 CoN	Normal insan kolon hücresi	Gibco, Cat.No: 41966-029	DMEM +%10FBS + Penisilin/Streptomisin

4.1.2. DOKU ÖRNEKLERİ

Tez çalışmasına dahil edilen kolorektal kanser doku örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Onkoloji Anabilim Dalı'nda tedavileri ve takipleri yapılan hastalardan alınmıştır. Hastalarının çoğu sporadik kolorektal kanser vakalarından oluşmaktadır. Örnekler tüm evre ve gradelerden alınmış ve kadın-erkek ve yaş dağılımı dengede tutulmaya çalışılmıştır. Örneklem oluşturulurken; hastaların radyoterapi, kemoterapi veya herhangi bir ek tedavi almamış olmasına dikkat edilmiştir. Patoloji raporları takip edilip ailesel adenomatöz polipozis, kalıtsal nonpolipozis KRK ve inflamatuvar barsak hastalığı olan hastalar örneklem dışı bırakılmıştır. Bu özelliklere göre 30 bireylik, her bir bireyden tümör ve eşli normal dokusu olmak üzere toplam 60 fresh-frozen dokudan oluşan örneklem hazırlanmıştır. Tez çalışmasında kullanılan örneklere ait histolojik ve demografik veriler Çizelge 4.2.'de paylaşılmıştır. Eşli normal doku alınırken cerrahi sınırın dışında tümöre en

yakın olan bölgeden kesim yapılmıştır. Doku örneği alınan hastalardan aydınlatılmış onam formları toplanmıştır ve Ankara Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan da 15 Eylül 2022 ve İ08-482-22 numaralı etik kurul kararı mevcuttur.

Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen hastaların (taze dondurulmuş dokuların) klinikopatolojik ve demografik özellikleri

Klinik Bilgi	Faktör	Hasta Sayısı	Yüzdelik	Toplam Hasta Sayısı
Cinsiyet	Erkek	16	55.2	29
	Kadın	13	44.8	
Tümör lokasyonu	Sağ lokalize	6	20.7	29
	Sol lokalize	23	79.3	
Histolojik Tip	Adenokarsinoma	25	86.2	29
	Müsinöz adenokarsinoma	3	10.3	
	İskemi nedenli ülser	1	3.4	
Yaş	>50	24	82.8	29
	<50	5	17.2	
Tümör grade	Grade I	1	3.7	27
	Grade II	21	77.8	
	Grade III	5	18.5	
Evre	Evre I	3	12.5	24
	Evre II	8	33.3	
	Evre III	10	41.7	
	Evre IV	3	12.5	

Sağ ve sol lokalize tümör karşılaştırmalarının validasyonunu yapmak için ise; daha önceden Sulgun Charyevva tarafından Kolorektal Kanserde Aday Prognostik Biyobelirteçlerin Arşiv Materyallerinde Doğrulanması isimli tezinde kullanılmak üzere toplanmış formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş 48 sağ ve 48 sol kolorektal kanser doku örneklerinden sentezlenmiş cDNA'lar, qRT-PCR analizi için kullanılmıştır (108).

Çizelge 4.3. Çalışmaya dahil edilen FFPE doku örneklerinin klinikopatolojik ve demografik özellikleri

Klinik Bilgi	Faktör	Hasta Sayısı	Yüzdelik %	Toplam Hasta Sayısı
Cinsiyet	Erkek	72	57	126
	Kadın	54	43	
Tümör Lokasyonu	Sağ Lokalize	63	50	126
	Sol Lokalize	63	50	
Histolojik Tip	Adenokarsinoma	101	80	126
	Diğer	25	20	
Yaş	>50	114	90.5	126
	<50	12	9.5	
Tümör Grade	Grade II	95	84.02	113
	Grade III	18	15.9	
Evre	Evre 1	1	0.8	126
	Evre 2	57	45.2	
	Evre 3	63	50	
	Evre 4	5	3.96	

4.2. YÖNTEM

4.2.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER:

4.2.1.1. Veri Setlerinin Elde Edilmesi:

Bu çalışmada kolorektal kanser (KRK) ile ilişkili gen ifade verileri, Gene Expression Omnibus (GEO) ve The Cancer Genome Atlas (TCGA) veri tabanlarından elde edilmiştir. GEO'dan indirilen toplam 49 bağımsız KRK veri setine ek olarak (Veriseti bilgileri ekte (Ek 4) verilmiştir), TCGA COAD ve READ (COAD-READ) verileri de analizlere dahil edilmiştir.

4.2.1.2. DDIT4 Gen İfadesinin Değerlendirilmesi:

Normal-tümör karşılaştırması yapmaya elverişli veri setlerinde örnekler tümör ve normal olarak iki gruba ayrılmış; DDIT4 gen ifade seviyeleri bu iki grup arasında karşılaştırılmıştır. Ayrıca klinik ve moleküler alt gruplar da benzer yaklaşımla değerlendirilmiştir. Bu kapsamda:

Tümör derecesi (Grade) ve evreleme (Stage) bilgisi bulunan örnekler ilgili alt gruplara ayrılmıştır. Evre bilgisi, TNM evreleme sistemine göre verildiyse Çizelge 2.'ye göre AJCC evreleme sistemine dönüştürülmüştür.

Lokalizasyon (sağ/sol kolon), MSI/MSS durumu, CIMP pozitif/negatif, mutasyon statüsü, CMS alt tipleri, polip tipleri ve nüks durumu (nüks var/yok) gibi kategorik klinik ve moleküler alt gruplar da oluşturulmuştur.

Karşılaştırmalar, verilerin normal dağılım varsayımını takiben, iki gruplu analizler için iki kuyruklu Student's t-testi ve Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. İstatistiksel analizler ve görselleştirmeler GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4.2.1.3. Sağkalım Analizleri:

Sağkalım verilerine sahip örnekler, DDIT4 gen ifade seviyesine göre yüksek ve düşük ekspresyon gösteren iki gruba ayrılarak genel sağkalım (OS) ve hastalıksız sağkalım (DFS) analizleri yapılmıştır. Kaplan-Meier eğrileri GraphPad Prism ile oluşturulmuş, gruplar arası fark log-rank testi ile değerlendirilmiştir, istatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

4.2.1.4. Genetik Alterasyon Analizi:

DDIT4 geni üzerindeki genetik değişikliklerin (mutasyon, kopya sayısı değişikliği vb.) sıklık ve türleri, cBioPortal (<https://www.cbioportal.org>) aracılığıyla TCGA KRK veri seti kullanılarak araştırılmıştır.

4.2.1.5. Gen Seti Zenginleştirme Analizi (Gsea):

GSEA, yüksek boyutlu gen ifade verilerinde belirli gen setlerinin fenotipe göre istatistiksel olarak öne çıkıp çıkmadığını analiz etmeye yarayan bir yöntemdir. Genleri öncelikle fenotip ile korelasyonlarına göre sıralar, ilgili gen setlerinin bu sıralamada nasıl konumlandığına bakarak zenginleşmeyi hesaplar ve permütasyon testleriyle istatistiksel anlamlılığı değerlendirir. Elde edilen sonuçlar, hangi biyolojik süreçlerin veya yolların ilgili fenotipte önemli rol oynadığını ortaya koyar. Bu tez çalışmasında GSE17536, GSE39582 ve TCGA COAD-READ veri setlerinde, örnekler DDIT4 ekspresyon seviyelerine göre yüksek ve

düşük olacak şekilde iki gruba ayrılmıştır. Bu gruplar arasındaki farklılıklar, Cancer Hallmarks yollarına yönelik gen seti zenginleştirme analizi uygulanarak incelenmiştir.

4.2.1.6. Korelasyon Analizleri ve Yolak Zenginleştirme:

DDIT4 ile pozitif korelasyon gösteren genleri belirlemek amacıyla Pearson korelasyon katsayıları Excel aracılığıyla hesaplanmış ve $r > 0,6$ olan genler listelenmiştir. Bu genlerin fonksiyonel anlamı ve biyolojik bağlamını değerlendirmek için EnrichR (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) kullanılarak Hallmarks yolak zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen zenginleşme sonuçları, istatistiksel önem derecesi ve etki büyüklükleri göz önüne alınarak değerlendirilmiş ve GraphPad Prism aracılığıyla görselleştirilmiştir.

4.2.1.7. Gen Etkileşim ve Protein-Protein Etkileşim (PPI) Ağı Analizi:

DDIT4'ün gen seviyesindeki etkileşim ağını oluşturmak için ilk olarak GeneMANIA (<https://genemania.org>) aracı kullanılmıştır. Ağ büyüklüğü 50 gen ile sınırlanmıştır. Co-expression (ortak ekspresyon), co-localization (ortak lokalizasyon), genetic interaction (genetik interaksiyon) filtreleri aktif olacak şekilde, DDIT4 ile benzer transkripsiyonel düzen ortaya koyan genleri listeleyerek benzer biyolojik süreçlerde yer alabilecek adayların tespitini sağlamıştır.

Genetik düzeyde belirlenen ilişkiyi protein etkileşim ağları (Protein-Protein Interaction, PPI) ölçeğinde de desteklemek amacıyla STRING veritabanı (<https://string-db.org>) kullanılmıştır. STRING analizi, DDIT4 etrafında 50 proteini içeren bir ağ oluşturmak üzere “database”, “experiment”, “text mining” ve “coexpression” filtreleri seçilerek yapılmıştır. Bu sayede DDIT4'ün yer aldığı potansiyel protein etkileşim ağları incelenmiş, ilgili fonksiyonel modüller belirlenmiştir.

Oluşturulan gen ve protein ağlarında yer alan genler ve proteinler, EnrichR (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) kullanılarak Hallmarks yolak zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen zenginleşme sonuçları, istatistiksel önem derecesi ve etki büyüklükleri göz önüne alınarak değerlendirilmiş ve GraphPad Prism aracılığıyla görselleştirilmiştir.

4.2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ:

İnsan kolorektal kanser hücre hatları (HCT116, SW480, LoVo) ve normal kolon epitel hücresi (CCD 841 CoN) ATCC'den (American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)) temin edilerek bu tez çalışması kapsamında kullanılmıştır. Hücre hatları, %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık ortamında %10 FBS (Biowest, Nuaille, France), %1 Penisilin/Streptomisin (Lonza, Basel, Switzerland), DMEM high glikoz, pyruvate (Gibco: 41966-029) besiyerinde kültür edilmişlerdir.

4.2.2.1. Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması:

+4°C'de muhafaza edilen 500 ml DMEM high glucose, pyruvate besiyeri 37°C su banyosunda yaklaşık 15 dakika kadar inkübe edildi. 50 ml ısı ile inaktive edilmiş şekilde alınmış FBS 50 ml enjektör ve 0,2 µm filtre aracılığıyla sterilize edilerek DMEM besiyerine eklendi. Penisilin/Streptomisin karışımından ise 5,5 ml besiyerine eklendikten sonra; %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM besiyeri hazır edildi.

4.2.2.2. Hücre Hatlarının Stoktan Çıkarılıp Kullanılması:

-196°C sıvı azotta cryovial içerisinde stoklanan hücre hatları 37°C su banyosunda eritildi. İçinde bir miktar buz kalacak şekilde su banyosundan alınan hücre çözeltisi hızlıca içinde 5 ml DMEM besiyeri bulunan falcon tüpe aktarıldı. Falcon tüp 1500 RPM 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan pelete 5 ml besiyeri eklendi ve süspanse edilen hücreler içinde 5 ml taze DMEM besiyeri bulunan T25 flaska aktarıldı. Hücrelerin flaskın her yerine eşit derece dağılması için flasklar hafifçe karıştırıldı ve %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık ortamında inkübasyona bırakıldı.

4.2.2.3. Hücrelerin Pasajlanması:

Hücreler bulundukları flask yüzeyinin %70-80'ini kaplayacak kadar çoğaldığında pasajlama yapıldı. Flask boyutuna göre uygun hacimde 1X Trypsin (T25 flasklar için 1 ml, T75 flasklar için 3 ml) flasklara eklendi ve hücreler 5 dakika 37°C'de trypsin ile inkübe edildi. Hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadıkları mikroskop ile takip edildi. Hücreler kalktığında trypsin inaktivasyonu için kullanılan trypsin hacminin 2 katı kadar besiyeri flasklara eklendi. İyice pipetaj yapılarak yüzeye ve birbirine yapışan hücrelerin ayrılması sağlandı. İstenen hücre

miktarına uygun hacimde hücre + besiyeri çözeltisi yeni flaska aktarıldı ve pasaj numaraları bir arttırıldı.

4.2.2.4. Hücre Dondurma

Hücre hatlarının kullanıldığı deney protokolleri bittiğinde, hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu. Dondurma aşaması için; hücrelerin bulundukları flask yüzeyinin %70-80'ini kaplayacak kadar çoğalması beklendi. Flask boyutuna göre uygun hacimde 1X Trypsin (T25 flasklar için 1 ml, T75 flasklar için 3 ml) flasklara eklendi ve hücreler 5 dakika 37°C'de trypsin ile inkübe edildi. Hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadıkları mikroskop ile takip edildi. Hücreler kalktığında trypsin inaktivasyonu için kullanılan trypsin hacminin 2 katı kadar besiyeri flasklara eklendi ve hücre+besiyeri karışımı falcon tüplere aktarıldı. Falcon tüplerdeki karışımından 10µl Neubauer lamına aktarıldı ve hücre sayımı yapıldı. Elde edilen sayım sonucuna göre falcon tüplerdeki total hücre sayısı hesaplandı. Falcon tüpler +4°C 1500 RPM'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. %10 FBS, %10 DMSO ve %80 besiyeri olacak şekilde, dondurulacak vial sayısına göre total hacmi hesaplanan dondurma çözeltisi hazırlandı ve santrifüj sonrası elde edilen pellet bu çözelti içerisinde çözüldü. Her bir cryoviale 1ml hücre+dondurma çözeltisi gelecek şekilde dağıtım yapıldı ve tüpler öncelikle -20°C'de 1 saat tutulup sonrasında -80°C'ye kaldırıldı. Hücrelerin bir sonraki kullanımlarına kadar geçecek süreye göre; uzun süre kullanılmayacak olanlar sıvı azot tanklarına yerleştirildi.

4.2.3. KOLOREKTAL KANSER HASTALARINDAN DOKU TOPLAMA

Hastalardan çıkarılan dokuların hastaneden uygulamaların gerçekleştirileceği laboratuvara güvenilir bir şekilde taşınabilmesi için sıvı nitrojen içeren bir tank ameliyathanede hazır edildi. Ameliyatı gerçekleştiren cerrahlar çıkarılan tümör ve eşli normal dokuları uygun eppendorf tüplerine koydu ve tüpler hemen sıvı nitrojen içeren tanka bırakıldı. Dokular, uygulamaların gerçekleştirileceği kuruma sıvı nitrojen içerisinde taşındıktan hemen sonra -80°C'ye kaldırılarak, kullanılacakları zamana kadar depolandı.

4.2.4. DDIT4 İFADESİNİN MRNA SEVİYESİNDE VALİDASYONU

4.2.4.1. Hücre ve Dokulardan RNA İzolasyonu:

Hücre kültüründe uygun flasklarda kültür edilen HCT 116, SW480, LoVo ve CCD 842 CoN hücreleri, uygun yoğunluğa geldiklerinde tripsin ile kaldırılıp 15 ml falcon tüpe alındı. 1500 RPM, 5 dk, +4°C santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Pelet, 1 ml PBS ile yıkandı ve tekrar santrifüj ile PBS'ten ayrıştırıldı. Bu aşamadan sonra hücre peletleri -80°C'ye kaldırılarak muhafaza edildi. Toplanan hücreler, RNA izolasyonu için 1,5 ml'lik eppendorf tüplerde 1 ml Trizol içerisinde lizat haline getirildi. -80°C'de saklanan tümör ve eşli normal doku örnekleri ise RNA izolasyonuna başlamadan önce kuru buz üzerine alındı ve kuru buz üzerinde izolasyon için kullanılacak miktarda (50-100 mg) doku kesimi yapıldı. Kesilen dokular, daha önceden içlerine 1 ml Trizol eklenmiş eppendorf tüplerine alındı. Doku ve hücre lizatları, homojenizatör aracılığıyla homojenize edildi. Homojenizasyon sırasında sürtünme sebebiyle ısınmayı önlemek için bu aşama buz üzerinde gerçekleştirildi. Homojenizasyon ve liziz aşamasından sonra örnekler Trizol içerisinde 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Eppendorflara 0.2 ml kloroform eklendi ve 15 saniye iyice çalkalanarak 15 dakika boyunca sabit bir şekilde oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Faz ayrımı başladıktan sonra, faz ayrımını arttırmak ve sabitlemek için tüpler +4°C'de 15 dakika 13000 RPM'de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası RNA'ları içeren şeffaf üst faz; içinde 0.5 ml soğuk izopropil alkol içeren yeni eppendorflara aktarıldı, oluşan diğer fazlarsa atıldı. Yeni tüpler, RNA presipitasyonunu arttırmak için, -20°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. 16 saat inkübasyon ardından, -20°C'den çıkarılan tüpler 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra +4°C'de 15 dakika 13000 RPM'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Oluşan pelet, 1 ml %75 soğuk etanol ile pelet çözülmeden karıştırıldı ve sonra +4°C'de 15 dakika 7500 g'de santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. Oluşan pelet, %100 etanol ile pelet çözülmeden karıştırıldı ve tüpler +4°C'de 15 dakika 7500 g'de santrifüj edildi. Son santrifüjden sonra süpernatant döküldü ve pelet kurumaya bırakıldı. Tam kurumasına izin verilmeden ama büyük oranda kuruduktan sonra peletin miktarına göre uygun bir hacimde nükleaz içermeyen su ile pelet çözüldü ve izole edilen RNA'lar -80°C'de muhafaza edildi.

4.2.4.2. İzole Edilen RNA'ların Sıfık, Bütünlük ve Miktar Tayini

Spektrofotometrik Değerlendirme

Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 cihazı kullanarak, cihazın kendi programında “Nucleic Acid” modülünde “RNA-40” seçilerek, her RNA örneğinden 1'er µl ölçüm kaidesine eklenerek izole edilen RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçlarında elde edilen A230, A260, A280 değerleri ve oranları ve RNA konsantrasyonları kaydedildi.

Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA'ların bütünlük değerlendirmesini yapmak için agaroz jel elektroforezi yapıldı. %1'lik agaroz jel hazırlamak için, 1g agaroz 100 ml TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırın yardımı ile çözdürüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra, karışım uygun sıcaklığa düşene kadar beklendi. El yakmayacak sıcaklığa geldiğinde 6 µl RedSafe karışıma eklendi ve jel solüsyonu tanka eklendi. Örnek hacmi ve sayısına göre uygun taraklar jel tankına yerleştirildikten sonra jel solüsyonu soğumaya bırakıldı. Jelleşme gerçekleştikten sonra, TBE tamponu içeren jel yürütme tankında örnek yükleme yapıldı. Ladder olarak Lambda DNA/EcoRI plus HindIII Marker, ready-to-use SM0193 kullanıldı. 30 dk, 100 V yürütme gerçekleştirildikten sonra ribozomal RNA bantlarına bakarak izole edilen RNA'ların bütünlüğüyle ilgili fikir elde edildi.

4.2.4.3. İzole Edilen RNA'lardan cDNA Sentezi:

cDNA sentezi 1µg başlangıç RNA'sı kullanılarak ve “The Thermo Scientific™ Revert Aid™ RT Kit'i” üretici protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. İzole edilen her bir RNA örneği Çizelge 4.4.'te verilen miktarlarda random hexamer ve nükleaz içermeyen su ile karıştırılarak denatürasyon aşaması için 65°C 5 dk Bio-Rad Thermal Cycler cihazında inkübe edilmiştir.

Çizelge 4.4. Denatürasyon aşamasına hazırlanan örnekler için gereken hacimler

Bileşen	Miktar
Total RNA	1µg
Random Hexamer Primer (100µM)	1µl
Nükleaz İçermeyen H ₂ O	12µl'ye tamamlayacak kadar
Toplam Hacim	12µl

Denatürasyon aşamasından sonra; kit ile birlikte gelen 5X Reaction Buffer, RiboLock RNase Inhibitor(20U/µl), 10mM dNTP Mix ve RevertAid M-MuLV RT (200U/µl) enzimden oluşan reaksiyon karışımı Çizelge 4.5.'te verilen sıra ve miktarlara göre hazırlandı ve denatürasyona bırakılan RNA ve primer karışımıyla birleştirildi.

Çizelge 4.5. cDNA sentezi reaksiyon karışımı için gereken hacimler

Bileşen	Miktar
5X Reaction Buffer	4µl
RiboLock RNase Inhibitor(20U/µl)	1µl
10mM dNTP Mix	2µl
RevertAid M-MuLV RT (200U/µl)	1µl
Toplam Hacim:	20µl

Her bir örnek için total hacmi 20µl olan qRT-PCR reaksiyon karışımları hazır edildikten sonra Bio-Rad cihazında üretici protokolün önerdiği Çizelge 4.6.'da paylaşılan programa göre cDNA sentez reaksiyonu tamamlandı.

Çizelge 4.6. cDNA sentezi için gereken reaksiyon koşulları

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)
Primer Bağlanması (Annealing) and Uzama (Extension)	25	5
DNA Polimerizasyonu	42	60
Sonlanma	70	5
	16	∞

Her bir örneğe buz üzerinde 80µl nükleaz içermeyen su eklendikten sonra cDNA'lar -20°C'ye kaldırıldı.

4.2.4.4. Sentezlenen cDNA Örnekleriyle qRT-PCR Analizi:

Syber Green Master Mix kiti üretici protokolü takip edilerek qRT-PCR adımı gerçekleştirildi. İlk olarak steril bir tüpte 12,5 µL SYBR Green PCR Master Mix, her birinin son konsantrasyonu 0,2 µM olacak şekilde forward ve reverse primerler, 1 µg'a kadar kalıp cDNA ve son hacmi 25 µL'ye tamamlayacak şekilde nükleaz içermeyen su iyice karıştırıldı. Kitteki talimatlara göre PCR cihazında reaksiyon şartları ayarlandıktan sonra, PCR tüpü cihaza yerleştirildi ve reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon koşulları Çizelge 4.7.'de verilmiştir. İlk döngüden sonra denatürasyon adımına tekrar dönerek aynı reaksiyon 40 kere tekrar edildi.

Referans gen olarak GAPDH kullanıldı. qRT-PCR yoluyla elde edilen Ct (cycle threshold) değerleri, $\Delta\Delta C_t$ yöntemine göre analiz edilmiş ve kat artışı (fold change) değerleri hesaplanmıştır. Eşli normal dokular referans grup olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) kullanılarak iki kuyruklu Student's t-testi ile değerlendirilmiş; $p < 0,05$ düzeyinde anlamlılık kabul edilmiştir.

Çizelge 4.7. qRT-PCR reaksiyon koşulları

Adım:	Sıcaklık:	Süre:
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	5 dakika
Denatürasyon	95°C	30 saniye
Bağlanma (Annealing)	60°C	30 saniye
Uzama (Extension)	72°C	30 saniye

4.2.5. DDIT4 İFADESİNİN PROTEİN SEVİYESİNDE VALİDASYONU

4.2.5.1. Hücre ve Dokulardan Protein İzolasyonu:

Hücre kültüründe uygun flasklarda kültür edilen HCT 116, SW480, LoVo ve CCD 842 CoN hücreleri, uygun yoğunluğa geldiklerinde tripsin ile kaldırılıp 15 ml falcon tüpe alınır. 1500 RPM, 5 dk, +4°C santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Pelet, 1 ml PBS ile yıkandı ve tekrar santrifüj ile PBS'ten ayrıştırıldı. Bu aşamadan sonra hücre peletleri -80°C'ye kaldırılarak muhafaza edildi. Toplanan hücreler, protein izolasyonu için 1,5 ml'lik eppendorf tüplerde pelet boyutuna uygun hacimlerde RIPA içerisinde lizat haline getirildi. -80°C'de saklanan tümör ve eşli normal doku örnekleri ise protein izolasyonuna başlamadan önce kuru buz

üzerine alındı ve kuru buz üzerinde izolasyon için kullanılacak miktarda doku kesimi yapıldı. Kesilen dokular, içlerine doku boyutuna göre uygun hacimlerde RIPA tamponu eklenmiş eppendorflara alındı ve protokol boyunca buz üstünde tutuldu. Protein izolasyonu için doku homojenizasyonu sonikatör aracılığıyla yapıldı. Prob RIPA tamponu ve doku içeren eppendorfun içine yerleştirildikten sonra ses dalgasının genlik ayarı (amplitude) 20'yi geçmeyecek şekilde 2'şer saniyelik titreşimlerle sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Fiziksel aktiviteye bağlı sıcaklık artışını önlemek için eppendorf buz üstünde tutuldu. 5 titreşim atışından sonra bir süre buzda bekletilerek soğuma sağlandı. Homojenizasyon sağlanmadıysa tekrar titreşim verildi. Homojenize olmuş örnekler 35 dk buz üstünde, 5 dakikada bir karıştırılarak, inkübe edildi. Sonrasında, 30 dk +4°C 1500 RPM'de santrifüj edildi ve protein içeren süpernatantlar yeni tüplere aktarıldı. Protein lizatları -80°C'ye kaldırılarak saklandı.

4.2.5.2. Protein Miktar Tayini (Bca Assay):

Protokol, Pierce™ BCA Protein Assay Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kitin içinde yer alan BSA protein standartları (A-I) buz üstünde Çizelge 4.8.'de verilen bilgiler doğrultusunda hazırlanmıştır.

Çizelge 4.8. BSA protein standartlarının hazırlanması için gereken dilüsyon talimatları

Standart	Dilüent (PBS:1X)	Hacmi	BSA Hacmi (µl)	Final BSA Konsantrasyonu (µg/ml)
A	0		Stoktan 300 µl	2000
B	125		Stoktan 375 µl	1500
C	325		Stoktan 325 µl	1000
D	175		B standartından 175 µl	750
E	325		C standartından 325 µl	500
F	325		E standartından 325 µl	250
G	325		F standartından 325 µl	125
H	400		G standartından 100 µl	25
I	400		0	0

Her bir standarttan 20 µl ve protein miktarı tayin edilmek istenen örneklerden 4'er µl, 96 kuyucuklu plate'e eklendi. BCA çalışma reaktifini (WR) hazırlamak için; kitin içinden çıkan BCA reaktifi A ve BCA reaktifi B'den, 50:1 (BCA reaktifi A:BCA reaktifi B) olacak şekilde

karıştırıldı. Her bir kuyuya (örneklere ve standartlara) 200'er µl WR hızlı bir şekilde eklendi ve plate karanlık ortamda 37°C'de 35 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası plate'i, 562 nm dalga boyunda ölçüm yapmak için Plate Readera götürüldü. Konsantrasyonu bilinen BSA standartlarından elde edilen ölçüm sonuçları ile BSA standart eğrisi oluşturularak, konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyon hesaplamaları yapıldı.

4.2.5.3. Western Blot:

Jel Hazırlama:

İstifleyici (stacking) jel %5'lik ve ayrıştırıcı (resolving) jel %12'lik olacak şekilde, ayrı tüplerde Çizelge 4.9. ve 4.10.'da verilen hacimlere göre hazırlanmıştır.

Çizelge 4.9. %5 istifleyici (stacking) jel hazırlamak için gereken hacimler

Çözelti Bileşenleri	1 jel (2 ml)	2 jel (4 ml)	3 jel (6 ml)	4 jel (8 ml)	5 jel (10 ml)
H ₂ O	1360 µl	2720 µl	4080 µl	5440 µl	6800 µl
30% akrilamid karışımı	340 µl	680 µl	1020 µl	1360 µl	1700 µl
1 M Tris (pH 6.8)	260 µl	520 µl	780 µl	1040 µl	1300 µl
10% SDS	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	100 µl
10% Amonyum persülfat	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	100 µl
TEMED	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl	10 µl

Çizelge 4.10. %12 ayrıştırıcı (resolving) jel hazırlamak için gereken hacimler

Çözelti Bileşenleri	1 jel (5 ml)	2 jel (10 ml)	3 jel (15 ml)	4 jel (20 ml)	6 jel (30 ml)	8 jel (40 ml)
H ₂ O	1600 µl	3200 µl	4800 µl	6400 µl	9600 µl	12800 µl
30% Akrilamid karışımı (pH 8.8)	2000 µl	4000 µl	6000 µl	8000 µl	12000 µl	16000 µl
1.5 M Tris (pH 8.8)	1300 µl	2600 µl	3900 µl	5200 µl	7800 µl	10400 µl
10% SDS	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	300 µl	400 µl
10% Amonyum persülfat	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	300 µl	400 µl
TEMED	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	30 µl	40 µl

Su, %30 akrilamid karışımı, 1M Tris (ph 6.8), %10 SDA, %10 amonyum persülfat içerikleri uygun hacimlerde tüplere eklendikten sonra; TEMED, ilk etapta yalnızca resolving jel karışımına eklendi ve resolving jel, jel dökme aparatına döküldü. Jelin hava ile temasını kesmek ve düzgün bir şekilde polimerleşmesini sağlamak için en üste soğuk izopropanol eklendi ve jel polimerleşene kadar beklendi. Resolving jel polimerleştiğinde ise stacking jel karışımına TEMED eklenerek polimerizasyon reaksiyonu başlatıldı ve ayrıştırıcı jelin üstündeki izopropanol dökülerek ve yerine stacking jel karışımı eklendi. Jele, örnek sayısına ve hacmine uygun olarak seçilmiş tarak yerleştirilerek jel polimerleşene kadar beklendi. Polimerizasyon tamamlandığında, jeller tanka yerleştirildi ve tampon çözelti içerisinde tarak dik bir şekilde dikkatlice çıkartılarak örnek yüklemeye hazır hale getirildi.

Örnek Hazırlama:

Örnekler jelde yürütülmeden önce, BCA protokolü sonucu elde edilen miktarlara göre belirlenen hacimlerde su, yükleme boyası ve β -mercaptoethanol ile karıştırıldı. Örnek karışımları, 95°C ısı bloğunda 5 dakika denatüre edildikten sonra uygun hacimlerde, jel kuyucuklarına yükleme yapıldı.

Jel Yürütme ve Membran Transferi:

Jel yürütme işlemi 1X SDS yürütme tamponu içerisinde gerçekleştirildi. Örnekler stacking jelden çıkana kadar 90V ile, resolving jele geçtiklerinde ise 120 V ile yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi sırasında ısınmayı önlemek adına tankın çevresine buz kalıpları yerleştirildi. Protein örnekleri elektrik akımıyla jel içerisinde yeterince yürüdükten sonra, jeldeki proteinler PVDF membrana transfer edildi. Transfer öncesinde; PVDF membran, %100 metanol içerisinde yaklaşık 1 dk bekletilerek membran aktivasyonu gerçekleştirildi. Bu sırada transfer kaseti için kullanılacak olan whatman kağıtları ve süngerler transfer tamponu içerisinde ıslatıldı. Katottan anota doğru sünger, whatman kağıtları, jel, membran, whatman kağıtları, sünger olacak sırayla; arada hava kabarcığı olmayacak şekilde transfer kaseti oluşturuldu. Oluşturulan kaset, yürütme tamponu içerisinde aparata yerleştirildi. Transfer tamponu içerisinde, jel başına 200mA akım geçecek şekilde 1 buçuk saat transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer bittiğinde, transferin gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek için, membran birkaç dakika ponceau içerisinde

bekletildi. Transfer başarıyla tamamlandıysa, membran TBS-T içerisinde 1-2 dakika yıkanarak Ponceau'dan arındırıldı.

Membran Bloklama:

Membranın protein içermeyen kısımları %5 BSA çözeltisi içerisinde çalkalayıcıda 1 saat inkübe edilerek blokladı. İnkübasyon sonrası, TBS-T ile yıkama yapıldı. Yıkama, membran TBS-T içerisinde 10 dakika çalkalanarak ve bu aşama 3 kez tekrar edilerek yapıldı.

Primer Antikor Uygulaması:

Bloklama ve yıkama sonrası, membranın üstü kaplanacak şekilde primer antikor (Anti-REDD-1/DDIT4 antibody (human, WB) Cell Signaling Cat No: 2516S) uygulaması yapıldı. Membran, primer antikor içerisinde 1 gece soğuk odada (+4°C'de) karıştırıcı cihaz üzerinde inkübe edildi. Primer inkübasyonu sonrası membran TBS-T ile (10 dakika x 3) yıkandı.

Sekonder Antikor Uygulaması:

Primer antikor uygulamasından sonra; membran, 10 dakika x 3 olmak üzere TBS-T ile yıkandı. Yıkama sonrası, membran sekonder antikor içerisinde 4 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası TBS-T ile yıkama (10 dakika x 3) gerçekleştirildi ve membran TBS içine alınarak görüntü alma aşamasına kadar +4°C'de saklandı.

Görüntüleme:

SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate kiti ve protokolü kullanılarak membrana ECL uygulaması yapıldı ve LI-COR Odyssey Imaging System kullanılarak membran görüntülemeleri gerçekleştirildi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

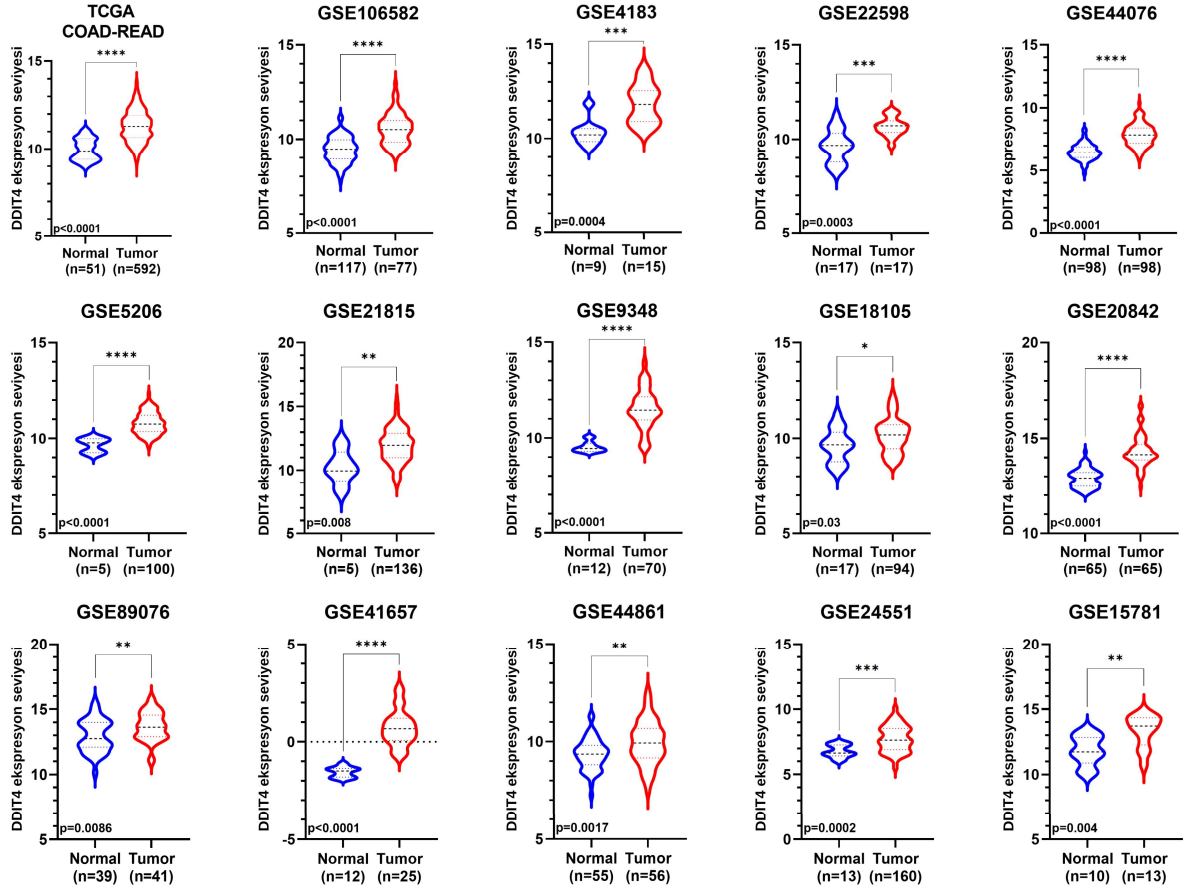
5.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER

Biyoinformatik analizler DDIT4 geninin KRK’de normal dokulara kıyasla anlamlı ölçüde yüksek ifadelendiğini, bu artışın kötü prognoz, artmış nüks riski, sağ kolon lokalizasyonu, MSI, CIMP ve BRAF mutasyonları gibi belirgin agresif klinik-moleküler imzalarla ilişkili olduğunu göstermektedir. GSEA ve korelasyon analizleri sonucunda hipoksi, EMT, mTOR ve p53 sinyal yolları gibi temel kanser yolaklarında DDIT4 yüksek ifadesiyle paralel zenginleşme gözlenmesi, DDIT4’ün kolorektal karsinogenezinde fonksiyonel bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, DDIT4’ün hem prognostik/diyagnostik bir biyobelirteç hem de potansiyel bir terapötik hedef olarak değerlendirilmesi için güçlü bir temel oluşturmaktadır.

5.1.1. DDIT4 KOLOREKTAL KANSERDE NORMAL DOKULARA GÖRE YÜKSEK İFADE PROFİLİ SERGİLEMEKTEDİR

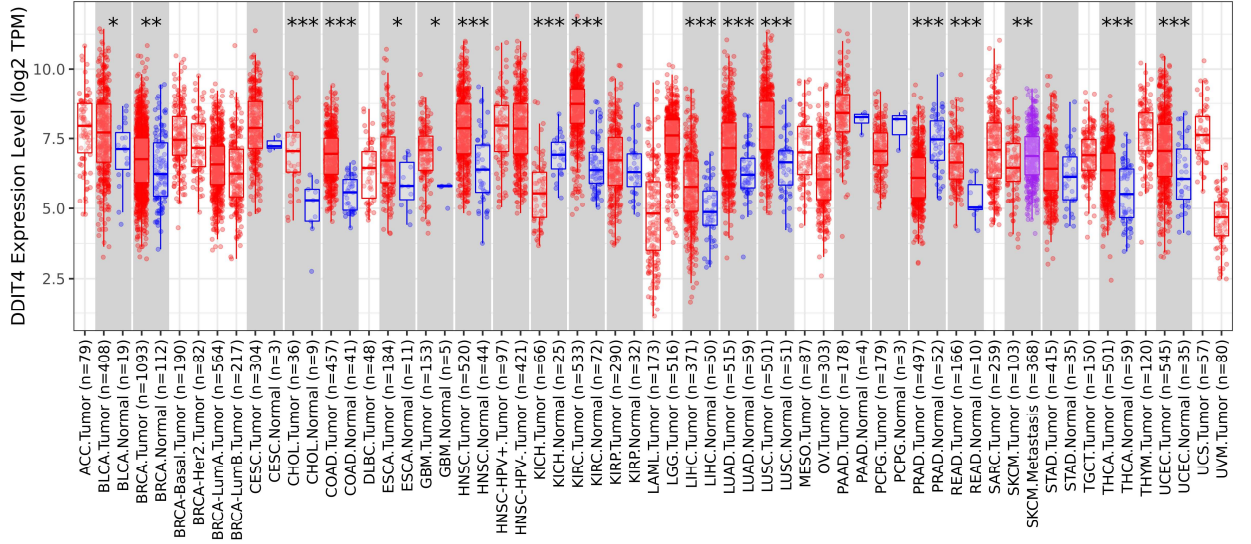
Çalışmada ilk olarak DDIT4 geninin kolorektal kanser (KRK) dokularındaki ifade düzeyleri, sağlıklı kontrol dokuları ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, GEO veri tabanından indirilen bağımsız verisetlerinde, tümör/normal doku ifade seviyeleri olan 14 bağımsız KRK verisetinin yanı sıra TCGA kohortları incelenmiştir. DDIT4 ifade seviyesinin tümör grubunda, normal gruba göre belirgin şekilde daha yüksek seviyede ifadelendiği görülmüştür (Şekil 5.1). Bu kıyaslamalar, tümör ve normal örnekler arasında ikili karşılaştırmalar yapmaya elverişli veri setlerinde, GraphPad Prism yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık iki kuyruklu Student’s t-testi/ Mann-Whitney U testi ile belirlenmiş ve $p < 0,05$ önemli kabul edilmiştir. Hem TCGA COAD-READ kohortunda hem de 14 farklı bağımsız GEO veri setinde DDIT4 gen ifadesi tümörlerde anlamlı biçimde yüksek bulunmuştur.

Ayrıca, TIMER2.0 aracıyla yapılan pan-kanser analizleri, DDIT4 yüksek ifadesinin yalnızca KRK ile sınırlı olmadığını, pek çok kanser türünde de artış gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 5.2).



Şekil 5.1. DDIT4 geni ifade seviyesi TCGA kolorektal kanser (COAD-READ) ve 14 farklı, bağımsız GEO KKR verisetinde normal dokular ile karşılaştırılması.

Grafikler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuş olup istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiştir (Kırmızı renk tümör örneklerindeki ifade seviyesini gösterirken, mavi renk normal örneklerdeki gen ifade seviyesine işaret etmektedir. İstatistiksel anlamlılık paired t-testi ile belirlenmiştir (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).



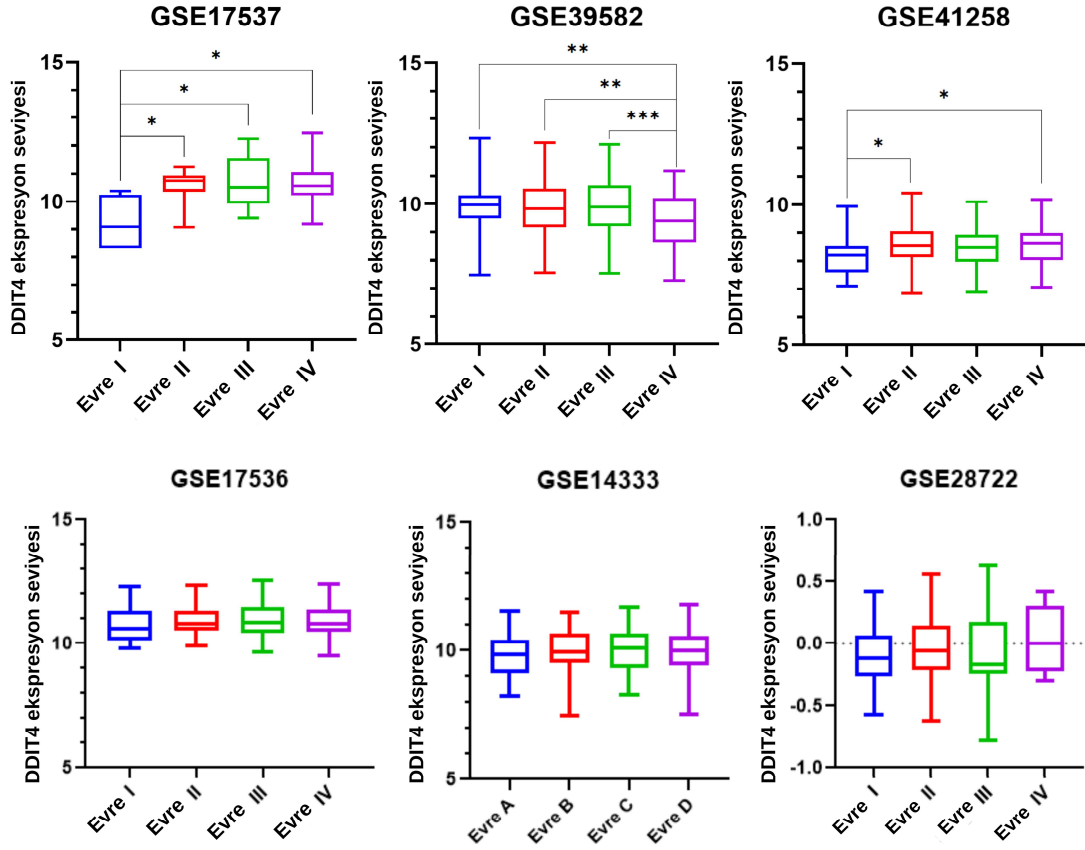
Şekil 5.2. TCGA tümörlerinde, DDIT4 geninin tümör ve normal dokular arasındaki gen ekspresyon seviyelerinin dağılımları.

Wilcoxon testiyle hesaplanan istatistiksel anlamlılık yıldız “*” ile görsel üzerinde belirtilmiştir (*: p-değeri <0,05; **: p-değeri <0,01; ***: p-değeri <0,001). (Kısaltmalar: BLCA, mesane ürotelyal karsinomu; BRCA, invaziv meme karsinomu; COAD, kolon adenokarsinomu; ESCA, özofagus karsinomu; FPKM, milyonda kilobaz başına düşen fragman sayısı; KIRC, böbrek renal berrak hücreli karsinom; KIRP, böbrek renal papiller hücreli karsinom; KICH, böbrek kromofob karsinomu; LUAD, akciğer adenokarsinomu; LUSC, akciğer skuamöz hücreli karsinom; ns, anlamlı değil; READ, rektum adenokarsinomu; LIHC, karaciğer hepatoselüler karsinomu; THCA, tiroid karsinomu; PRAD, prostat adenokarsinomu; UCEC, uterin korpus endometrial karsinomu.); TCGA, Kanser Genomu Atlası.

5.1.2. YÜKSEK DDIT4 İFADE SEVİYELERİ KÖTÜ PROGNOZ İLE İLİŞKİLİDİR

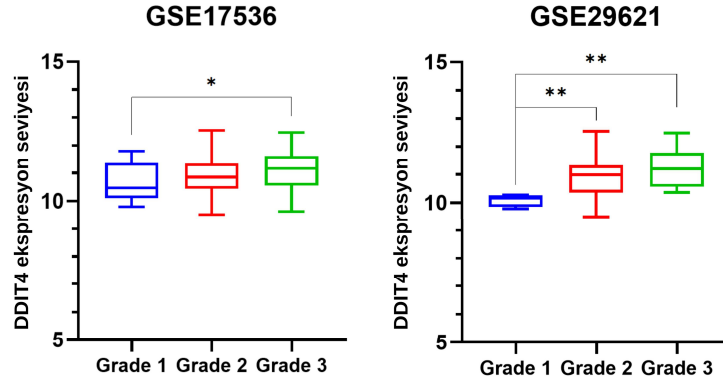
DDIT4 ekspresyon paterninin klinik önemi, hasta örneklerinin tümör derecesi (grade), evre bilgisi (stage), nüks durumu ve sağkalım verileri (OS: overall survival; DFS: disease-free survival) ile ilişkilendirilerek değerlendirilmiştir.

Evre analizleri yapılırken, TNM evreleme sistemi ile verilen veriler, Çizelge 2.2.’deki bilgilere göre AJCC evreleme sistemine dönüştürülerek analizler yapılmıştır. Sonuçlara göre, yüksek DDIT4 ifade seviyesi, GSE17537 ve GSE41258 verisetlerinde ileri tümör evrelerinde erken evreye (stage I) kıyasla daha yüksek DDIT4 ifadesi gözlenmiş olmakla birlikte diğer verisetlerinde DDIT4 ifade seviyesi ve kanserin evresi arasında bir ilişki gözlenmemiştir (Şekil 5.3.).



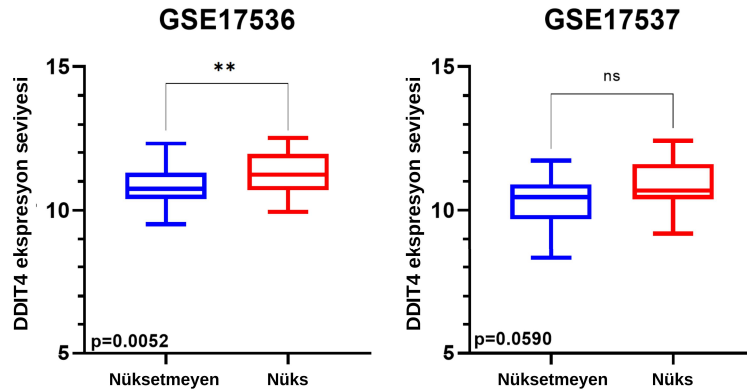
Şekil 5.3. KKK kanser verisetlerinde, DDIT4 geni ve kanser evreleri arasındaki ilişki. Grafikler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuş olup istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiştir (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

Diferansiyasyon bilgisi bulunan verisetlerinde ise farklılaşma derecesi (grade) ile DDIT4 ifade seviyeleri arasındaki ilişki araştırılmış ve diferansiyasyon arttıkça DDIT4 ifade seviyesinin de arttığı gözlenmiştir (Şekil 5.4.).



Şekil 5.4. Artmış DDIT4 ifadesi kolorektal kanserde kötü diferansiyasyon ile ilişkisi. Kolorektal kanser hastalarında DDIT4 ekspresyonu ile tümör diferansiyasyon derecesi (grade) arasındaki ilişki grafikleri, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuş olup istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiştir. (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

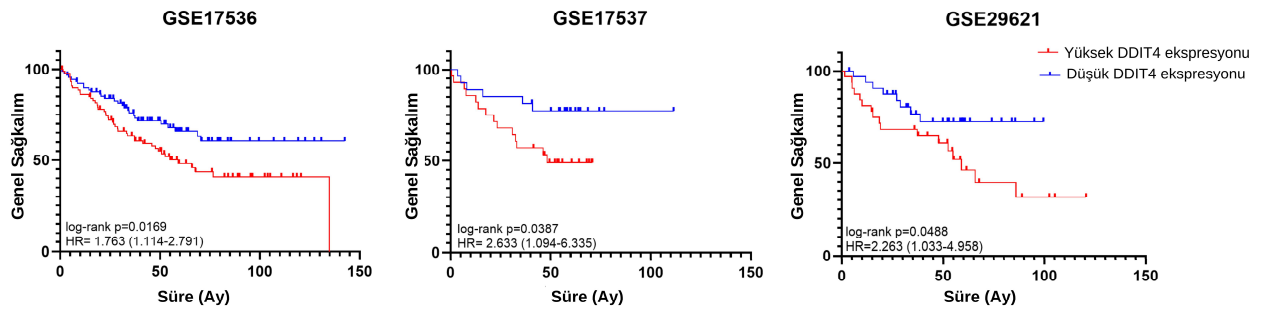
Nüks tümörün agresif fenotiplerinden birisidir ve sıklıkla tedaviye dirençle ilişkilidir. Nüks verisi olan birden fazla bağımsız kolorektal kanser kohortunda yapılan analizlerde, KRK dokusunda artan DDIT4 ekspresyonunun nüks gösteren hastalarda daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 5.5.) GSE17537 verisetinde yapılan analizde elde edilen sonuç istatistiksel olarak anlamlı olmasa da grafik üzerinden veri dağılımlarına bakıldığında, nüks eden grubun diğer gruba göre daha yüksek DDIT4 ifade profili sergilediği görülebilmektedir (Şekil 5.5.).



Şekil 5.5. DDIT4 geni, nüks gözlenen hastalardaki ifade profili. Grafikler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuş olup istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiştir. (ns: $p > 0.005$ (not significant), *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

Bu noktada elde ettiğimiz bu sonuçların klinikte yansımalarını değerlendirebilmek için GSE17536, GSE17537 ve GSE29621 veri setleri üzerinden yüksek DDIT4 ekspresyonunun KRK hastalarının sağ-kalım (survival) oranlarına etkisi de araştırılmış ve DDIT4 geninin

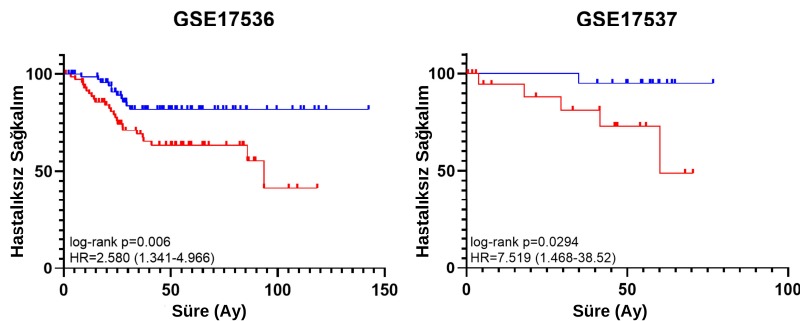
prognostik önemi değerlendirilmiştir. Tez kapsamında genel ve hastalıksız sağkalım bu başlık çerçevesinde analiz edilmiş olup; Graphpad programı kullanılarak (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA) Kaplan-Meier hasta sağkalım grafikleri oluşturulmuştur. Sağkalım bilgisi eksik olan hastaların verileri analize dahil edilmemiştir. DDIT4 ifade düzeylerine göre hastalar “yüksek” ve “düşük” ekspresyon gruplarına ayrılmış, ve orta değerden ayrılmıştır. Sağkalım analizleri, yüksek DDIT4 ifadesi olan hastaların genel sağkalım sürelerinin önemli ölçüde daha kısa olduğunu ortaya koymuş; log-rank testi ile elde edilen istatistiksel sonuçlar $p < 0,05$ düzeyinde anlamlılık göstermiştir. (Şekil 5.6.).



Şekil 5.6. Yüksek DDIT4 ifadesinin hasta genel sağkalımı üzerinde etkisi.

Bağımsız verisetlerinde örnekler DDIT4’ü yüksek ifade eden (kırmızı) ve düşük ifade eden (mavi) olarak gruplandırılarak verilerdeki sağ kalım bilgileri ve yaşam süreleri de kullanılarak sağkalım analizleri gerçekleştirildi.

Hastalıksız geçirilen süre bilgisi olan verilerde ise hastalıksız sağ kalım analizleri gerçekleştirildi. Hastalar, DDIT4 ifade seviyelerine göre düşük ve yüksek olarak iki gruba ayrılarak Kaplan-Meier grafikleri oluşturuldu. Bunun sonucunda, DDIT4’ü yüksek ifade eden hasta grubunun hastalıksız sağkalım sürelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 5.7.). Bu sonuçlar, DDIT4 geninin prognostik bir belirteç olma potansiyelini desteklemektedir.

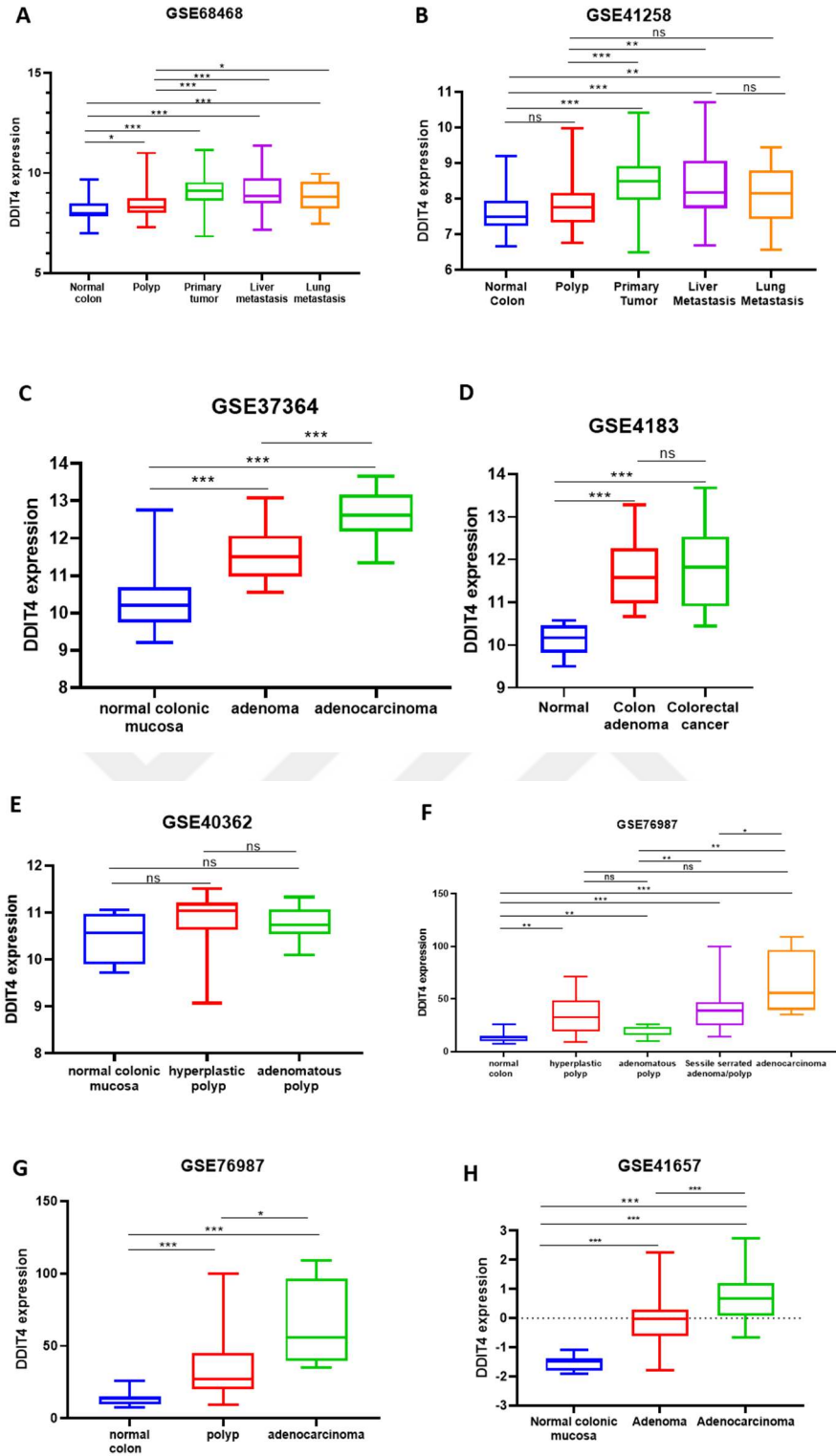


Şekil 5.7. KRK dokusunda yüksek DDIT4 ekspresyonu artan düşük hastalıksız sağ kalım ile ilişkisi.

Kaplan-Meier grafikleri, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuştur. Kırmızı, yüksek DDIT4 ifade seviyesi gösteren hasta grubunu temsil ederken, maviler, düşük DDIT4 ifade seviyesi gösteren grubu ifade etmektedir. (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$)

Kolorektal kanser, çoğunlukla adenomatöz poliplerin zamanla birikmiş genetik değişikliklerle malign bir fenotipe dönüşmesi sonucu gelişmektedir. Bu özelliği, KRK'yı diğer kanser türlerinden ayıran önemli bir avantaj sağlamaktadır: Polip yapılarının erken dönemde saptanarak çıkarılması, kanserleşme riskini ve ilerlemesini anlamlı biçimde azaltabilmektedir. Bu nedenle, KRK için tarama ve önleme yaklaşımları diğer pek çok kanser türüne göre daha etkin ve yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu kapsamda, DDIT4 geninin ifade düzeyinin premalign polip evresinde farklılaşıp farklılaşmadığının belirlenmesi, hem tanı ve önleme stratejileri çerçevesinde hem de polipten primer kanser oluşumuna ilerleyen süreçte prognostik açıdan önem taşımaktadır.

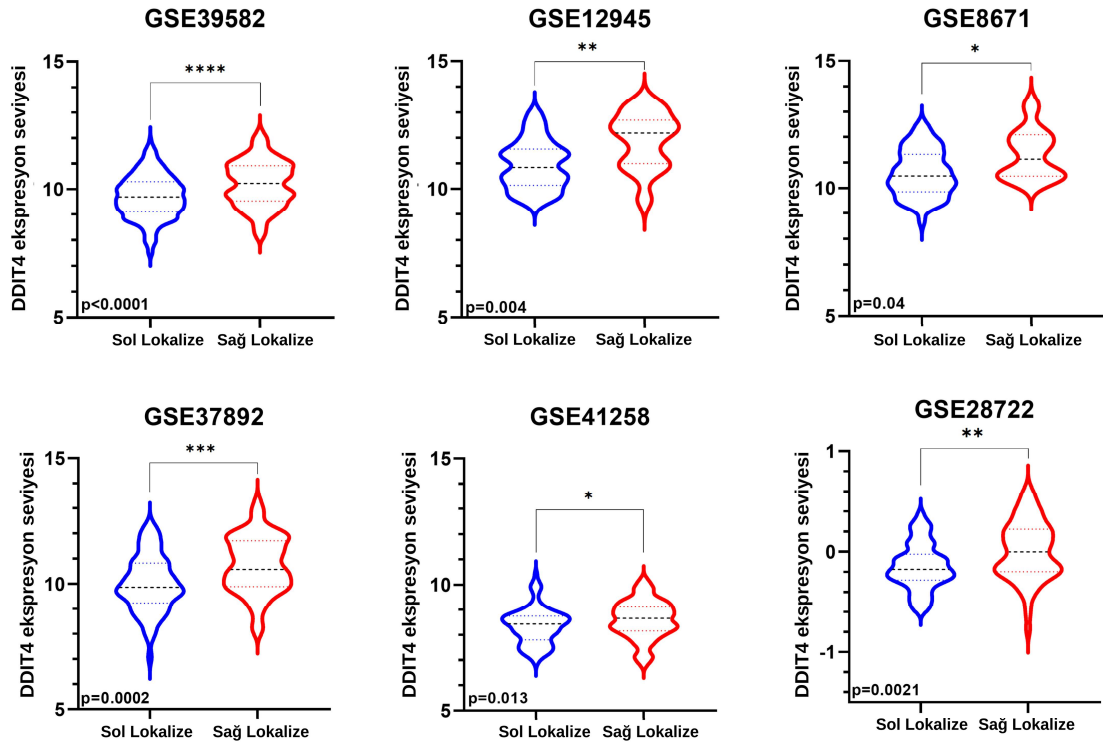
Bu noktadan hareketle, DDIT4'ün ifade seviyesini, polip evresi, primer tümör ve metastatik evrelerde inceleyerek olası bir artış paterni olup olmadığı araştırıldı. Böylelikle, DDIT4 ifadesindeki bir değişimin premalign aşamadan başlayarak ilerleyen süreçte kanser tanı ve prognozuna katkı sağlayacak olası rolü hakkında daha kapsamlı veriler elde edilmesi amaçlandı. Bu verisetlerinde yaptığımız analizde DDIT4 gen ifadesinin genel olarak polip evresinde de normal örneklerle göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek ifadelendiği görülmüştür ($p<0.05$) (Şekil 5.8.A-H.). Ayrıca DDIT4 ifadesi normal doku-polip-primer tümör ilerlemesi boyunca artan bir patern sergilemiştir. Bu da DDIT4 ifadesinin kanserin progresyonu ile ilişkili olabileceğine dair destek ortaya koymuştur. Sonuç olarak bulgularımız; DDIT4 gen ekspresyonunun kolorektal kanserde artmış ifadesinin tümör başlangıcı ve ilerlemesi ile yakından ilişkili olabileceğini, erken teşhis veya hedeflendiğinde önleyici faktör olabileceğini göstermektedir (Şekil 5.8.).



Şekil 5.8. Kolorektal kanser hastalarında DDIT4 ekspresyonunun polip-primer tümör-metastaz sürecindeki seviye değişimi. Grafikler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuş olup istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiştir. (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$)

5.1.3. DDIT4 İFADESİ SAĞ KOLON YERLEŞİMLİ TÜMÖRLER VE BU TÜMÖRLERİN MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ İLE YAKINDAN İLİŞKİLİDİR

Son yıllarda sağ ve sol kolon yerleşimli tümörlerin klinik ve moleküler farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Bu sebeple, lokalizasyon bilgisi bulunan veri setlerinde, DDIT4 ekspresyonu sağ ve sol kolon tümörleri arasında karşılaştırılmıştır. Lokasyona bağlı gruplandırmalar, çekum, çıkan kolon, hepatik fleksura, transvers kolon sağ gruba; splenik fleksura, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum sol gruba dahil edilerek yapıldı. Elde edilen sonuçlarda, 6 verisetinde sağ kolon yerleşimli KRK örneklerinde DDIT4 ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 5.9.).



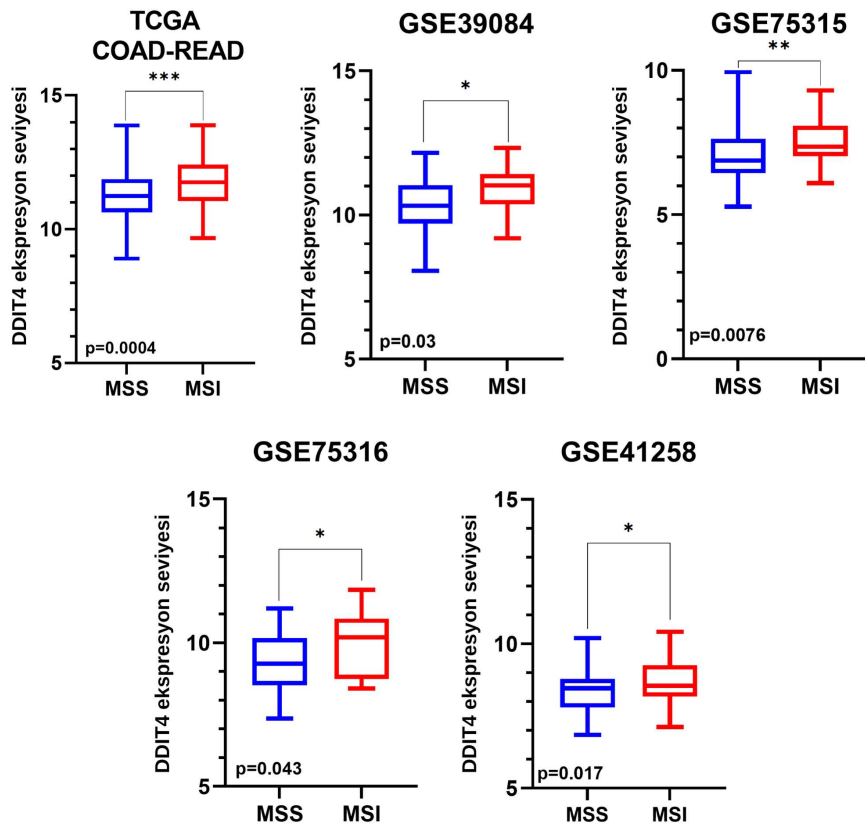
Şekil 5.9. DDIT4'ün kolorektal kanserde yüksek ifadesi tümörün sağ lokalizasyonu ile ilişkisi.

DDIT4 gen ekspresyon seviyesi sağ ve sol kolon hasta doku verilerinde karşılaştırılmıştır. Kırmızı renk sağ kolon yerleşimli hasta örneklerini temsil ederken mavi renk sol kolon yerleşimli hasta örneklerini temsil etmektedir. Grafikler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuş olup istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiştir. (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$, ****: $p<0.0001$).

DDIT4'ün sağ lokalize tümörlerde daha yüksek ifadelendiğini gözlemledikten sonra, DDIT4'ün sağ lokalize tümörlerin moleküler özellikleriyle bir ilişkisi olup olmadığı

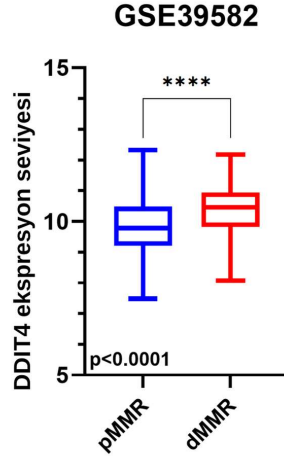
araştırıldı. Bu kapsamda, Şekil 2.3.'te verilen sağ ve sol kolona spesifik bilgileri barındıran verisetlerinde DDIT4 seviyesi ile bu özellikler arasındaki ilişki araştırıldı.

Bu kapsamda ilk olarak, kötü prognoz ile ilişkili olan ve genellikle sağ lokalize tümörlerde gözlenen mikrosatellit kararsızlığının (microsatellite instability, MSI) ve MSI'nın kaynağı olan yanlış eşleşme tamir meknaizması yetersizliğinin (dMMR) DDIT4 ifade seviyesi ile ilişkisi incelendi. Bu noktada; MSI verisi olan kolorektal kanser verisetlerinde DDIT4 ifade seviyesindeki değişim analiz edildi ve toplamda 5 bağımsız verisetinde MSI olan hastalarda (Şekil 5.10.) ve bir verisetinde de MMR yetersizliği olan hastalarda daha yüksek DDIT4 ifadesi olduğu gözlemlendi (Şekil 5.1.).



Şekil 5.10. DDIT4'ün yüksek ifade profili, genellikle sağ lokalize tümörlerde gözlenen mikrosatellit instabilitesi ile ilişkisi.

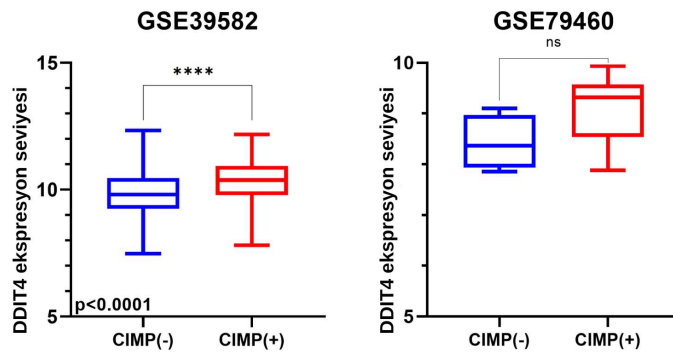
Hastalar, MSI (mikrosatellit instabilitesi olan) ve MSS (mikrosatellit stabil) olmak üzere iki gruba ayrılarak gruplar arası istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiş ve GraphPad Prism 6.0 kullanılarak grafikler oluşturulmuştur. (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$, ****: <0.0001).



Şekil 5.11. DDIT4 gen ifadesinin yetersiz yanlış eşleşme tamir mekanizması (dMMR) görülen hastalardaki seviyesi.

DDIT4 gen ekspresyon seviyesi yanlış eşleşme tamir mekanizması düzgün çalışan (pMMR) ve çalışmayan (dMMR) hasta gruplarında karşılaştırılmıştır. Kırmızı dMMR hasta örneklerini temsil ederken, mavi renk pMMR olan hasta örneklerini temsil etmektedir. Grafikler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuş olup istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiştir. (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$)

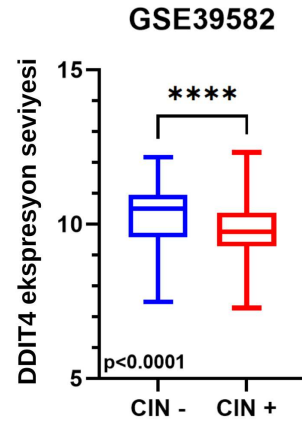
Sağ lokalize tümörlerin diğer bir karakteri ise yüksek CpG adacıkları metilasyon profili (CIMP) göstermeleridir. Bu doğrultuda, CIMP bilgileri bulunan verisetlerinde, CIMP pozitif ve CIMP negative olan örneklerdeki DDIT4 ifade seviyesi karşılaştırılmıştır. Sonucunda, önceki sonuçlarla tutarlı olacak şekilde genel trend olarak sağ lokalize tümörlerin bir karakteri olan pozitif CpG adacıkları metilasyonu ile DDIT4 ifade seviyesinin ilişkili olabileceği görülmüştür (Şekil 5.12.).



Şekil 5.12. DDIT4 gen ifadesinin CpG adacıkları metilasyon fenotipi (CIMP) pozitif olan hastalardaki seviyesi.

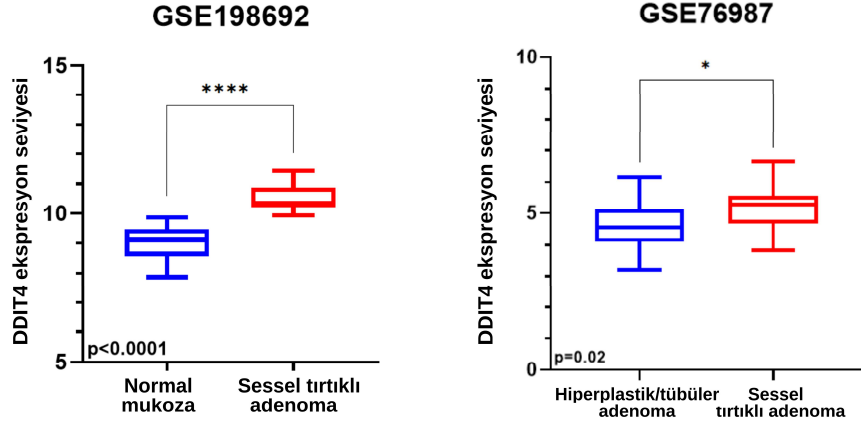
Hastalar CIMP pozitif (kırmızı) ve CIMP negatif (mavi) olmak üzere iki gruba ayrılmış ve istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiştir. (ns: $p > 0.005$ (not significant), *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$)

Sol lokalize tümörler ise kromozomal instabilite (CIN) bakımından zengin bir profil göstermektedir. Sağ lokalizasyon ve sağ tümörlere spesifik özelliklerle ilişkili bulunan DDIT4 yüksek ifade profilinin, sola spesifik bir özellik olan CIN bakımından zengin örneklerde daha düşük ifade profili seviyesi göstermesi beklenmekteydi. CIN bilgisi olan bir verisetinde yapılan analiz sonucu ise beklendiği gibi DDIT4 ifade seviyesinin CIN gösteren örneklerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az olduğu görüldü (Şekil 5.13.).



Şekil 5.13. DDIT4 geninin kromozomal instabilite (CIN) görülmeyen hastalardaki seviyesi. Hastalar CIN pozitif (kırmızı) ve CIN negatif (mavi) olmak üzere iki gruba ayrılmış ve istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiştir. (ns: $p>0.005$ (not significant), *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$, ****: $p<0.0001$)

Serrated yolaktan gelişen çoğu KRK, özellikle sağ kolon yerleşimli sessil serrated poliplerden gelişmektedir. Bu noktada; serrated polip transkriptom verisi olan çalışmalarda DDIT4 gen ifade değişimi incelendi ve sessile serrated adenomlarda, DDIT4 mRNA ekspresyonunun istatistiksel anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 5.14).

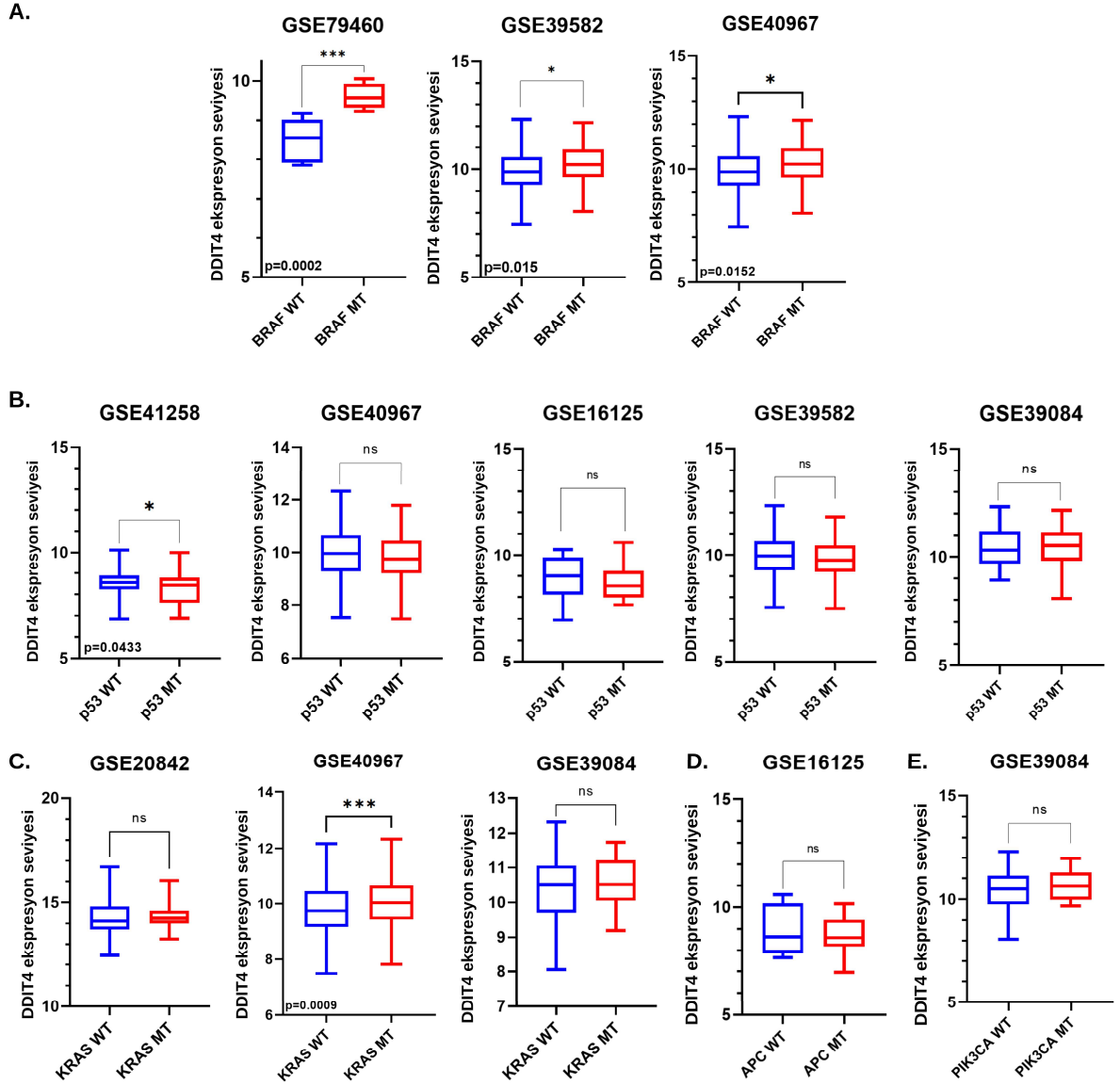


Şekil 5.14. DDIT4'ün, sağ kolon tümörlerin sıklıkla geliştiği sessile serrated adenomlardaki ifadesi.

DDIT4 gen ekspresyon seviyesi sessile serrated adenomlarda normal doku diğer polip çeşitleri ile karşılaştırılmıştır. Grafikler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuş olup istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiştir. (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$, ****: $p<0.0001$)

KRK, heterojen doğası nedeniyle farklı moleküler alt tipler ve çeşitli mutasyon birikimleri sonucunda ilerleme gösteren bir hastalıktır. Literatürde, BRAF mutasyonunun sıklıkla sağ kolon tümörlerinde, KRAS, APC, p53 ve PIK3CA mutasyonlarının ise daha çok sol kolon tümörlerinde yüksek frekansla görüldüğü rapor edilmektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular da benzer bir eğilim göstermiştir.

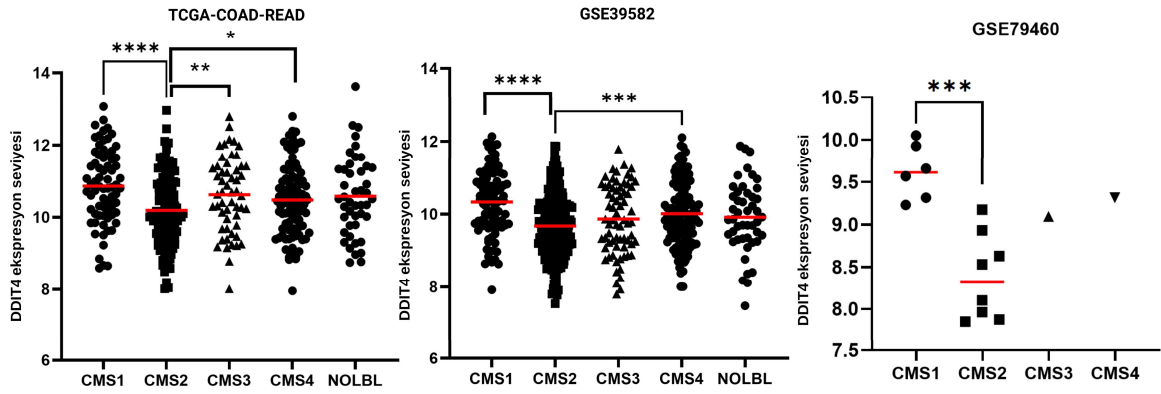
BRAF mutasyonuna sahip hasta örneklerinde DDIT4 gen ekspresyon düzeyinin anlamlı ölçüde yüksek olduğu, 3 bağımsız KRK verisetinde gözlenmiştir (Şekil 5.15.A). Bu sonuç, sağ kolon tümörlerinde gözlenen BRAF mutasyonu ile ilişkili agresif moleküler fenotipin DDIT4 düzeyinde de yansıma bulabileceğini düşündürmektedir. P53 (Şekil 5.15.B), KRAS (Şekil 5.15.C), APC (Şekil 5.15.D) ve PIK3CA (Şekil 5.15.E) mutasyon bilgilerini içeren verisetlerinde ise bu mutasyonlara sahip doku örneklerinde DDIT4 ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgular DDIT4 ekspresyonunun KRK'deki sağ kolon mutasyon spektrumu ile yakından ilişkili olabileceğini doğrulamakta ve DDIT4'ün sağ kolon kanseri için olası bir biyobelirteç potansiyeline işaret etmektedir.



Şekil 5.15. BRAF mutasyon ile DDIT4 ifadesi arasındaki ilişki.

Sağ KRK dokularında daha sık rastlanan BRAF mutasyonu GSE79460, GSE39582, GSE40967 verisetlerinde incelenmiş ve BRAF mutasyonu olan grupta (BRAF MT), DDIT4 ifade seviyelerinin BRAF wild-type (BRAF WT) olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür (A). Sol KRK'de daha sık gözlenen diğer mutasyonlar da incelenmiş ve 4 verisetinde p53 mutasyonu ve DDIT4 arasında anlamlı bir ilişki gözlenmezken bir verisetinde (GSE41258) p53 mutasyonu olan örneklerde DDIT4 ifade seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük bir profil sergilediği görülmüştür (B). Yine sol KRK'de daha sık gözlenen bir diğer mutasyon olan KRAS mutasyonu ile DDIT4 ifade ilişkisine bakıldığında, bir verisetinde (GSE40967) KRAS mutasyonu ve DDIT4 ifade seviyesi ilişkili bulunurken iki verisetinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir sonuç elde edilmemiştir (C). Sol KRK'de yaygın diğer mutasyonlardan olan APC ve PIK3CA mutasyonları ile DDIT4 ilişkisine bakıldığında anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir (D ve E). Grafikler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuş olup istatistiksel anlamlılık 2-yönlü t-testi ile belirlenmiştir (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$)

KRK sınıflandırmasında altın standartları oluşturan ve bu tez çalışmasının “1.1.6. KRK Moleküler Sınıflandırması” başlığı altında ayrıntılı olarak özelliklerine yer verilmiş olan konsensüs moleküler alt tipler ve DDIT4 ifade dağılımı TCGA COAD-READ, GSE39582 ve GSE79460 verisetlerinde incelenmiştir. Yüksek MSI ve CIMP profili sergileyen, BRAF mutasyonu bakımından zengin olan CMS1 alt tipinde DDIT4 ifade seviyesinin diğer tiplere göre daha yüksek bir patern takip ettiği görülmüştür (Şekil 5.16.). CMS1 alt tipi aynı zamanda sol lokalize tümörlerde daha sık rastlanan bir tiptir.



Şekil 5.16. DDIT4 ekspresyonu CMS1 KRK alt grubundaki ifade profili.

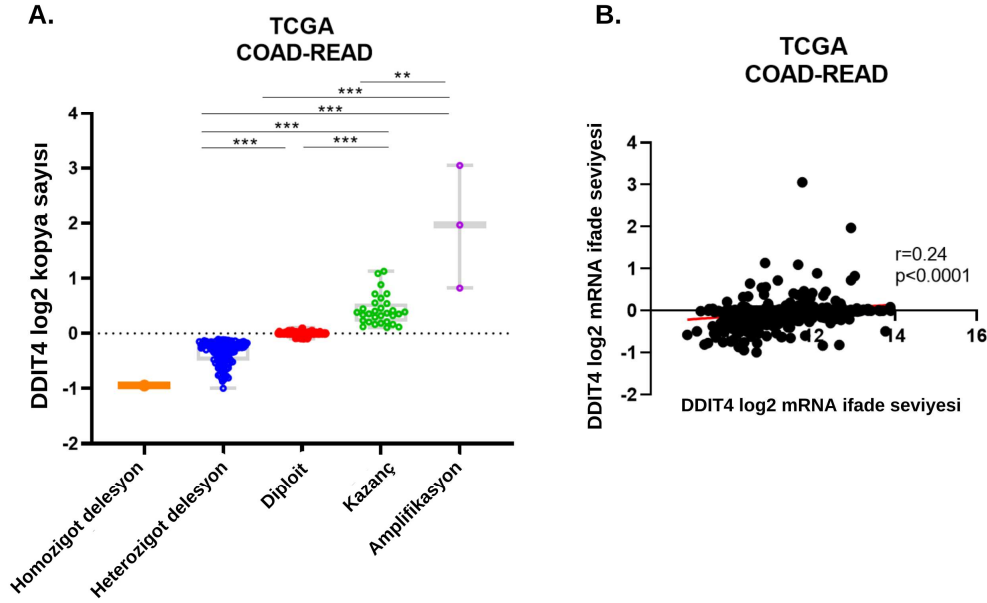
DDIT4 bu grupta istatistiksel olarak daha yüksek bir ifade profili göstermektedir. (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$)

Birbirinden bağımsız KRK verisetlerinde yapılan analizlerde; DDIT4’ün tümör dokularında, normal dokulara kıyasla daha yüksek ifade profili sergilediği görülmüştür. Buna ek olarak, genin yüksek ekspresyon ifadesinin tümör diferansiyasyon derecesi ve genel sağkalım ile ilişkili olduğu da çeşitli verisetlerinde kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar, DDIT4’ün hastalığın kötü prognozuyla ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Lokasyon bilgisi bulunan verisetlerinde lokasyona bağlı yapılan gruplandırmalarda, sağ lokalize tümörlerdeki DDIT4 ifade seviyesinin sol kolona ve rektuma lokalize olmuş tümörlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek ekspres edildiği görülmüştür. Sağ kolorektal kanser tümörlerinin karakterlerinden olan sessil serrated adenomalardan türemeleri, yüksek mikrosatellit instabilitesi, yaygın CpG adacıkları metilasyon fenotipi, yüksek BRAF mutasyon frekansları gibi özellikler ile DDIT4 ilişkisi araştırıldığında, tümör anatomik bölgesiyle ilgili ulaşılan bir önceki sonucu destekler nitelikte tutarlı ve istatistiksel olarak anlamlı ifade artışları gözlenmiştir. DDIT4 geni, sağ lokalize KRK tümörlerinde yüksek ifadenmekte ve sağ lokalize tümörlerin agresif karakterleriyle de istatistiksel olarak ilişkilendirilebilmektedir.

Bunun yanı sıra, sol lokalize KKK tümörlerde daha yaygın bulunan çeşitli mutasyonlar ve artmış kromozomal instabilite ile de bir önceki sonuçları doğrular nitelikte negaif ilişki göstermektedir. Tüm bu bulgular düşünüldüğünde; DDIT4 geni KKK hastalığın prognozunu etkileyen bir molekül olma ve özellikle sağ lokalize tümörlere spesifik, prognostik öngörü sağlayabilecek veya hedeflendiğinde sağ lokalize tümörlerin agresif fenotiplerini etkileyebilecek bir biyobelirteç olma potansiyeline sahip olabilir.

5.1.4. DDIT4 GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİ VE İFADE SEVİYESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

DDIT4 geni birçok KKK veri setinde tümör örneklerinde yüksek ifade profili göstermektedir. DDIT4'nin genetik değişikliklerinin ve belirlenen kopya sayısı değişikliklerinin araştırılması için cBioPortal veri tabanından yararlanılmıştır. TCGA KKK verilerinde yapılan incelemelerde, DDIT4'ün en çok amplifikasyon ve sonrasında kazanç (gain) şeklinde kopya sayısı artışı yaşadığı görülmüştür (Şekil 5.17.A). Bu durum ifade seviyesindeki artışın amplifikasyon ve gain sebebiyle olabileceğini düşündürmektedir. Pearson korelasyon analizi sonucunda da kopya sayısı değişiklikleri ile mRNA değişimleri arasında anlamlı ama zayıf bir korelasyon görülmüştür (Şekil 5.17.B). CNV (kopya sayısı varyasyonu) artışının DDIT4 mRNA ekspresyonuna güçlü bir şekilde yansımadığı, DDIT4 gen ekspresyon regülasyonunun genetik değişikliklerle sınırlı olmadığını; epigenetik, transkripsiyonel veya post-transkripsiyonel düzeyde farklı mekanizmaların da rol oynayabileceğini göstermektedir.



Şekil 5.17. KRC’da DDIT4 ekspresyonu ile CNV’ler arasındaki ilişki.

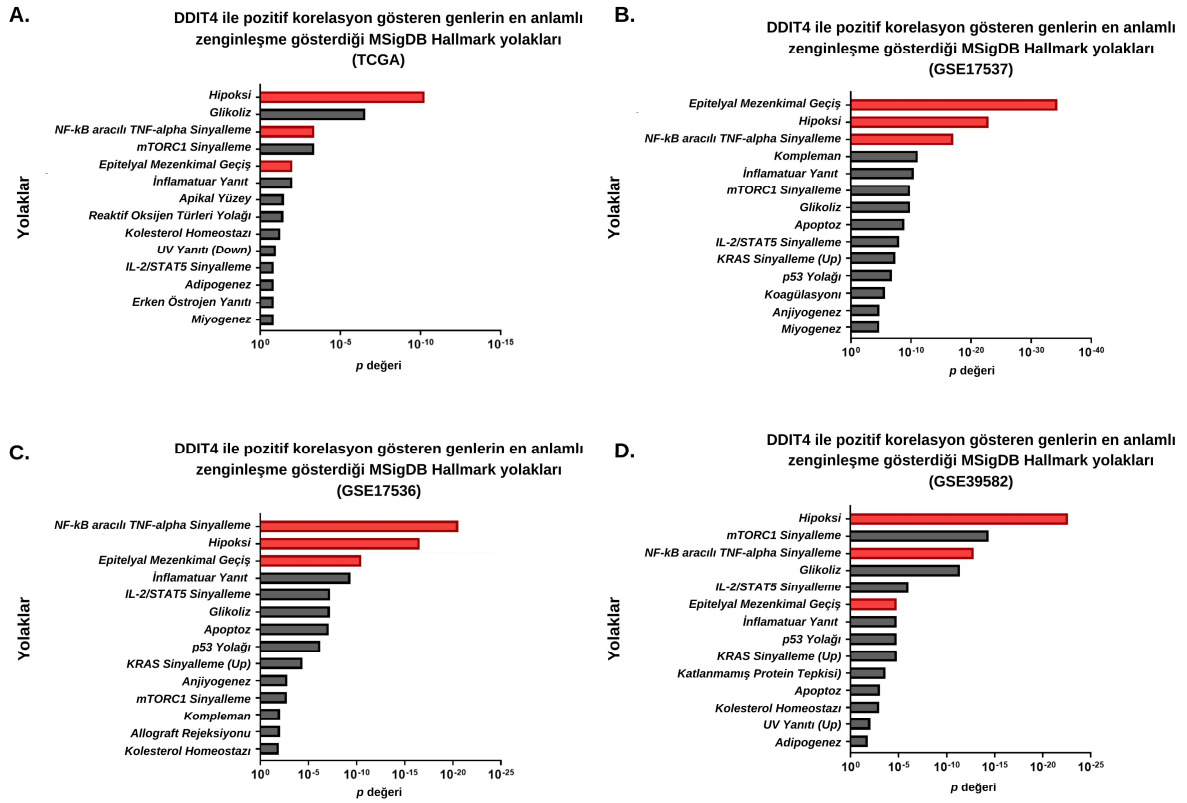
A. Gen amplifikasyonun diğer kopya sayısı değişimlerinden daha fazla olduğu görülmüştür (B). CNV ile DDIT4 gen ifadesi arasında pearson korelasyon analizi yapılmış ve istatistiksel olarak anlamlı ama düşük bir korelasyon ($r=0.24$) gözlenmiştir. (*: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$)

5.1.5. DDIT4 GENİ; MTOR, P53 SİNYAL YOLAĞI, HİPOKSİ, İNFLAMASYON İLE İLİŞKİLİ BİYOLOJİK SÜREÇLER ÜZERİNDEN KOLOREKTAL KANSER GELİŞİMİ VE İLERLEMESİNDE ETKİ EDEBİLİR

Bu noktaya kadar olan bulgulara; DDIT4’ün tümör örneklerinde yüksek ifade profiline sahip olduğu ve bazı agresif KRC karakterleriyle ilişkili olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda bir diğer analizimiz; DDIT4 geninin KRC patogenezindeki rolleri, karsinogenez sürecinde hangi genler ile etkileşim içinde olduğunu ve bu genlerin hangi yolaklarda GSE17536, GSE17537, GSE39582 ve TCGA-COAD/READ verileri kullanılarak excel üzerinden “pearson correlation” analizi gerçekleştirilmiş ve aday genlerimiz ile gen ifadesi açısından korelasyon gösteren genler transkriptom verileri üzerinden belirlenmiştir. Analizde r değeri için eşik değeri $+0.6/-0.6$ kullanılmış olup; istatistiksel anlamlılıkta da $p<0.05$ kullanılmıştır. DDIT4 ile korele bir şekilde yüksek ifade gösteren genler belirlenmiş ve bu genler üzerinden EnrichR online aracı kullanılarak MSigDB Cancer Hallmark yolak analizi yapılmış ve DDIT4’nin KRC’de tümörögenezisdeki rollerine dair yeni kanıtlar elde edilmiştir. Analiz sonucunda, GSEA analizleri ile uyumlu sonuçlar elde edilmiş olup; DDIT4 ile pozitif korelasyon gösteren

genlerin dört ayrı KRK veri setinde hipoksi yolağında zenginleşmesi dikkat çekmiştir. (Şekil 5.18.). Bu sonuçlarda, EMT ve NF-kB aracılı TNF-alpha KRK'de DDIT4'ün metastaz ve invazyon ile ilişkisi olabileceğini göstermektedir. Çünkü bu iki yolak da hali hazırda hücre göçünde rol aldığı bilinen yolaklardandır. Bu sonuçlarda, hipoksi yanıtı da hücrelerin stress adaptasyonunu ve dolayısıyla sağ kalımını arttıran bir etkiye sahip olabilir.

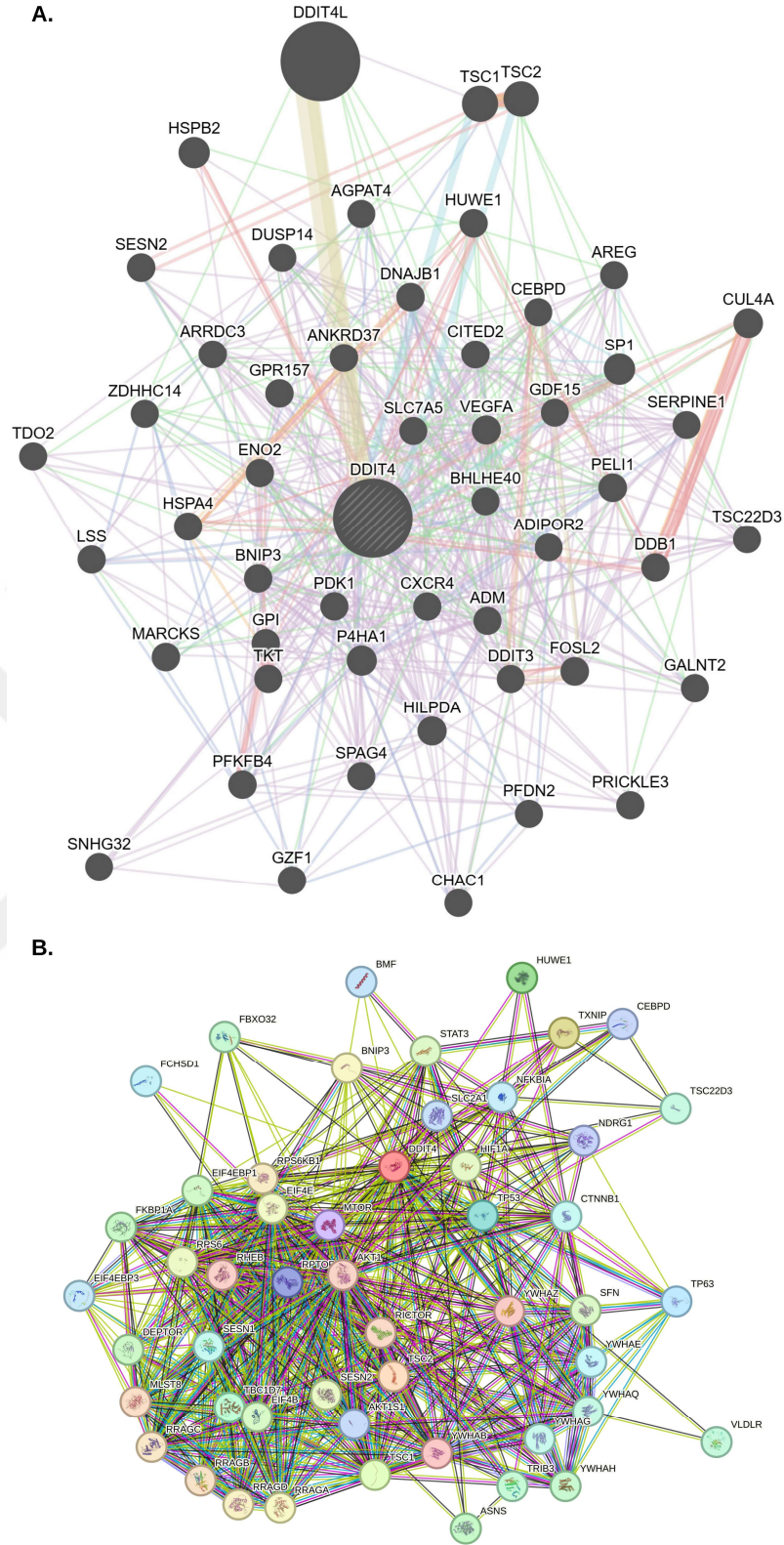


Şekil 5.18. Omik verisetlerin DDIT4 ile yapılan korelasyon analizleri.

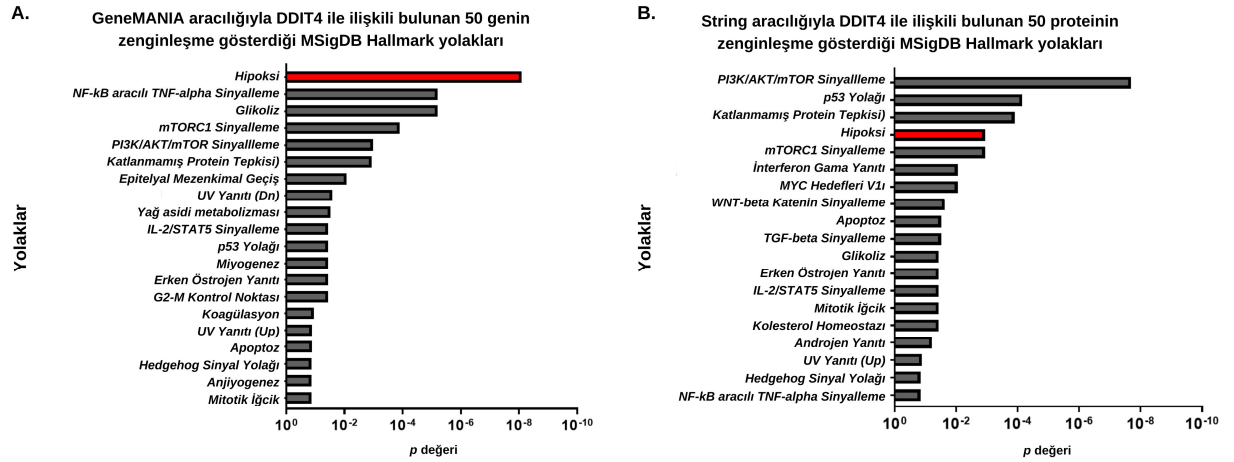
TCGA-COAD/READ (A), GSE17537 (B), GSE17536 (C) ve GSE39582 (D) verisetlerinde yapılan pearson korelasyon analizleri sonucunda DDIT4 ile pozitif korelasyon gösteren genler ($r > 0.6$) belirlenmiş ve EnrichR aracılığı ile yolak analizleri yapılmıştır. EnrichR üzerinden $p < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edilerek yolak listesi elde edilmiş ve grafikler GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuştur.

Kolorektal kanserde potansiyel olarak kritik rolü olabileceği düşünülen DDIT4 geninin fonksiyonel etkileşim ağını daha derinlemesine incelemek amacıyla, iki farklı biyoinformatik araç (GeneMANIA ve STRING) kullanılarak in silico analizler gerçekleştirilmiştir. Böylece, DDIT4 ile ilişkili gen ve protein etkileşim ağı ortaya konmuştur (Şekil 5.19.).

GeneMANIA, büyük ölçüde transkript düzeyindeki ortak ekspresyon (co-expression) ve genetik etkileşim verilerine dayanan, gen odaklı bir perspektif sunarken STRING aracı protein odaklı ve protein-protein etkileşim ağını ortaya koymaktadır. İki araçtan da elde edilen gen ve protein listeleri ayrı ayrı EnrichR aracılığıyla yolak analizine sokulmuştur. GeneMANIA transkripsiyonel boyutta DDIT4 ile paralel ifade profili sergileyen genlerin listesini verirken, STRING aracı DDIT4'ün daha fonksiyonel boyuttaki etkileşimlerini verdiği için iki listeden de elde edilecek yolak analiz sonuçları DDIT4'ün hangi hücre içi mekanizmada nasıl bir önem barındırdığına dair önemli bir kaynak olacaktır. Bu doğrultuda yapılan analizler sonucu iki listenin de hipoksi, p53, mTORC1 gibi önemli yolaklarda ortak olarak zenginleşme gösterdiği görülmüştür (Şekil 5.20.). Bazı yolaklar ise transkriptomik ve proteomik boyutta farklılık göstermektedir ve bu noktada DDIT4'ün fonksiyonel mekanizmasını anlamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 5.19. GeneMANIA tarafından belirlenen gen-gen etkileşim ağı (A) ve STRING'den türetilen protein-protein etkileşim ağı (B).



Şekil 5.20. GeneMANIA ve STRING yolak analizleri.

GeneMANIA (A) ve STRING (B) aracılığıyla elde edilen gen ve protein listelerinin EnrichR üzerinden $p < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edilerek yolak listesi elde edilmiş ve grafikler GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuştur.

5.2. DDIT4 YÜKSEK İFADESİNİN KRK HASTA DOKULARINDA ARAŞTIRILMASI

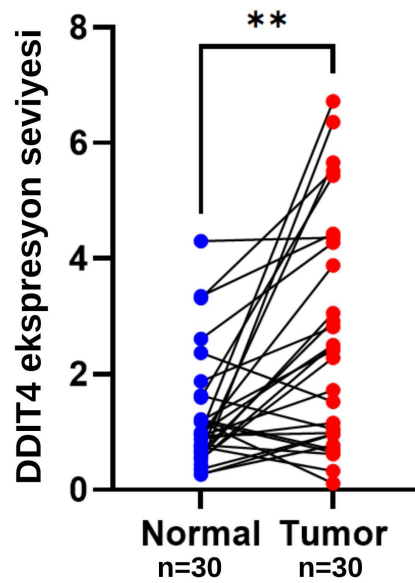
5.2.1. DDIT4 İFADESİNİN TAZE DONDURULMUŞ TÜMÖR VE EŞLİ NORMAL DOKULARINDA RNA SEVİYESİNDE İNCELENMESİ

Bu çalışmanın bir parçası olarak, literatür ve biyoinformatik analizlerle aday gen olarak belirlenen DDIT4'ün kolorektal kanser (KRK) dokularında artan ifadesinin deneysel doğrulaması (validasyonu) amacıyla gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, toplam 30 KRK hastasından elde edilen tümör dokusu ($n=30$) ve eş zamanlı (matched) normal dokular ($n=30$) olmak üzere toplam 60 biyolojik örnek incelenmiştir.

Her bir örnek için RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, Nanodrop spektrofotometresi ile RNA konsantrasyon ve saflık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçülen RNA konsantrasyonlarının, qRT-PCR deneyleri için yeterli düzeyde olduğu belirlenmiştir. Saflık değerlendirmesinde kullanılan 260/280 ve 260/230 oranları da Ek 3'te gösterildiği üzere beklenen aralıklarda bulunmuş ve tüm örneklerin nitelik ve nicelik açısından uygun olduğu saptanmıştır. Bu sayede, örneklerin tamamının ileri gen ifade analizlerinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

qRT-PCR yoluyla elde edilen Ct (cycle threshold) değerleri, $\Delta\Delta Ct$ yöntemine göre analiz edilmiş ve kat artışı (fold change) değerleri hesaplanmıştır. Eşli normal dokular referans grup olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) kullanılarak değerlendirilmiş; $p < 0,05$ düzeyinde anlamlılık kabul edilmiştir.

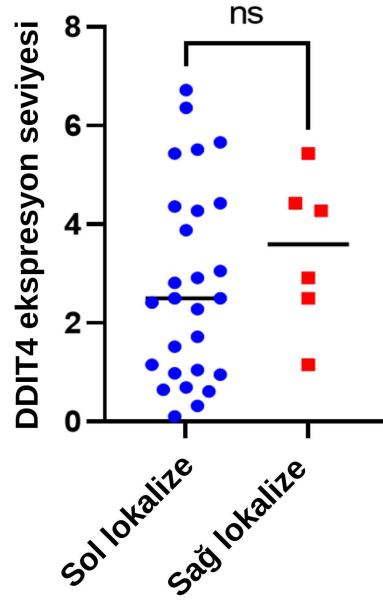
DDIT4 ifadesi, tümör dokularında normal dokulara kıyasla anlamlı derecede artmıştır (Şekil 5.21.) Biyoinformatik analizlerle saptanan DDIT4'ün yüksek ifade düzeyi, çalışma kapsamında toplanan KRK hasta ve eşli normal doku örneklerinde de qRT-PCR ile doğrulanmıştır.



Şekil 5.21. DDIT4'ün tümör dokularında qRT-PCR ile validasyonu.

DDIT4'ün artmış gen ifade seviyesinin tez kapsamında toplanan kolorektal kanser hasta ve eşli normal doku örneklerinde qRT-PCR ile validasyonu yapılmıştır. Sonuçlar eşli normal dokulara kıyaslanarak gösterilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır. ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, ns istatistiksel olarak anlamlı değil).

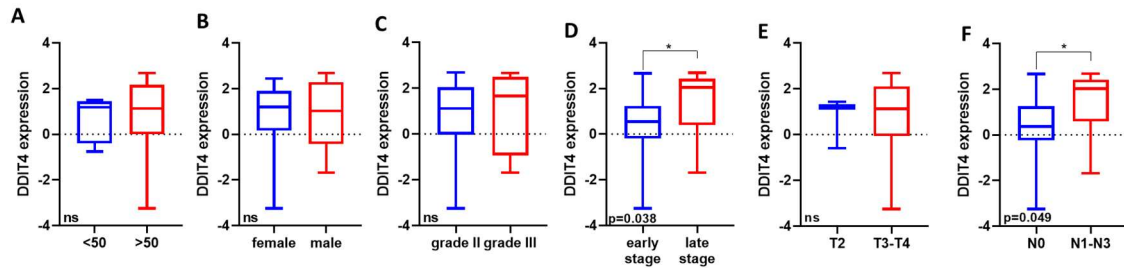
Biyoinformatik analizlerde bulunan DDIT4 ve sağ yerleşimli kolorektal kanserin ilişkisi tez kapsamında toplanan taze dondurulmuş dokulardan oluşturulan 30 tümör örneği içeren kohortta da çalışıldı. Yapılan analizler sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı. Ancak, sağ lokalize tümörlerin (5) sol lokalize tümörlere (25) göre daha az sayıda olmasına rağmen grafik üzerinde sağ lokalize tümörlerdeki DDIT4 ifade seviyesinde bir artış motifi gözlenebilmektedir.



Şekil 5.22. DDIT4'ün artmış gen ifade seviyesinin tez kapsamında toplanan kolorektal kanser hasta doku örneklerinde sa-sol kolon qRT-PCR ile karşılaştırması.

Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır. $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, ns istatistiksel olarak önemli değil (not significant) olarak ifade edilmiştir.

DDIT4 için çalışma kohortunda gen ifade seviyesinin durumu yine yaş, cinsiyet, tümör derecesi ve evresi ile tümör derinliği (T evre), Nod sayısında (N evre) da ayrıca değerlendirdik. Bu analiz sonucunda DDIT4 ekspresyonunun ileri evre kanser hastalarında istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.23.). Daha büyük tümör boyutuna sahip T3&T4 grubunda anlamlı bir değişiklik olmaz iken; yüksek DDIT4 ekspresyonunun artmış lenf nodu sayısı (N1-N3'e karşı N0) (Şekil 5.23.F) ile ilişkili olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).



Şekil 5.23. Artmış DDIT4 ifadesi kolorektal kanser hastalarında ileri evre ve ileri N evre ile korelasyonu.

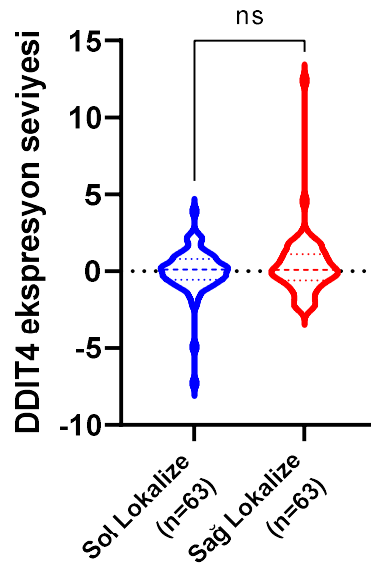
Kolorektal kanser hastalarında DDIT4 ekspresyonu ile (A) yaş, (B) cinsiyet, (C) tümör derecesi (D) TNM evresi, (E) tümör derinliği ve (F) lenf nodu sayısı arasındaki ilişki. Grafikler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuştur. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

5.2.2. DDIT4 İFADESİNİN FFPE TÜMÖR DOKULARINDA RNA SEVİYESİNDE İNCELENMESİ

Bu çalışmada, daha önce Sülgün Charyeva tarafından “Kolonel Kanserde Aday Prognostik Biyobelirteçlerin Arşiv Materyallerinde Doğrulanması” (Charyeva, 2021) başlıklı tez kapsamında toplanan formalinle fikse, parafine gömülmüş (FFPE) dokulardan sentezlenen cDNA örnekleri, DDIT4 gen ifadesinin sağ/sol kolon yerleşimi ile ilişkisini araştırmak amacıyla qRT-PCR analizinde kullanılmıştır. Toplamda 63 sağ ve 63 sol kolorektal kanser örneği incelenmiştir; elde edilen Ct değerlerinden $\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle kat artışı (fold change) verileri hesaplanmıştır.

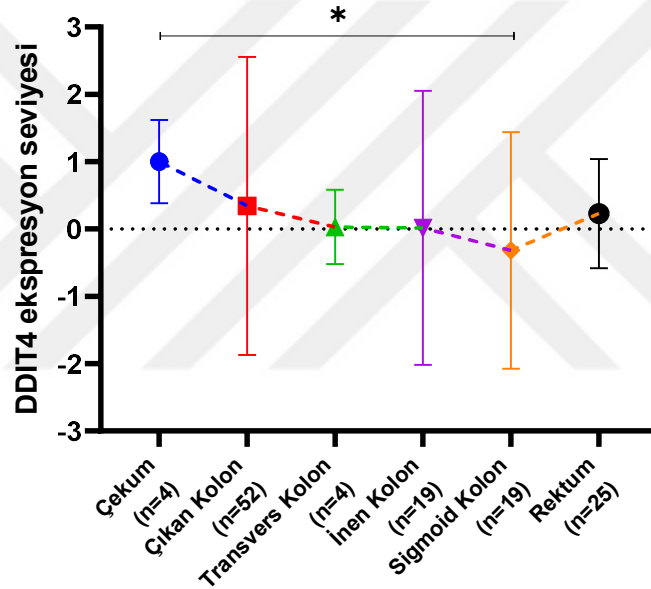
İlk olarak, sağ (n=63) ve sol (n=63) kolon tümörlerinden elde edilen cDNA örneklerinde DDIT4 ekspresyonu karşılaştırılmıştır. Sağ yerleşimli tümörlerde genel olarak beklenen trend görülmekle birlikte hesaplanan ekspresyon değerleri, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>0,05$) (Şekil 5.24.).

Kolon (sağ+sol) ve rektum tümörleri arasında da benzer bir karşılaştırma yapılmış; DDIT4 ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$). Aynı şekilde sağ-sol-rektum şeklinde üçlü gruplandırmada da belirgin bir ifade farklılığı saptanmamıştır.



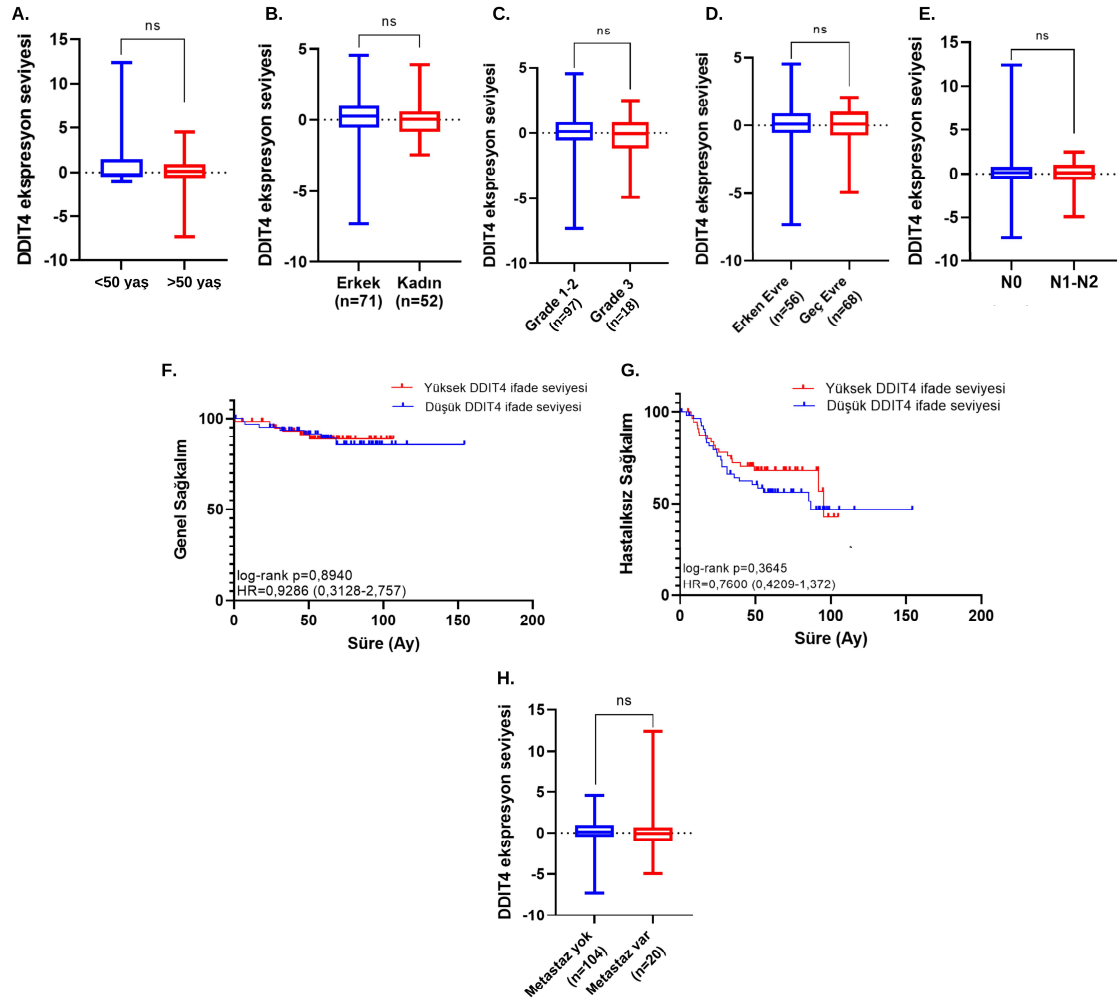
Şekil 5.24. KRK hastalarına ait FFPE doku örneklerinden elde edilen cDNA’larda yapılan qRT-PCR çalışması.

Daha ayrıntılı bir lokalizasyon analizi için, örnekler Şekil 2.3.B.'de verildiği gibi rektum, çıkan kolon, inen kolon, çekum, transvers kolon ve sigmoid kolon gibi spesifik anatomik segmentlere göre yeniden gruplandırılmıştır. Bu alt gruplar arasında yapılan istatistiksel analizler, yalnızca çekum ve sigmoid kolon lokalizasyonları arasında yapılan t-test sonucunda; çekumda yer alan örneklerin DDIT4 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış ($p<0,05$) olduğunu göstermiştir. Diğer segmentler arasında yapılan ikili karşılaştırmalar veya ANOVA testi sonucu ise ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Söz konusu çekum örneklerinde DDIT4 ekspresyonunun yükselmiş olması, sağ kolon alt bölgesi içerisinde daha spesifik bir konumun biyolojik olarak farklı bir mikroçevreye veya moleküler imzaya sahip olabileceğini akla getirmektedir.



Şekil 5.25. DDIT4 sağ kolonun segmentlerinden çekumdaki ifade seviyesi

Aynı FFPE örnek kohortunda, klinik verileri mevcut olan hastaların hastalıksız sağkalım (DFS) ve genel sağkalım (OS) süreleri, DDIT4 yüksek ve düşük ifade grupları arasında karşılaştırılmış; ancak istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir ($p>0,05$). Benzer şekilde, tümörün evre (stage) ve grade bilgileri ile DDIT4 ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanamamıştır. Ayrıca, nüks veya metastaz durumu değerlendirildiğinde de DDIT4 ifadesinin bu klinik parametrelerle tutarlı biçimde ilişki göstermediği gözlenmiştir ($p>0,05$) (Şekil 5.26.).



Şekil 5.26. Artmış DDIT4 ifadesi kolorektal kanser hastalarında farklı parametrelerle korelasyonu.

Kolorektal kanser hastalarında DDIT4 ekspresyonu ile (A) yaş, (B) cinsiyet, (C) tümör derecesi (D) TNM evresi, (E) lenf nodu sayısı arasındaki ilişki. Grafikler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak oluşturulmuştur. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. Sağ kalım bilgisi olan hastalarda genel sağ kalım (F) ve hastalıksız sağ kalım (G) Kaplan-Meier grafikleriyle incelenmiştir. Metastaz bilgisi olan hastalar metastaz bakımından değerlendirilmiş (H),

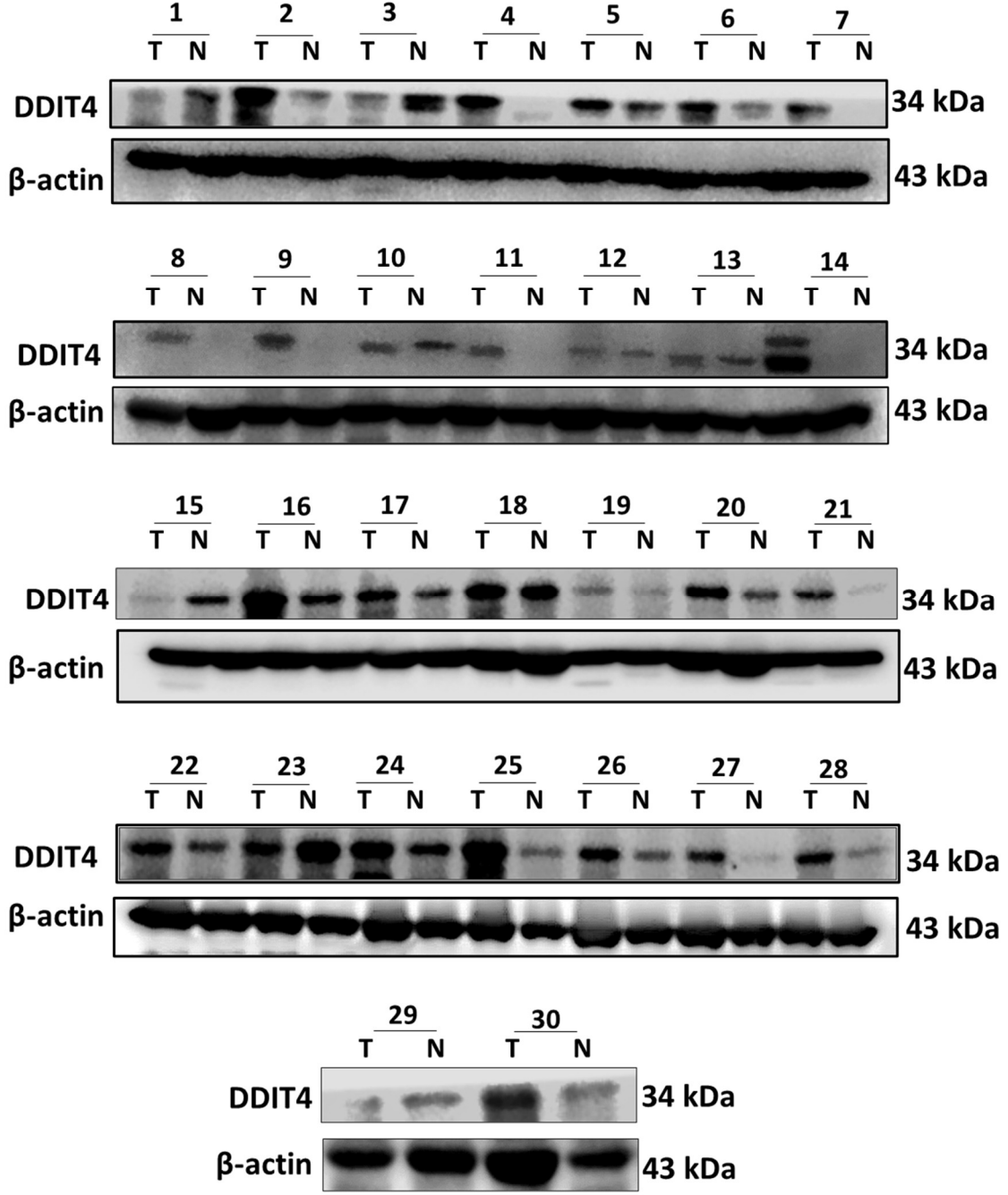
5.2.3. DDIT4 İFADESİNİN TAZE DONDURULMUŞ TÜMÖR VE EŞLİ NORMAL DOKULARINDA PROTEİN SEVİYESİNDE İNCELENMESİ

Bu çalışmada, DDIT4 geninde saptanan yüksek transkript seviyelerinin protein düzeyinde de doğrulanabilmesi amacıyla Western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, toplam 30 kolorektal kanser (KRK) hastasından elde edilen tümör (n=30) ve eşli normal (n=30) taze dondurulmuş doku örneklerinden toplam 60 örneğin protein izolasyonu başarıyla tamamlanmıştır. Proteomik analizlere uygun olarak gerçekleştirilen izolasyon

protokolü sonucunda elde edilen proteinler, protein konsantrasyonu ölçümleri ile değerlendirilmiş (Ek 4); tüm örneklerin Western blot çalışması için yeterli ve nitelikli olduğu belirlenmiştir.

Şekil 5.27.'de, 01-30 numaralı tümör ve ilgili eşli normal doku örneklerinden elde edilen protein lizatlarının Western blot sonuçları görülmektedir. Her bir hastaya ait tümör örneği, ilgili eşli normal dokuyla birlikte “tümör-normal” ikilisi şeklinde yüklenmiş ve aktin protein seviyeleri, yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. DDIT4 bant yoğunluklarının, normal dokulara kıyasla tümör örneklerinde belirgin bir artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Her bir örnekte genel olarak doku örnek materyali de düşünüldüğünde aktin miktarı benzer düzeyde saptanmış, böylece yükleme miktarları arasında önemli farklılık olmadığı görülmüştür.





Şekil 5.27. DDIT4 proteini western blot görüntü sonuçları.

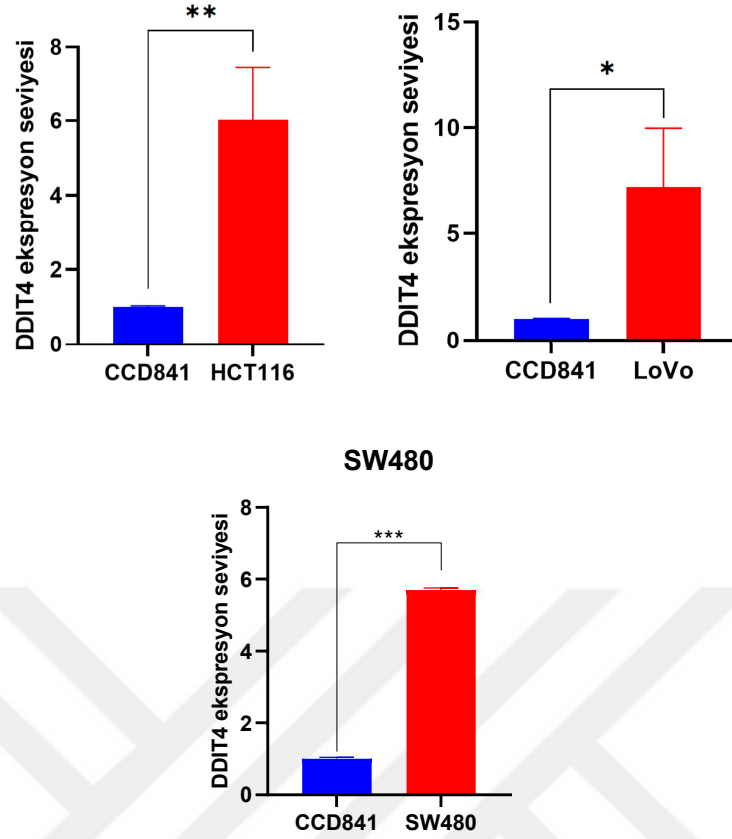
Tümör-eşli normal sırası takip edilerek yüklenmiştir. Housekeeping olarak beta-actin tercih edilmiş ve her bir örneğe ait beta-actin bantları, ilgili örneğin altında verilmiştir. Hedef protein DDIT4 34kDA'da bant verirken referans protein beta-actin ise 43 kDa'da görüntülenmiştir.

5.3. DDIT4 YÜKSEK İFADESİNİN KRK VE NORMAL EPİTEL HÜCRE SERİLERİNDE VALİDASYONU

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen biyoinformatik analizler ve toplanan hasta dokularında DDIT4'ün KRK tümör örneklerinde sağlıklı örneklerle göre daha yüksek ifade profili sergilediği görülmüştür. Bu bulguları valide etmek amacıyla, DDIT4 ifade seviyesi normal epitel hücre ve 3 farklı KRK hücre serisinde hem RNA hem de protein seviyesinde incelendi.

5.3.1. DDIT4 İFADESİNİN HÜCRE SERİLERİNDE RNA SEVİYESİNDE İNCELENMESİ

Hücre serilerinden izole edilen RNA'lar üzerinde yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda, DDIT4'ün HCT116, SW480 ve LoVo kolorektal kanser hücre hatlarında, sağlıklı kontrol CCD841'e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek ifade profili sergilediği görülmüştür. Veriler istatistiksel olarak ΔCt düzeyinde analiz edilmiş, sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak gösterilmiştir (Şekil 5.28).

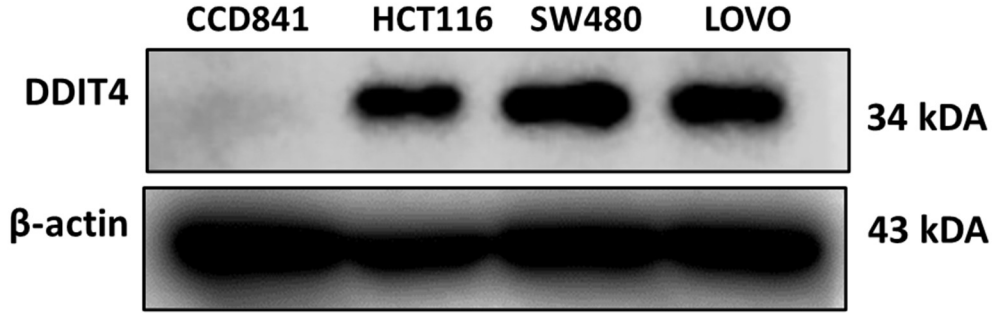


Şekil 5.28. DDIT4'un KRK hücre serileri (HCT116, LoVo ve SW480) ve sağlıklı kontrol kolon hücre serisindeki (CCD841) ifade seviyesi.

DDIT4 ifade seviyesinin HCT116, LoVo ve SW480'de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek ifade profili sergilediği görülmüştür. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$, ns: not significant (anlamlı bir değişim gözlenmemiştir))

5.3.2. DDIT4 İFADESİNİN HÜCRE SERİLERİNDE PROTEİN SEVİYESİNDE İNCELENMESİ

Hücre serilerinden izole edilen proteinlerle yapılan western blot analizi sonucu, DDIT4'ün HCT116, SW480 ve LoVo kolorektal kanser hücre hatlarında, sağlıklı kontrol CCD841'e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek ifade profili sergilediği görülmüştür. SW480 KRK hücre hattında ise normale kıyasla anlamlı bir ifade değişimi görülmemiştir. Veriler istatistiksel olarak ΔCt düzeyinde analiz edilmiş, sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak gösterilmiştir (Şekil 5.29.).



Şekil 5.29. Kolorektal kanser (HCT116, SW480, LOVO) ve normal kolon epitel hücrelerinde (CCD841) DDIT4 western blot çalışması.

Proteinler hiçbir uygulama olmayan kültürdeki hücrelerden izole edilmiş ve Western blot yöntemiyle incelenmiştir. Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Hedef protein DDIT4 34kDa'da bant verirken referans protein beta-actin ise 43 kDa'da görüntülenmiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

DDIT4 geni, DNA hasarı ve hipoksi gibi farklı stres koşullarına yanıt olarak ifade edilen bir gen olarak kanser araştırmalarında giderek daha fazla ilgi çekmektedir. Meme, akciğer, prostat, glioblastoma ve renal hücreli karsinom gibi çeşitli solid tümörlerde normal dokulara kıyasla artmış DDIT4 ekspresyonu; hipoksik tümör mikroçevresi ve tedavi direnci gibi süreçlerle ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde, akut miyeloid lösemi (AML) ve bazı lenfoma türlerinde de DDIT4 seviyelerinin yüksek olduğu, hastalık ilerlemesi ve kemoterapiye direnç açısından önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (109). Öte yandan, bazı kanser tiplerinde, örneğin özofagus kanserinde, DDIT4 seviyesinde artış iyi prognozla ilişkilendirilmektedir (109). Ek olarak, DDIT4 mTOR sinyalini baskılayarak hücre proliferasyonunu yavaşlatması ve apoptozu tetiklemesi sayesinde zaman zaman anti-tümör etki de sergileyebilmektedir (110). Bu farklı sonuçlar, DDIT4 ekspresyonunun ve prognostik öneminin kansere bağlı olarak büyük ölçüde değişebildiğini, ayrıca DDIT4'ün her bir kanserdeki benzersiz rolünün daha ayrıntılı olarak belirlenmesi gerektiğine işaret etmektedir.

Kolorektal kanser özelinde ise DDIT4 ifadesi ve biyobelirteç ile terapötik potansiyeli üzerindeki bilgiler sınırlı düzeydedir. Doğrudan KRK ve DDIT4 üzerinde sadece 2 çalışma mevcuttur ve aynı gruba aittir. 2021 yılında yayınlanan bu 2 çalışmanın ilkinde Fattahi ve ark., KRK üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, KRK'de disregüle çeşitli RNA'lar (mRNA, miRNA ve long non-coding RNA) biyoinformatik yöntemlerle belirlenmiş, qRT-PCR ile hasta dokularında ve kanser kök hücrelerinden türetilen sferoidlerde doğrulanmış ve bu RNA'ların ekspresyon seviyeleri ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Biyoinformatik analizler kapsamında DDIT4, TPTEP1 ve miR-181d-5p ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenirken, SULF1 ve miR-148b-3p seviyeleri KRK dokularında azalmış olarak saptanmıştır.(111). Yine aynı ekibin yine benzer şekilde yaptığı ve KRK'da farklı ifade edilen genlerin tespiti ile başladıkları çalışmada devamında yüksek ifade edilen genler üzerinde gerçekleştirdikleri PPI-network analizleri ile 29 geni, ortak olarak yukarı düzenlenmiş DEG'lerin hub genleri olarak sonraki analizler için belirlemişlerdir. Devamında bu 29 gen üzerinden gerçekleştirdikleri KEGG ve gen ontoloji analizleri sonucu 3 aday gen (MET, DDIT4, ve SERPINB5) belirlemişler; ancak yeterince

sağlam olmayan bir gerekçe ile DDIT4 genini aday belirteç olarak seçmişlerdir. Çalışmada; 198 KRK ve 39 bitişik normal dokusunda yapılan immünohistokimya çalışmaları sonucunda DDIT4'ün nükleer ekspresyonunun tümör - normal dokular arasında, evre 2 - 3 arasında ve grade 1 - 2 arasında anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, DDIT4 ifade seviyesinin sağ kalım ile herhangi bir ilişkisi bulunamamıştır. Çalışmada DDIT4'ün nükleer ifadesinin prognoz üzerinde etkisi olabileceği öne sürülse de çekirdekte etki ettiği mekanizmaların tam olarak bilinmediğinden ve DDIT4'ün prognostik öneminin vurgulanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğundan bahsedilmiştir (15). DDIT4 ve KRK hücreleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise hipoksik şartlar altında DDIT4'ün dolaylı olarak HIF1 α birikimini arttırarak hücrelerde otofaji aracılı hayatta kalma mekanizmasında görev alarak kanser hücrelerinin sağ kalımını arttırdığı belirtilmiştir (112).

Görüldüğü üzere kanserde DDIT4'ün farklı rolleri, kanser spesifik etkilerinin değişkenlik gösterebilmekte ve KRK özelinde yeterli ve kapsamlı çalışma bulunmamaktadır. Bu doğrultuda hem KRK patogenezindeki potansiyel mekanistik rolü hem de biyobelirteç ve terapötik potansiyellerinin anlaşılabilmesi için DDIT4 geni ifade değişimi ve olası biyolojik etkileri tez çalışması kapsamında biyoinformatik, *in vitro* ve KRK hasta doku örnekleri ile değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Bir genin biyobelirteç olabilmesi için öncelikle hastalığın klinik sonuçlarıyla (örneğin sağkalım süresi, metastaz gelişimi, nüks riski) tutarlı ve anlamlı bir korelasyon göstermesi gerekir. Bu korelasyon, genin ekspresyon seviyesi veya mutasyon durumuyla ortaya çıkabilir ve kötü ya da iyi prognozu işaret edebilir. Aynı zamanda laboratuvarlar ve çalışma grupları arasında tekrarlanabilir, güvenilir bir ölçüm yöntemine sahip olmak kritiktir; bu sayede elde edilen sonuçların bir merkezden diğerine tutarlı biçimde aktarılması sağlanır. Genin KRK patogenezinin dahil mekanizmalarda rol oynadığının gösterilmesi de önemlidir. Son olarak, söz konusu genin çok sayıda hasta kohortunda (farklı merkezler, farklı popülasyonlar) değerlendirilerek klasik klinik ve patolojik risk faktörlerinden bağımsız olarak prognostik değerini koruduğunun istatistiksel analizlerle doğrulanması, klinik uygulamada yer alabilmesi için önemli bir adımdır.

Transkriptomik Veri Setlerindeki Tümör Dokularında DDIT4 İfade Profili Analizi

Biz de bu kapsamda; öncelikle, DDIT4'ün KRK'de biyobelirteç potansiyelini değerlendirmek için **farklı ve bağımsız** KRK veri setlerinde genin ifade seviyesini araştırdık. Yaptığımız analizlerde DDIT4'ün farklı KRK veri setlerinde istikrarlı bir şekilde tümör örneklerinde yüksek ifadelendiğini gördük. TCGA-COAD/READ veri seti ve GEO veri tabanından elde ettiğimiz bağımsız, farklı merkezlerden ve farklı hasta gruplarından oluşan 14 veri setinde de DDIT4 tümör örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek ifadelenmektedir (Şekil 5.1.).

Prospektif Hasta Kohortu ve Hücre Hatlarında DDIT4 İfade Profili Analizi

Biyoinformatik analizler kapsamında elde ettiğimiz yüksek DDIT4 ifadesinin validasyonu genin biyobelirteç potansiyelinin desteklenmesi açısından önemli olacaktı. Bu doğrultuda tez çalışması kapsamında topladığımız ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi merkezli 30 hastadan alınmış taze dondurulmuş 30 tümör 30 eşli normal örneği içeren hasta kohortumuzda da DDIT4 ifade seviyesinin veri setlerinde yapılan analizleri doğrular nitelikte tümör örneklerinde yüksek mRNA ifade seviyesi sergilediği bulunmuştur (Şekil 5.21.). Yine aynı kohorttaki dokulardan izole edilen proteinlerde yapılan western blot çalışmaları sonucunda da (Şekil 5.27.). DDIT4'ün tümör örneklerinde daha fazla protein seviyesine sahip olduğu görülmüştür. Bağımsız veri setlerinde ve kendi kohortumuzda yaptığımız bu çalışmaları valide etmek amacıyla hücre hatlarında da DDIT4 mRNA ve protein seviyeleri incelenmiş olup DDIT4'ün 3 farklı KRK hücre hattında, normal hücrelere göre yüksek mRNA ve protein seviyesine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 5.28. ve Şekil 5.29.). Bu bulgular, klinik korelasyon açısından önemli olup, DDIT4'ün farklı popülasyonlarda hem hasta dokularında hem de farklı hücre hatlarında, mRNA ve protein seviyelerinde kolorektal kanser tümörleri için tutarlı bir sinyal verdiğini göstermektedir.

İfade değişimi değerlendirmesi açısından hem in vitro hem hasta doku örneklerinde hem de aynı anda mRNA ve protein seviyesinde değerlendirme yapan ilk çalışma olarak genin KRK'da ifade değişim yönüne ilgili literatür için destekli bir katkı sunulmuş olacaktır. İfade değişimi açısından Fattahi ve arkadaşlarının 2021 yılı çalışmaları ile KRK'da yüksek ifade değişimi açısından uyumludur (15,111). Bununla birlikte Li ve arkadaşlarının 2019 tarihli çalışmasında tek bir KRK hücre serisinde (HCT116) DDIT4 ifadesini kontrole göre düşük

göstermişlerdir. Oysa aynı hücre hattında biz normal kolon epitel hücresine göre DDIT4 ifadesini yüksek olduğunu tespit etmiştik. Bu çalışma doğrudan KRK ve DDIT4 analizi değildir. Li ve arkadaşlarının 2019 tarihli bu çalışmasında temel olarak “Lysine-specific demethylase1 (LSD1)”’in insan kanserlerinde aşırı eksprese olduğu, kötü prognozla ilişkilendirildiği ve LSD1 inhibitörü ZY0511’in biyolojik aktivitesi ortaya koydukları çalışmalarında DDIT4’ün LSD1’in downstream hedefi olduğu ve inhibitörün etkisiyle kanser hücresi büyümesinin inhibisyonun DDIT4-mTORC1 yolu aracılığıyla indüklendiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışma genel olarak kanserde ZY0511’in etkisine odaklanmış olmakla birlikte kolorektal kanser için tek bir hücre hattında (HCT116) DDIT4 ifadesinin baskılandığında hücre proliferasyonunun arttığını göstermişlerdir. Ayrıca western blot ile mTOR/p-mTOR ve p-P70S6K protein seviyesindeki değişimleri irdelemişlerdir (113). **Bir hücre hattındaki bulguların** kanser gibi doğasında büyük bir heterojenite barındıran karmaşık bir hastalık için sonuçları tüm kolorektal kanser bünyesinde değerlendirmek yanlış yorumlar ve çıkarımlar yapılmasına neden olabilir. Hastalar arası tümör örneklerinde mutasyonlar, gen ifade değişimleri, epigenetik değişiklikler, gen-gen ya da gen-mikroçevre etkileşimlerinde farklılıklar olabilmekte bu da hastaların prognozundan tedavi yanıtlarına kadar değişkenliklere sebebiyet verebilmektedir. Bu noktada DDIT4 ifadesinin gerçekte kolorektal kanserde sıklıkla nasıl değiştiği, hangi tümör profilinde nasıl davrandığı veya kanser başlangıç durumunda veya ilerlemesinde farklı mı davrandığı (TGF- β gibi) ya da hangi moleküller veya yollar ile etkileşimde bulunduğu ve bu etkileşim sonucu ifadesinde değişimler olup olmadığı açık değildir. Çalışmamız ile bu boşluğa katkı sağlayabileceğimizi düşünmekteyiz. Analizlerimizde hem 3 farklı KRK hücre serisi hem de hasta doku örnekleri ile hem RNA hem de protein seviyesinde analizler gerçekleştirilmiş ve 14 farklı bağımsız kohortta DDIT4 ifadesinin KRK’da yüksek ifadelendiğini gösterdik. **Bu bağlamda farklı boyuttaki analizler ile genin KRK özelindeki ifade değişimine yönelik etki için daha destekli ve güçlü bir şemada literatüre katkı sunacağımızı düşünmekteyiz.**

DDIT4’ün Prognostik Biyobelirteç Potansiyeli

DDIT4’ün prognostik önemini değerlendirmek için DDIT4 ifade seviyesi ve klinikopatolojik faktörler arasındaki ilişkiyi inceleyerek gerçekleştirdik. Evre bilgisi olan GEO veri setlerinde DDIT4 ifade seviyesi farklı patolojik evrelerde incelenmiş olup 3 veri setinde farklı evrelerde anlamlı ifade seviyesi değişimi gözlenirken, 3 veri setinde ise

herhangi bir değişim olmadığı gözlenmiştir (Şekil 5.3.). Kendi hasta kohortumuzda, örnekleri erken evre ve ileri evre diye 2 gruba ayırdığımızda DDIT4 mRNA seviyelerinin ileri evre KRK dokularında daha yüksek ifadelendiğini gördük (Şekil 5.23.). Lenf nodu metastaz durumu incelendiğinde ise N=0 örneklere kıyasla lenf nodu metastazı olan hastaların daha yüksek DDIT4 ifade seviyesine sahip olduğu görülmüş ve Fattahi ve ekibinin daha önce RNA later ile toplanan dokularda bulduğu sonuçtan (111) farklı bir sonuç elde edilmiştir. Bu fark, RNA later'ın dokunun iç kısımlarına nüfuz edene kadar hücrelerin kaldığı stres durumundan dolayı stres geni olan DDIT4'ün ifade seviyesinin değişmesi sebebiyle olabileceği gibi örneklemin oluşturulduğu popölasyonların etnik farklılıklarından dolayı da olabilir. Lenf düğümleri, bağışıklık sisteminin bir parçasıdır ve kanser hücrelerinin vücutta yayılmasında önemli bir rol oynar. Lenf nodu tutulumu olmayan dokularla olan dokular arasında DDIT4 ifade seviyesinin fark göstermesi, kanserin ilerlemesi ve lenf nodu tutulumu açısından, dolayısı ile kötü prognoz açısından, DDIT4'ün potansiyel bir biyobelirteç (ya da ilgili mekanizmaların bir parçası) olabileceğini düşündürmektedir. Tümör diferansiyasyonuna bakıldığında ise, 2 farklı GEO veri setinde, DDIT4'ün farklılaşma derecesine göre anlamlı bir seviye değişikliği gösterdiği görülmüştür (Şekil 5.4.). Diferansiyasyon derecesi ile DDIT4 ilişkisine baktığımızda ise elimizde yalnızca grade 2 ve 3 örnekler bulunduğu için karşılaştırmalar bu iki grup arasında yapıldı ve anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 5.23.). DDIT4'ün yüksek ifade profilinin hastaların sağ kalımı ve nüks ile de ilişkili olduğu biyoinformatik analizlerle ortaya konmuştur (Şekil 5.5. ve Şekil 5.6.). Kendi kohortumuzun sağ kalım ve nüks takipleri zamanlama açısından yapılmamış ve bu parametrelerin DDIT4 ile ilişkisi incelenememiştir. Buraya kadar elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, DDIT4'ün KRK tümörlerinde, karisnogenez ile birlikte artış gösteren ve kanser evrelemesinde prognostik bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Literatür incelediğinde her ne kadar etkilerine yönelik farklı sonuçlar elde edilmiş olsa da genel olarak DDIT4'ün onkogenik ve prognostik değeri desteklenmektedir. Li ve arkadaşlarının 2024 yılı çalışmasında DDIT4'ün yüksek ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu, PI3K-Akt sinyal yolaklarını ve apoptozu etkilediği, hücre döngüsü geçişini baskıladığı, immün infiltrasyonla bağlantılı olduğu ve akut myeloid lösemide (AML) hem prognostik bir biyobelirteç hem de potansiyel bir terapötik hedef olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (109). Yine Zhao ve arkadaşlarının 2024 tarihli çalışmasında prostat kanser metastaz tahmininde potansiyel bir biyobelirteç olarak önerilmiş (114), Song

ve arkadaşları ise yüksek DDIT4 ekspresyonunun akciğer adenokarsinomu (LUAD) hastalarında daha kısa genel sağkalımla ilişkili olduğunu ve DDIT4'ün bağımsız bir sağkalım prediktörü olarak kullanılabileceği göstermişlerdir (115). Orun ve ekibinin yaptığı 46 ileri evre rektum kanseri üzerinde yapılan çalışmada, tedavi sürecinde olan veya tedavi sonrası evrede bulunan rektum kanseri hastaları kullanılmış, patolojik tam yanıt, lokal nüks ve sağkalım verileri analiz edilerek, gen ekspresyon seviyeleriyle ilişkiler değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre, p53 dışındaki proteinlerin prognostik bir önemi bulunamamış; ancak de DDIT4'ün makalede bahsi geçen diğer bazı proteinlerle birlikte (PTEN ve NOXA) terapötik uygulamalara rehberlik edebilecek potansiyel belirteçlerden biri olabileceği ileri sürülmüştür (116).

DDIT4'un Sağ ve Sol Yerleşimli Kolon Tümörlerindeki İfade Profili Analizi

Kolorektal kanserde sağ ve sol yerleşimli tümörler arasında klinik, moleküler ve prognostik olarak ciddi farklılıklar bulunmaktadır. Sağ kolon tümörleri (özellikle çekum ve çıkan kolon bölgesi), genellikle daha ileri yaşta, kadınlarda ve münöz/mikrosatellit instabilitesi (MSI) veya BRAF mutasyonuna sahip tümör özellikleriyle dikkat çekerken, sol kolon tümörleri (inen kolon, sigmoid ve rektum bölgeleri) sıklıkla mikrosatellit stabilitesi (MSS) ve KRAS mutasyonları gibi farklı genetik özelliklerle ilişkilendirilir. Sağ kolon tümörlerinde immün infiltrasyon ve MSI yüksekliği gibi durumlar, immunoterapiye yanıtı etkileyebilmekte ve bu yüzden sağ ve sol kolon tümörleri, sistemik tedavilere (kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler) farklı yanıt verebilmektedir. Bunun yanı sıra sağ taraflı tümörler çoğu zaman daha geç tanı almakta ve klinik seyir açısından görece daha kötü bir prognoza sahip olmaktadır. Bu farklılıklar, kolorektal kanser yönetiminde tedavi stratejilerinin tümörün yerleşim yerine göre özelleştirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. KRK'de lokasyonun hastalığın seyri ve tedavisi üzerinde ciddi bir belirteç olması, DDIT4 genini de lokasyona bağımlı şekilde analiz etme fikrini akıllara getirmiştir.

Bu kapsamda, lokasyon bilgisi olan bağımsız GEO verisetlerinde DDIT4 ifade seviyesi incelenmiş ve sağ lokalize KRK örneklerinde DDIT4'ün istikrarlı bir şekilde anlamlı bir artış gösterdiği görülmüştür (Şekil 5.9.). Bağımsız 6 veri setinde aldığımız bu sonuç DDIT4'ün sağ tutulumlu tümörler için bir belirteç olabileceğini düşündürmüştür. Devamında, sağ lokalize tümörlerin karakterlerinden olan mikrosatellit instabilitesi (MSI),

DNA hasar tamir mekanizması bozukluğu (dMMR), CpG adacıkları metilasyon profili (CIMP) ayrı ayrı değerlendirilmiş ve DDIT4'ün yüksek ifade profilinin sağ lokalize tümörlerde yaygın gözlenen bu karakterlerle ilişkili olduğu bulunmuştur (Şekil 5.10, Şekil 5.11., Şekil 5.12.). KRK'de mikrosatellit instabilitesi, prognoz ve tedavi seçimi açısından kritik öneme sahiptir. MSI yüksek (MSI-H) tümörler genellikle daha iyi sağkalım ve immünoterapiye (örn. PD-1/PD-L1 inhibitörleri) yüksek duyarlılık gösterir. Lynch sendromu (HNPCC) ile de ilişkili olan MSI, MMR gen mutasyonlarına işaret eder. DDIT4'ün MSI ile yüksek ilişkisi, bu bakımdan önemli bir prognostik belirteç olabilir veya hedeflendiği durumda MSI şiddetini değiştirerek KRK'in agresif prognozunu etkileyebilir. DDIT4 gibi, CIMP+ ile ilişkili bir gen profili, bu spesifik CIMP+ alt grubun epigenetik regülasyon ve immün yanıt mekanizmalarında rol oynuyor olabilir, bu gen bu bağlamda bir prognostik belirteç olabileceği gibi bu genin hedeflenmesi CIMP yüksek tümör hücrelerinde görülen tümör baskılayıcı genlerin inaktive olması sürecini engelleyebilir. MSI ve dMMR testleri günümüzde pek çok merkezde rutin yapılmaktadır. İleri araştırmalarla birlikte, bu testler kapsamında, DDIT4 ifade düzeyini de ekleyecek paneller (örneğin bir qRT-PCR veya IHC paneli) tasarlanırsa, özellikle lokasyon (sağ kolon) ve MSI/dMMR durumu ile ilişkili olan alt gruplarda ek bir prognostik/tedavi öngörüsü sunulabilir. Sağ lokalize tümörlerin kökeni olarak çoğunlukla sessel tırtıklı adenomalar görülmektedir ve bu adenoma türünde de -diğer adenomalara kıyasla- DDIT4'ün daha fazla mRNA seviyesine sahip olması (Şekil 5.14.) ve KRK'de konsensus moleküler alt tiplere bakıldığında yine sağ tutulumlu tümörlerde yaygın olan CMS1 türünde DDIT4'ün fazla ekspres edilmesi (Şekil 5.16.); DDIT4'ün sağ tümörler için bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca; sol tutulumlu tümörlerde daha sık görülen kromozomal instabilite (CIN) özelliği değerlendirilmiş ve CIN bilgisini içeren 1 veri setinde -beklendiği üzere- CIN bakımından zengin örneklerde DDIT4 ifade seviyesinin daha düşük olduğu görülmüştür (Şekil 5.13.).

KRK'de sık rastlanan mutasyonların da tümör lokasyonuna bağlı olarak farklı frekanslar gösterdiği bilinmektedir. Bu mutasyonlar ve DDIT4 ilişkisi incelendiğinde, sağ lokalize tümörlerde daha sık rastlanan BRAF mutasyonlu örneklerde DDIT4 ifadesinin daha yüksek olduğu görülürken, sol lokalize tümörlerde daha sık rastlanan p53, KRAS, APC ve PIK3CA mutasyonlu örneklerde DDIT4'ün ifadesinin düşük olduğu veya çoğunlukla bu mutasyonlarla arasında anlamlı bir ilişki olmadığı görülmüştür (Şekil 5.15.).

Lokasyona bağı yapılan biyoinformatik analizler; DDIT4'ün sağ tutulumlu tümörlere spesifik bir ifade artışı gösterdiğini tutarlı bir şekilde vurgulamaktadır. Bu çıkarımı doğrulamak adına kendi kohortumuzda da benzer analizleri gerçekleştirdik. DDIT4 mRNA seviyeleri, 30 doku içeren kohortumuzda sağ ve sol arasında anlamlı bir değişim göstermemiştir ama sağ örneklerdeki artmış DDIT4 ifade trendi grafik üzerinden görülebilmektedir (Şekil 5.22.). Çalışma kapsamında topladığımız örneklem grubunda sağ yerleşimli tümörlerin sayısı oldukça azdı (5 sağ lokalize, 25 sol lokalize tümör) DDIT4 ifadesinin lokasyon spesifik yukarı regülasyonunun önemli olabileceği bu potansiyelde ilgili değişim ikinci bir kohortta daha değerlendirilmiştir. Yine Prof. Dr. Hilal Özdağ'ın danışmanlığında gerçekleştirilen Sülğün Charyyeva tez çalışmasının KRK FFPE doku örneklerinde RNA seviyesinde sağ ve sol yerleşimli tümörlerde DDIT4 gen ifadesi analiz edilmiştir. RNA izolasyonu ve cDNA sentezleri ilgili tez kapsamında gerçekleştirilmiş 63 sağ 63 sol lokalize FFPE doku örneklerinde qRT-PCR çalışmaları yapılmıştır. Fakat sonucunda DDIT4 geninin sağ ve sol lokalize tümörlerde istatistiksel anlamlı bir değişim saptanamamıştır (Şekil 5.24.).

KRK'in lokasyona spesifik moleküler farklılıkları, sağ ve sol gibi daha genel lokasyonlarla değil de daha alt anatomik segmentlere göre de farklar gösterebilmektedir. 126 örneklik kohortumuzda bu dağılımı gerçekleştirdiğimizde, DDIT4'ün çekumdan sigmoid kolona doğru ilerledikçe (çekum-çıkan kolon-transvers kolon-inen kolon-sigmoid kolon sırası ile) ifade seviyesinin git gide düştüğü ve rektumda ise küçük bir artış gösterdiği görülmüştür (Şekil 5.25.). Literatür taraması yapıldığında ise kohortumuzda elde ettiğimiz bu DDIT4 ifade motifinin Loree ve ekibinin yaptığı çalışmada elde ettiği KRAS/NRAS mutasyon dağılımıyla benzer bir motif gösterdiği görülmüştür (75). Farklı kohortlarda ve farklı şartlar altında yapılan bu çalışmaların karşılaştırılması uygun olmamakla birlikte, bu motiflerin benzerliği ileriki çalışmalarda bir fikir olması adına belirtilmiştir. Aynı çalışmada, kolonun farklı taraflarında yer alan tümörlerde olduğu gibi aynı tarafına yerleşen tümörlerin de kendi arasında mutasyon frekansı bakımından önemli farklar içerdiğine dikkat çekilmiş ve yalnızca histolojiye dayanmayan ve moleküler bozuklukların gitgide önem kazandığı kişiselleştirilmiş tıp alanında lokasyona bağımlı moleküler farklılıkların önemli biyobelirteçler olabileceği vurgulanmıştır (75).

Bu sonuçlar, DDIT4'ün sağ lokalize KRK tümörleri için bir biyobelirteç potansiyeli taşıdığını vurgulamakta ve örneklem dağılımı bakımından daha dengeli kohortlarda yapılacak ileri çalışmalarla, DDIT4'ün KRK'de lokasyona bağımlı değişiminin daha derinlemesine incelenmesini önermektedir.

DDIT4 KRK'daki Etki Mekanizmasını Anlamak Üzere Gerçekleştirilen Biyoinformatik Analizlerin Değerlendirilmesi

DDIT4 geninin yüksek ifadesinin altında yatan mekanizmalar hakkında fikir vermesi için TCGA-COAD/READ veri setinde gerçekleştirilen analizlerde amplifikasyon veya “gain” şeklinde kopya sayısı artışı bulunduğu; ancak ekspresyonla arasındaki korelasyonun orta seviyede kaldığı ($r=0,24$) görülmüştür (Şekil 5.17.). Bu durum, DDIT4 ekspresyon artışında yalnızca genetik değişikliklerin değil, aynı zamanda epigenetik değişikliklerin de rolü olduğu fikrini doğrulamaktadır fakat bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

TCGA-COAD/READ veri seti de dahil olmak üzere 4 farklı veri setinde yaptığımız pearson korelasyon analizi sonucunda DDIT4 ile korelasyon gösteren gen listeleri çıkartılarak genlerin zenginleştiği yollar belirlenmiştir. Bu genlerin; mTOR, hipoksi, epitelyal mezenkimal geçiş, NF-kB aracılı TNF-alfa yolağı gibi kanserde önemli etkisi bulunan yollarda zenginleştiği görülmüştür. DDIT4'ün, karsinogenez ve prognoz üzerindeki etkilerini bu yollarda zenginleşen genleri etkileyerek gösterdiği düşünülmektedir. Bu bağlamda DDIT4'ün KRK karsinogenez ve prognoz üzerindeki etkilerini bu yollarda zenginleşen genleri etkileyerek gösterdiği düşünülmektedir

GeneMANIA ve STRING aracılığıyla elde edilen DDIT4 gen-gen ve protein-protein etkileşim ağlarında elde edilen gen ve protein listelerinin de ayrı ayrı yolk analizleri yapılmış ve korelasyon gösteren gen listelerinin zenginleştiği yollarla paralel sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 5.20.). Bu noktada, GeneMANIA ve STRING algoritmalarının etkileşim ağlarını çıkartırken hücrelerin patolojik durumlarından bağımsız bir ağ çıkarttığını da unutmamak gerekir. Bu araçlardan (GeneMANIA ve STRING) elde edilen listelerin zenginleştiği yollar karşılaştırıldığında bazı farklar dikkat çekmektedir. Bazı yolların zenginleşme sırasının değişmesinin dışında, yalnızca 13 yolağın (Hypoxia, mTORC1 Signaling, TNF-alpha Signaling via NF-kB, Glycolysis, PI3K/AKT/mTOR Signaling, Unfolded Protein Response, IL-2/STAT5 Signaling, Estrogen Response Early, p53 Pathway,

UV Response Up, Apoptosis, Hedgehog Signaling, Mitotic Spindle) ortak olarak zenginleştigi görülmektedir. İki farklı analizin de ortak bulduğu yollar, DDIT4'ün fonksiyonel olarak dahil olduğu süreçler için güçlü bir kanıt olabilir.

Bu yollara bakıldığında, çoğunlukla kanserde regülasyonu değişen yollar olduğu görülmektedir ve DDIT4'ün kanser hastalığında önemli bir molekül olabileceği desteklenmektedir. Gen ve protein etkileşim ağı seviyesinde ortak olarak zenginleşen yollar ayrıntılı olarak incelendiğinde; mTORC1 ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları, hücrenin büyüme faktörleri ve besin durumu gibi koşullara yanıt vererek protein sentezini, hücre büyümesini ve hayatta kalmayı düzenlerken TNF-alfa/NF-kB gibi büyüme faktörü aracılı yollar, hücrenin proliferasyonunu kontrol etmektedir (117,118). TNF-alfa/NF-kB eksen, KKR patogenezinin merkezinde yer alarak inflamasyon, anjiyogenez ve immün sistemden kaçışı yöneterek yenilikçi tedaviler için önemli hedefler sunmaktadır. NF-kB inhibitörlerinin immünmodulatorler veya anti-anjiyojenik ajanlarla birlikte kullanılması, ileri evre KKR hastalarında tedavi sonuçlarını iyileştirebilir (119,120). TNF-alfa/NF-kB ilişkili süreçlerin aynı zamanda e-cadherini dolaylı olarak baskılayarak epitelyal mezenkimal geçişi tetiklediği ve tümör invazyonu ve metastazında rol aldığı bilinmektedir (119). Bir çalışmada, DDIT4'ün EMT ve NF-kB yolları üzerinden servikal kanser hastalarında lenf nodu metastazını tetikleyerek hücre göçünü ve invazyonu kontrol ettiği ortaya konmuştur (121). Yaptığımız yola analizleri sonucu da literatürdeki bu bulguyu destekler nitelikte olmuştur.

mTOR yolu da kanser tedavilerinde sıkça hedeflenen bir yoldur (88). Bu kapsamda DDIT4 ve ilişkili moleküllerin bu yolda zenginleşmesi, DDIT4'ün tedavi stratejilerinde kullanılması için bir başlangıç noktası olabilir. Yine, zenginleşen hipoksi, katlanmamış protein yanıtı, p53 yolu ve UV yanıtı (Up) yollarına bakıldığında ise bu yolların ortak olarak stres veya DNA hasarı durumunda regüle edilen yollar olduğu, hücrenin strese adaptasyonunu veya ciddi hasar durumlarında apoptozu uyardığı bilinmektedir (122,123). Bu yollardan p53 yoluna odaklanacak olursak, daha önce Orun ve ekibinin KKR hasta dokuları üzerinde yaptığı çalışmada p53 ve DDIT4 arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştı (116) fakat literatürde DDIT4 ve p53 arasında geribildirim mekanizması olduğuna dair çeşitli çalışmalar mevcuttur. Hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada p53'ün AKT ve mTOR üzerindeki etkilerinin bir kısmını RFX7 aracılığıyla DDIT4'ü regüle

ederek gösterdiği (91) ve fare fibroblast dokuları üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise DDIT4'ün p53 üzerinde geribildirim etkisi olduğu ortaya konmuştur (124). Farklı hücre ve dokularda gösterilen p53 ve DDIT4 ilişkisi, KRK kanserde Orun ve ekibi tarafından yapılan çalışmada gösterilememiş olsa da bu tez çalışmasında yapılan yolak analizleri sonuçları DDIT4 ve ilişkili gen ve proteinlerin p53 yolağı üzerinde bir regülasyonu olduğu fikrini desteklemektedir.

Mitotik içcik ve apoptoz yolları da zenginleşen ve kanserde önemli rol oynayan yollardandır. Bu yollardaki aksaklıklar kontrolsüz ve hasarlı hücre bölünmesi ve dolayısıyla karsinogenez süreci ile sonuçlanmaktadır (125,126). Ve son olarak her iki etkileşim ağı listesinin zenginleştiği glikoliz yolağı ise Warburg etkisi sonucu yani kanser hücrelerinin, daha az verimli olmasına rağmen hızlı hücre bölünmesi için gerekli enerji ihtiyacını karşılayabilmek adına glikolizi tercih etme ve tümör mikroçevresinde gelişen hipoksik koşullara daha iyi uyum sağlamalarını kolaylaştıran bu süreçte DDIT4'ün önemli bir rolü olabileceğini vurgulamaktadır (127,128). Hem hücre bölünmesinde hem programlı hücre ölümünde hem de stres adaptasyon yollarında gerçekleşen bu zenginleşmeler, DDIT4'ün farklı kanserlerde farklı evrelerde farklı ifade profili göstermesini açıklamaktadır. Bu yollarda gerçekleşen farklı seviyelerdeki regülasyonlar DDIT4'ün bazen onkogenik bazen de tümör baskılayıcı rolü olmasının altında yatan mekanizmayı aydınlatmayla ilgili yapılacak ileri çalışmalarda bir ipucu olabilir.

7 yolak (Epithelial Mesenchymal Transition, UV Response Dn, Fatty Acid Metabolism, G2-M Checkpoint, Myogenesis, Coagulation, Angiogenesis) sadece GeneMANIA aracılığıyla elde edilen gen listesinin zenginleşme sonucunda elde edilirken, 6 yolak (Interferon Gamma Response, Myc Targets V1, Wnt-beta Catenin Signaling, TGF-beta Signaling, Cholesterol Homeostasis, Androgen Response) yalnızca STRING sonucu elde edilen DDIT4 ile etkileşimde bulunan proteinler listesinin zenginleşme sonucunda yer almaktadır. Bu farklılıklar, gen regülasyonu ile protein düzeyindeki dinamikler arasındaki kompleks ilişkileri yansıtabilir ve yine ileri çalışmalar için ipucu olabilir.

Sonuç olarak, KRK'de prognoz belirlenmesi ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde DDIT4 geni güçlü bir oyuncu konumunda görünmektedir. Özellikle sağ kolon ve MSI yüksekliği gibi agresif fenotiplere sahip hasta alt gruplarında daha anlamlı

sonuçlar elde edilmesi, gelecekte DDIT4 üzerinden geliştirilecek tedavi veya izlem protokollerinin “lokasyon spesifik” planlanabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, tüm bulgulara rağmen daha geniş hasta serilerinde prospektif ve çok merkezli çalışmalar yürütülmesi, ayrıca in vivo modellerde DDIT4 ekspresyonunun kontrol edilerek tümör büyümesine ve ilaç direncine etkilerinin araştırılması faydalı olacaktır. Böylelikle, DDIT4’n gerçekten de kolorektal kanserin klinik yönetiminde bir moleküler hedef ya da risk öngörü belirteci olarak benimsenip benimsenemeyeceği daha net biçimde ortaya konacaktır.

6.2. SONUÇ

Sonuç olarak, bu tez alışması, DDIT4 geninin kolorektal kanserde (KRK) prognostik bir biyobelirteç olarak önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Hem bağımsız veri tabanlarından (GEO, TCGA) elde edilen geniş ölçekli biyoinformatik veriler hem de Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde toplanan hasta dokuları üzerinde yapılan deneysel analizler, DDIT4’n tümörlerde normal dokulara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek ifade seviyesi sergilediğini doğrulamıştır. Ayrıca, genin hipoksi, mTOR, p53, EMT, NF-kB gibi temel kanser yolaklarıyla bağlantılı olması, KRK’nin agresif alt tiplerinde ya da sağ kolon gibi belirli anatomik lokasyonlarda daha da öne çıkabileceğini düşündürmektedir. Kısıtlı noktalara rağmen, DDIT4’n tanısıl ve prognostik öngörüde kullanılabilme olasılığı yüksektir. Gelecekte daha geniş hasta serilerinde ve çok merkezli prospektif çalışmalarda yapılacak ek doğrulamaların ardından, DDIT4 geninin kişiselleştirilmiş KRK tanı ve tedavi stratejilerine entegre edilmesi mümkün olabilir.

KAYNAKLAR

1. Global Cancer Observatory.
2. Shaukat A, Levin TR. Current and future colorectal cancer screening strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2024 Aug 25];19(8):521. Available from: [/pmc/articles/PMC9063618/](#)
3. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Apr 15 [cited 2025 Jan 14];66(8):3992–5. Available from: [/cancerres/article/66/8/3992/527155/KRAS-Mutation-Status-Is-Predictive-of-Response-to](#)
4. Koncina E, Haan S, Rauh S, Letellier E. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers for Colorectal Cancer: Updates and Challenges. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2025 Jan 14];12(2):319. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7072488/>
5. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline from The American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2025 Jan 14];35(13):1453–96. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.71.9807>
6. Chen W, Frankel WL. A practical guide to biomarkers for the evaluation of colorectal cancer. *Modern Pathology* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 Jan 14];32:1–15. Available from: <http://www.modernpathology.org/article/S0893395222009565/fulltext>
7. Martin V, Landi L, Molinari F, Fountzilas G, Geva R, Riva A, et al. HER2 gene copy number status may influence clinical efficacy to anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* [Internet]. 2013 Feb 19 [cited 2025

- Jan 14];108(3):668. Available from:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3593567/>
8. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2025 Jan 14];17(6):738–46. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S1470204516001509/fulltext>
 9. Ogunwobi OO, Mahmood F, Akingboye A. Biomarkers in Colorectal Cancer: Current Research and Future Prospects. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2025 Jan 14];21(15):5311. Available from:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7432436/>
 10. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2025 Jan 14];5(1):22. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7082344/>
 11. Sveen A, Kopetz S, Lothe RA. Biomarker-guided therapy for colorectal cancer: strength in complexity. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019 17:1 [Internet]. 2019 Jul 9 [cited 2025 Jan 14];17(1):11–32. Available from:
<https://www.nature.com/articles/s41571-019-0241-1>
 12. Gallois C, Pernot S, Zaanani A, Taieb J. Colorectal Cancer: Why Does Side Matter? *Drugs*. 2018 Jun 1;78(8):789–98.
 13. Missiaglia E, Jacobs B, D'Ario G, Di Narzo AF, Soneson C, Budinska E, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Annals of Oncology* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2024 Jun 5];25(10):1995–2001. Available from:
<http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419366177/fulltext>

14. Britto FA, Dumas K, Giorgetti-Peraldi S, Ollendorff V, Favier FB. Is REDD1 a metabolic double agent? Lessons from physiology and pathology. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2020;319:807–24. Available from: www.ajpcell.org
15. Fattahi F, Saeednejad Zanjani L, Habibi Shams Z, Kiani J, Mehrazma M, Najafi M, et al. High expression of DNA damage-inducible transcript 4 (DDIT4) is associated with advanced pathological features in the patients with colorectal cancer. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1).
16. Hagland HR, Berg M, Jolma IW, Carlsen A, Søreide K. Molecular Pathways and Cellular Metabolism in Colorectal Cancer. *Dig Surg* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2024 Jul 15];30(1):12–25. Available from: <https://dx.doi.org/10.1159/000347166>
17. Colorectal cancer [Internet]. 2023 [cited 2024 Jul 15]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>
18. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 Mar;65(2):87–108.
19. Pang Y, Kartsonaki C, Guo Y, Chen Y, Yang L, Bian Z, et al. Socioeconomic status in relation to risks of major gastrointestinal cancers in Chinese adults: A prospective study of 0.5 million people. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2020;29(4):823–31.
20. Gu MJ, Huang QC, Bao CZ, Li YJ, Li XQ, Ye D, et al. Attributable causes of colorectal cancer in china. *BMC Cancer* [Internet]. 2018 Jan 5 [cited 2024 Nov 17];18(1):1–9. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3968-z>
21. Li L, Fang YJ, Abulimiti A, Huang CY, Liu KY, Chen YM, et al. Educational level and colorectal cancer risk: The mediating roles of lifestyle and dietary factors. *European Journal of Cancer Prevention* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 Nov 17];31(2):137–44. Available from: https://journals.lww.com/eurjcancerprev/fulltext/2022/03000/educational_level_and_colorectal_cancer_risk_the.4.aspx

22. Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ, Cannon-Albright LA. Population-Based Family History-Specific Risks for Colorectal Cancer: A Constellation Approach. *Gastroenterology* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2024 Nov 17];138(3):877–85. Available from: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508509020617/fulltext>
23. Cho E, Lee JE, Rimm EB, Fuchs CS, Giovannucci EL. Alcohol consumption and the risk of colon cancer by family history of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr*. 2012 Feb 1;95(2):413–9.
24. Deng N, Zheng L, Liu F, Wang L, Duan H. crcTRP: A Translational Research Platform for Colorectal Cancer. *Comput Math Methods Med* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2024 Nov 17];2013(1):930362. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2013/930362>
25. Joshi CE, Parmigiani G, Colditz GA, Platz EA. Opportunities for the primary prevention of colorectal cancer in the United States. *Cancer Prevention Research* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2024 Nov 17];5(1):138–45. Available from: </cancerpreventionresearch/article/5/1/138/50013/Opportunities-for-the-Primary-Prevention-of>
26. Kemp Bohan PM, Mankaney G, Vreeland TJ, Chick RC, Hale DF, Cindass JL, et al. Chemoprevention in familial adenomatous polyposis: past, present and future. *Fam Cancer* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 Nov 17];20(1):23–33. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10689-020-00189-y>
27. Vacante M, Borzi AM, Basile F, Biondi A. Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. *World J Clin Cases* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2025 Jan 14];6(15):869. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6288499/>
28. Kalady MF, Church JM. Prophylactic colectomy: Rationale, indications, and approach. *J Surg Oncol*. 2015 Jan 1;111(1):112–7.

29. Lastella P, Patruno M, Forte G, Montanaro A, Di Gregorio C, Sabbà C, et al. Identification and surveillance of 19 Lynch syndrome families in southern Italy: Report of six novel germline mutations and a common founder mutation. *Fam Cancer* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2024 Nov 17];10(2):285–95. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10689-011-9419-0>
30. Park J, Lee SY, Kim DW, Kang SB, Jeong SY, Park KJ. Knowledge of and Practice Patterns for Hereditary Colorectal Cancer Syndromes in Korean Surgical Residents. *Ann Coloproctol* [Internet]. 2013 Oct 31 [cited 2024 Nov 17];29(5):186–91. Available from: <http://coloproctol.org/journal/view.php?doi=10.3393/ac.2013.29.5.186>
31. Dandapani M, Stoffel EM. Clinical Management of Families with Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. *Semin Colon Rectal Surg*. 2011 Jun 1;22(2):100–4.
32. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, Lau MWY, et al. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the Familial Risk–Colorectal Cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2015 Oct 10 [cited 2024 Nov 17];33(2):209–17. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.58.1322>
33. Taheny A, McSwaney H, Meade J. A second hereditary cancer predisposition syndrome in a patient with lynch syndrome and three primary cancers. *Hered Cancer Clin Pract* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2024 Nov 17];22(1):1–3. Available from: <https://hccpjjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13053-024-00281-9>
34. Hu H, Gong X, Xu K, Luo S, Gao W, Li B, et al. Risk factor analysis of malignant adenomas detected during colonoscopy. *Front Med (Lausanne)*. 2023 Feb 8;10:1106272.
35. Meseeha M, Attia M. Colon Polyps. *Gut Instincts: A Clinician's Handbook of Digestive and Liver Diseases* [Internet]. 2023 Aug 8 [cited 2024 Aug 18];173–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430761/>

36. Devi KG, Radhakrishnan R, Rajamani K. Computer Aided Diagnosis Scheme for Polyp Detection in CT Colonography Using K-Means Clustering and SVM. *World Journal of Medical Sciences*. 2013;9(4):273–81.
37. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging* [Internet]. 2016 Jul 19 [cited 2024 Aug 18];11:967. Available from: [/pmc/articles/PMC4958365/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26844441/)
38. Colorectal Cancer Screening. In: *Colorectal Cancer Screening* [Internet]. International Agency for Research on Cancer; 2019 [cited 2024 Aug 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553200/>
39. AHMAD R, SINGH JK, WUNNAVA A, AL-OBEED O, ABDULLA M, SRIVASTAVA SK. Emerging trends in colorectal cancer: Dysregulated signaling pathways (Review). *Int J Mol Med* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2024 Aug 18];47(3). Available from: [/pmc/articles/PMC7834960/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33844441/)
40. Nagtegaal ID, Huguenot N. The Increasing Relevance of Tumour Histology in Determining Oncological Outcomes in Colorectal Cancer. 2015;
41. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* [Internet]. 2012 [cited 2024 Aug 18];3(3):153–73. Available from: <https://jgo.amegroups.org/article/view/410/html>
42. Warsinggih, Liliyanto, Prihantono, Ariani GDW, Faruk M. Colorectal neuroendocrine tumors: A case series. *Int J Surg Case Rep* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2024 Aug 20];72:411. Available from: [/pmc/articles/PMC7306531/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32444441/)
43. Zou H, Liu C, Ruan Y, Fang L, Wu T, Han S, et al. Colorectal medullary carcinoma: a pathological subtype with intense immune response and potential to benefit from immune checkpoint inhibitors. *Expert Rev Clin Immunol* [Internet]. 2024 Aug 2 [cited 2024 Aug 20]; Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1744666X.2024.2328746>
44. Gonzalez RS, Huh WJ, Cates JMM, Washington K, Beauchamp RD, Coffey RJ, et al. Micropapillary Colorectal Carcinoma: Clinical, Pathologic, and Molecular

- Properties, Including Evidence of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Histopathology* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2024 Sep 6];70(2):223. Available from: [/pmc/articles/PMC5921077/](#)
45. Albuquerque-González B, López-Calderón FF, López-Abellán MD, Esteban-Gil Á, García-Solano J, Conesa-Zamora P. Biology and Therapeutic Targets of Colorectal Serrated Adenocarcinoma; Clues for a Histologically Based Treatment against an Aggressive Tumor. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2024 Sep 6];21(6). Available from: [/pmc/articles/PMC7139914/](#)
 46. Lee CT, Huang YC, Hung LY, Chow NH, Su PF, Ho CL, et al. Serrated adenocarcinoma morphology in colorectal mucinous adenocarcinoma is associated with improved patient survival. *Oncotarget* [Internet]. 2017 May 5 [cited 2024 Sep 6];8(21):35165. Available from: [/pmc/articles/PMC5471043/](#)
 47. Cancer Staging - NCI [Internet]. [cited 2025 Jan 3]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>
 48. Colorectal Cancer Stages | Rectal Cancer Staging | Colon Cancer Staging | American Cancer Society [Internet]. [cited 2025 Jan 3]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>
 49. Zhou P, Cao Y, Li M, Ma Y, Chen C, Gan X, et al. HCCANet: histopathological image grading of colorectal cancer using CNN based on multichannel fusion attention mechanism. *Scientific Reports* 2022 12:1 [Internet]. 2022 Sep 6 [cited 2024 Sep 16];12(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-18879-1>
 50. Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, García-Albéniz X, Maurel J, et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Jan 1;109:9–19.
 51. Kudryavtseva A V., Lipatova A V., Zaretsky AR, Moskalev AA, Fedorova MS, Rasskazova AS, et al. Important molecular genetic markers of colorectal cancer.

- Oncotarget [Internet]. 2016 Aug 8 [cited 2024 Sep 7];7(33):53959. Available from: /pmc/articles/PMC5288236/
52. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2024 Sep 7];469(2):125. Available from: /pmc/articles/PMC4978761/
 53. Pino MS, Chung DC. THE CHROMOSOMAL INSTABILITY PATHWAY IN COLON CANCER. *Gastroenterology* [Internet]. 2010 [cited 2024 Sep 7];138(6):2059. Available from: /pmc/articles/PMC4243705/
 54. Galofré C, Asensio E, Ubach M, Torres IM, Quintanilla I, Castells A, et al. Centrosome reduction in newly-generated tetraploid cancer cells obtained by separate depletion. *Scientific Reports* 2020 10:1 [Internet]. 2020 Jun 4 [cited 2024 Sep 16];10(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-65975-1>
 55. Ewart-Toland A, Briassouli P, De Koning JP, Mao JH, Yuan J, Chan F, et al. Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nature Genetics* 2003 34:4 [Internet]. 2003 Jul 27 [cited 2024 Sep 16];34(4):403–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng1220>
 56. Mei WJ, Mi M, Qian J, Xiao N, Yuan Y, Ding PR. Clinicopathological characteristics of high microsatellite instability/mismatch repair-deficient colorectal cancer: A narrative review. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Dec 23 [cited 2024 Sep 16];13. Available from: /pmc/articles/PMC9822542/
 57. Olave MC, Graham RP. Mismatch repair deficiency: The what, how and why it is important. *Genes Chromosomes Cancer*. 2022 Jun 1;61(6):314–21.
 58. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2010 [cited 2024 Sep 17];138(6):2073. Available from: /pmc/articles/PMC3037515/

59. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol* [Internet]. 2015 Jun 16 [cited 2024 Sep 17];89(6):899–921. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-015-1474-0>
60. Paweł K, Małgorzata SM. CpG Island Methylator Phenotype—A Hope for the Future or a Road to Nowhere? *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Sep 17];23(2). Available from: [/pmc/articles/PMC8777692/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/349777692/)
61. Lee JE, Kim MY. Cancer epigenetics: Past, present and future. *Semin Cancer Biol*. 2022 Aug 1;83:4–14.
62. Rhee YY, Kim KJ, Kang GH. CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the Serrated Neoplasia Pathway. *Gut Liver* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2024 Sep 17];11(1):38. Available from: [/pmc/articles/PMC5221859/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25221859/)
63. Suzuki H, Yamamoto E, Maruyama R, Niinuma T, Kai M. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Dec 5;455(1–2):35–42.
64. Singh MP, Rai S, Pandey A, Singh NK, Srivastava S. Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes Dis* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2024 Sep 17];8(2):133. Available from: [/pmc/articles/PMC8099693/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38099693/)
65. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer* 2017 17:2 [Internet]. 2017 Jan 4 [cited 2024 Sep 17];17(2):79–92. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc.2016.126>
66. LaPointe LC, Dunne R, Brown GS, Worthley DL, Molloy PL, Wattoo D, et al. Map of differential transcript expression in the normal human large intestine. *Physiol Genomics*. 2008 Mar 14;33(1):50–64.
67. Wilson DJ, Bordoni B. Embryology, Bowel. *StatPearls* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2024 Jun 3]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545247/>

68. Lung K, Lui F. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Arteries. StatPearls [Internet]. 2023 Jul 24 [cited 2024 Oct 7]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525959/>
69. Skinner D, Wehrle CJ, Fossen K Van. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Inferior Mesenteric Artery. StatPearls [Internet]. 2023 Aug 7 [cited 2024 Oct 7]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482156/>
70. Bufill JA. Colorectal Cancer: Evidence for Distinct Genetic Categories Based on Proximal or Distal Tumor Location [Internet]. Vol. 113, *Annals of Internal Medicine*. 1990. Available from: <http://annals.org/>
71. Ghidini M, Petrelli F, Tomasello G. Right Versus Left Colon Cancer: Resectable and Metastatic Disease. Vol. 19, *Current Treatment Options in Oncology*. Springer New York LLC; 2018.
72. Nawa T, Kato J, Kawamoto H, Okada H, Yamamoto H, Kohno H, et al. Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2008;23(3):418–23.
73. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: Differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum*. 2010 Jan;53(1):57–64.
74. Wang F, Bai L, Liu TS, Yu YY, He MM, Liu KY, et al. Right-and left-sided colorectal cancers respond differently to cetuximab. 2015;
75. Loree JM, Pereira AAL, Lam M, Willauer AN, Raghav K, Dasari A, et al. Classifying Colorectal Cancer by Tumor Location Rather than Sidedness Highlights a Continuum in Mutation Profiles and Consensus Molecular Subtypes. *Clinical Cancer Research* [Internet]. 2018 [cited 2024 Oct 8];24(5):1062–72. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/>

76. Gallois C, Laurent-Puig P, Taieb J. Methylator phenotype in colorectal cancer: A prognostic factor or not? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Mar 1;99:74–80.
77. Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S, et al. Identification of a Novel Hypoxia-Inducible Factor 1-Responsive Gene, RTP801, Involved in Apoptosis. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2002 Apr 1 [cited 2024 Aug 7];22(7):2283. Available from: [/pmc/articles/PMC133671/](http://pmc/articles/PMC133671/)
78. Ellisen LW, Ramsayer KD, Johannessen CM, Yang A, Beppu H, Minda K, et al. REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol Cell* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2024 Aug 7];10(5):995–1005. Available from: <http://www.cell.com/article/S1097276502007062/fulltext>
79. Wang Z, Malone MH, Thomenius MJ, Zhong F, Xu F, Distelhorst CW. Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2003 Jul 18 [cited 2024 Aug 7];278(29):27053–8. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820846699/fulltext>
80. Tirado-Hurtado I, Fajardo W, Pinto JA. DNA Damage Inducible Transcript 4 Gene: The Switch of the Metabolism as Potential Target in Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2018 Apr 12 [cited 2024 Jul 9];8:106. Available from: www.frontiersin.org
81. Zhidkova EM, Lylova ES, Grigoreva DD, Kirsanov KI, Osipova A v, Kulikov EP, et al. Nutritional Sensor REDD1 in Cancer and Inflammation: Friend or Foe? 2022; Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms23179686>
82. Pinto JA, Cohen-Solal KA, Dhananjaya Mohan C, Rufini A, Tirado-Hurtado I, Fajardo W, et al. DNA Damage Inducible Transcript 4 Gene: The Switch of the Metabolism as Potential Target in Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2018;8:106. Available from: www.frontiersin.org
83. Ding F, Gao F, Zhang S, Lv X, Chen Y, Liu Q. A review of the mechanism of DDIT4 serve as a mitochondrial related protein in tumor regulation. *Article SCIENCE*

- PROGRESS Science Progress [Internet]. 2021;104(1):1–16. Available from: <https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>
84. Gene: DDIT4 (ENSG00000168209) - Summary - Homo_sapiens - GRCh37 Archive browser 107 [Internet]. [cited 2022 Oct 18]. Available from: https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000168209;r=10:74033678-74035794#
 85. Ding F, Gao F, Zhang S, Lv X, Chen Y, Liu Q. A review of the mechanism of DDIT4 serve as a mitochondrial related protein in tumor regulation. Sci Prog [Internet]. 2021 [cited 2024 Jul 9];104(1):1–16. Available from: [/pmc/articles/PMC10455034/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39855034/)
 86. Deyoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW. Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling. Genes Dev [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2024 Aug 7];22(2):239. Available from: [/pmc/articles/PMC2192757/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1782757/)
 87. Vega-Rubin-de-Celis S, Abdallah Z, Kinch L, Grishin N V., Brugarolas J, Zhang X. Structural analysis and functional implications of the negative mTORC1 regulator REDD1. Biochemistry [Internet]. 2010 Mar 3 [cited 2024 Aug 7];49(11):2491. Available from: [/pmc/articles/PMC3046781/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20346781/)
 88. Panwar V, Singh A, Bhatt M, Tonk RK, Azizov S, Raza AS, et al. Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. Signal Transduction and Targeted Therapy 2023 8:1 [Internet]. 2023 Oct 2 [cited 2024 Nov 18];8(1):1–25. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01608-z>
 89. Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. Cancer Sci [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2024 Aug 8];109(3):560–71. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cas.13483>
 90. Cam H, Easton JB, High A, Houghton PJ. mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 α . Mol Cell

- [Internet]. 2010 Nov 11 [cited 2024 Aug 8];40(4):509. Available from: [/pmc/articles/PMC3004768/](#)
91. Coronel L, Häckes D, Schwab K, Riege K, Hoffmann S, Fischer M. p53-mediated AKT and mTOR inhibition requires RFX7 and DDIT4 and depends on nutrient abundance. *Oncogene* 2021 41:7 [Internet]. 2021 Dec 14 [cited 2024 Nov 14];41(7):1063–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41388-021-02147-z>
 92. Huang J, Manning BD. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* [Internet]. 2008 Jun 6 [cited 2024 Aug 7];412(2):179. Available from: [/pmc/articles/PMC2735030/](#)
 93. Zhang Y, Liu L, Hou X, Zhang Z, Zhou X, Gao W. Role of Autophagy Mediated by AMPK/DDIT4/mTOR Axis in HT22 Cells Under Oxygen and Glucose Deprivation/Reoxygenation. *ACS Omega* [Internet]. 2023 Mar 14 [cited 2024 Aug 8];8(10):9221–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.2c07280>
 94. Whitney ML, Jefferson LS, Kimball SR. ATF4 is Necessary and Sufficient for ER Stress-induced Upregulation of REDD1 Expression. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2008 Feb 6 [cited 2024 Nov 16];379(2):451. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2656673/>
 95. Ho KH, Chen PH, Chou CM, Shih CM, Lee YT, Cheng CH, et al. A Key Role of DNA Damage-Inducible Transcript 4 (DDIT4) Connects Autophagy and GLUT3-Mediated Stemness To Desensitize Temozolomide Efficacy in Glioblastomas. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 Nov 16];17(3):1212. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7609792/>
 96. Cao JX, Lu Y, Qi JJ, An GS, Mao ZB, Jia HT, et al. MiR-630 inhibits proliferation by targeting CDC7 kinase, but maintains the apoptotic balance by targeting multiple modulators in human lung cancer A549 cells. *Cell Death & Disease* 2014 5:9 [Internet]. 2014 Sep 25 [cited 2024 Nov 16];5(9):e1426–e1426. Available from: <https://www.nature.com/articles/cddis2014386>

97. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(1):264–9.
98. Hwang-Verslues WW, Chang PH, Wei PC, Yang CY, Huang CK, Kuo WH, et al. miR-495 is upregulated by E12/E47 in breast cancer stem cells, and promotes oncogenesis and hypoxia resistance via downregulation of E-cadherin and REDD1. *Oncogene* 2011 30:21 [Internet]. 2011 Jan 24 [cited 2024 Nov 16];30(21):2463–74. Available from: <https://www.nature.com/articles/onc2010618>
99. Li XH, Ha CT, Fu D, Xiao M. Micro-RNA30c Negatively Regulates REDD1 Expression in Human Hematopoietic and Osteoblast Cells after Gamma-Irradiation. *PLoS One* [Internet]. 2012 Nov 7 [cited 2024 Nov 17];7(11):e48700. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048700>
100. Gordon BS, Steiner JL, Williamson DL, Lang CH, Kimball SR. Emerging role for regulated in development and DNA damage 1 (REDD1) in the regulation of skeletal muscle metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2016 Jul 7 [cited 2024 Aug 8];311(1):E157. Available from: </pmc/articles/PMC4967146/>
101. Pinto JA, Rolfo C, Raez LE, Prado A, Araujo JM, Bravo L, et al. In silico evaluation of DNA Damage Inducible Transcript 4 gene (DDIT4) as prognostic biomarker in several malignancies OPEN. [cited 2022 Nov 1]; Available from: www.nature.com/scientificreports/
102. Seoane J, Gomis RR. TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9:22277.
103. Du F, Sun L, Chu Y, Li T, Lei C, Wang X, et al. DDIT4 promotes gastric cancer proliferation and tumorigenesis through the p53 and MAPK pathways. *Cancer Commun* [Internet]. 2018 Jul 5 [cited 2022 Oct 22];38(1). Available from: </pmc/articles/PMC6034313/>
104. KEGG T01001: 54541 [Internet]. [cited 2022 Dec 11]. Available from: <https://www.genome.jp/entry/hsa:54541>

105. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nature Reviews Clinical Oncology* 2018 15:5 [Internet]. 2018 Mar 6 [cited 2022 Dec 11];15(5):273–91. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2018.28>
106. Canal M, Romani-Aumedes J, Martín-Flores N, Pérez-Fernández V, Malagelada C, Pozzi D. CELLULAR NEUROSCIENCE MINI REVIEW ARTICLE RTP801/REDD1: a stress coping regulator that turns into a troublemaker in neurodegenerative disorders. 2014 [cited 2022 Dec 11]; Available from: www.frontiersin.org
107. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012 487:7407 [Internet]. 2012 Jul 18 [cited 2024 Nov 18];487(7407):330–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature11252>
108. Charyyeva S. Kolorektal Kanserde Aday Prognostik Biyobelirteçlerin Arşiv Materyallerinde Doğrulanması. [Ankara]: Ankara Biotechnology Institute; 2021.
109. Li F, Miao J, Liu R, Zhang R, He A. Pan-cancer analysis of DDIT4 identifying its prognostic value and function in acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2025 Jan 21];150(3):1–15. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00432-024-05676-8>
110. Zhidkova EM, Lylova ES, Grigoreva DD, Kirsanov KI, Osipova A V., Kulikov EP, et al. Nutritional Sensor REDD1 in Cancer and Inflammation: Friend or Foe? Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
111. Fattahi F, Kiani J, Alemrajabi M, Soroush A, Naseri M, Najafi M, et al. Overexpression of DDIT4 and TPTEP1 are associated with metastasis and advanced stages in colorectal cancer patients: a study utilizing bioinformatics prediction and experimental validation. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Jan 22];21(1):1–19. Available from: <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-021-02002-x>

112. Di Conza G, Trusso Cafarello S, Lorocho S, Mennerich D, Deschoemaeker S, Di Matteo M, et al. The mTOR and PP2A Pathways Regulate PHD2 Phosphorylation to Fine-Tune HIF1 α Levels and Colorectal Cancer Cell Survival under Hypoxia. *Cell Rep* [Internet]. 2017 Feb 14 [cited 2025 Jan 24];18(7):1699. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5318657/>
113. Li Y, Tao L, Zuo Z, Zhou Y, Qian X, Lin Y, et al. ZY0511, a novel, potent and selective LSD1 inhibitor, exhibits anticancer activity against solid tumors via the DDIT4/mTOR pathway. *Cancer Lett*. 2019 Jul 10;454:179–90.
114. Zhao Y, Hu X, Yu H, Sun H, Zhang L, Shao C. The FTO Mediated N6-Methyladenosine Modification of DDIT4 Regulation with Tumorigenesis and Metastasis in Prostate Cancer. *Research* [Internet]. 2024 Jan [cited 2025 Jan 27];7:0313. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10879844/>
115. Song L, Chen Z, Zhang M, Zhang M, Lu X, Li C, et al. DDIT4 overexpression associates with poor prognosis in lung adenocarcinoma. *J Cancer* [Internet]. 2021 [cited 2024 Jul 21];12(21):6422. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8489140/>
116. Orun O, Özden S, Kılınç · Olca, Pınar ·, Tiber M, Yonar P, et al. The role of the PTEN/mTOR axis in clinical response of rectal cancer patients. 2022 [cited 2025 Jan 23];49:8461–72. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07665-x>
117. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2025 Jan 22];8(3):227. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8363188/>
118. Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K Signaling. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2025 Jan 22];25(9):545. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4734635/>
119. Wu Y, Zhou BP. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer* 2010 102:4 [Internet]. 2010 Jan 19 [cited 2025 Jan 24];102(4):639–44. Available from: <https://www.nature.com/articles/6605530>

120. Bahrami A, Khalaji A, Bahri Najafi M, Sadati S, Raisi A, Abolhassani AM, et al. NF- κ B pathway and angiogenesis: insights into colorectal cancer development and therapeutic targets. *European Journal of Medical Research* 2024 29:1 [Internet]. 2024 Dec 19 [cited 2025 Jan 24];29(1):1–13. Available from: <https://eurjmedres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40001-024-02168-w>
121. Lin X, Yoshikawa N, Liu W, Matsukawa T, Nakamura K, Yoshihara M, et al. DDIT4 Facilitates Lymph Node Metastasis via the Activation of NF- κ B Pathway and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Reproductive Sciences* [Internet]. 2023 Sep 1 [cited 2025 Jan 24];30(9):2829–41. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s43032-023-01230-y>
122. Madden E, Logue SE, Healy SJ, Manie S, Samali A. The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biol Cell* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 Jan 22];111(1):1–17. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/boc.201800050>
123. Luo Z, Tian M, Yang G, Tan Q, Chen Y, Li G, et al. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 Jan 22];7(1):218. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9261907/>
124. Vadysirisack DD, Baenke F, Ory B, Lei K, Ellisen LW. Feedback Control of p53 Translation by REDD1 and mTORC1 Limits the p53-Dependent DNA Damage Response. *Mol Cell Biol*. 2011 Nov 1;31(21):4356–65.
125. Kashyap D, Garg VK, Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2021 Jan 1;125:73–120.
126. Hoffmann I. Centrosomes in mitotic spindle assembly and orientation. *Curr Opin Struct Biol*. 2021 Feb 1;66:193–8.

127. Icard P, Shulman S, Farhat D, Steyaert JM, Alifano M, Lincet H. How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? *Drug Resistance Updates*. 2018 May 1;38:1–11.
128. Fukushi A, Kim H Do, Chang YC, Kim CH. Revisited Metabolic Control and Reprogramming Cancers by Means of the Warburg Effect in Tumor Cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2025 Jan 22];23(17):10037. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9456516/>
129. Pinto JA, Rolfo C, Raez LE, Prado A, Araujo JM, Bravo L, et al. In silico evaluation of DNA Damage Inducible Transcript 4 gene (DDIT4) as prognostic biomarker in several malignancies. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).

EKLER

EK 1: ETİK KURUL KARARI



EK 2: DDIT4 GENİNİN FARKLI KANSERLERDEKİ ROLÜ İLE İLGİLİ LİTERATÜR ÖZETİ

Kanser Türü	Kullanılan Materyal	Verisetinde Bulunan veya Kullanılan Hasta Örnek Sayısı	Tümör-Normal Karşılaştırması	Evre/Grade	Metastaz	Nüks	Sağkalım
Meme Kanseri	Hücre serileri ve verisetleri	106	Tümörde yüksek ifade profili	İleri evrelerle ilişkili yüksek ifade profili	NA	Nüks ile ilişkili	Düşük sağkalım ile ilişkili
	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri	OS: 3553 RFS: 6131	NA	NA	NA	Nüks ile ilişkili	Düşük sağkalım ile ilişkili (alt tipe göre değişiklik göstermektedir)
Akciğer Kanseri	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri (Chen et al., 2023)	OS: 2831 RFS: 723	NA	NA	NA	Nüks ile ilişkili	Düşük sağkalım ile ilişkili
Gastrik Kanseri	Hücre serileri, insan ve fare doku örnekleri	20 fresh-frozen tumor and adjacent normal	Tümörde yüksek ifade profili	İleri evrelerle ilişkili yüksek ifade profili	NA	NA	NA
	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri (Chen et al., 2023)	OS: 1084 DFS: 148	NA	NA	NA	Nüks ile ilişkili	Herhangi bir ilişki yok
Kolorektal Kanseri	Taze dondurulmuş doku	48 Tumor 48 Adjacent Normal	Tümörde yüksek ifade profili	Herhangi bir ilişki yok	Metastaz ile ilişkili	NA	NA
	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri (Chen et al., 2023)	OS: 675 Recurrence : 750	NA	NA	NA	Nüks ile ilişkili	Düşük sağkalım ile ilişkili
Karaciğer Kanseri	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri (Chen et al., 2023)	OS: 714 Relapse: 517	NA	NA	NA	Herhangi bir ilişki yok	Herhangi bir ilişki yok
Pankreas Kanseri	Hasta dokusu	8	NA	İleri gradelerle ilişkili yüksek ifade profili	NA	NA	NA

	Taze dondurulmuş doku ve FFPE doku	27 fresh-frozen tumor and 27 adjacednt normal 200 FFPE	Tümörde yüksek ifade profili	İleri evrelerle ilişkili yüksek ifade profili	NA	Herhangi bir ilişki yok	Düşük sağkalım ile ilişkili (nükleer ifadesi)
Böbrek Kanseri	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri (Chen et al., 2023)	OS: 707	NA	NA	NA	NA	Herhangi bir ilişki yok
Mesane Kanseri	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri (Chen et al., 2023)	OS: 423	NA	NA	NA	NA	Herhangi bir ilişki yok
Prostat Kanseri	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri (Chen et al., 2023)	Recurrence : 259	NA	NA	NA	NA	Herhangi bir ilişki yok
Yumurtalık Kanseri	FFPE doku	253	Tümörde yüksek ifade profili	İleri evrelerle ilişkili yüksek ifade profili	NA	Nüks ile ilişkili	Düşük sağkalım ile ilişkili
	Hücre serileri	NA	NA	NA	Metastaz ve invazyon ile ilişkili	NA	NA
	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri (Chen et al., 2023)	OS: 1582 PFS : 1306 RFS: 1326	NA	NA	NA	Nüks ile ilişkili	Herhangi bir ilişki yok
Glioblastoma	Hücre serileri ve verisetleri	1004	NA	NA	Metastaz ve invazyon ile ilişkili	NA	NA
	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri (Chen et al., 2023)	OS: 1374	NA	NA	NA	NA	Düşük sağkalım ile ilişkili
Melanoma	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri (Chen et al., 2023)	OS: 177	NA	NA	NA	NA	Düşük sağkalım ile ilişkili
Baş ve boyun kanseri	SurvExpress ve Kmplotter verisetleri (Chen et al., 2023)	OS: 369	NA	NA	NA	NA	Herhangi bir ilişki yok

EK 3: TOPLANAN HASTA VE EŞLİ NORMAL DOKULARINDAN İZOLE EDİLEN RNA ÖRNEKLERİNİN NANODROP MİKTAR VE SAFLIK SONUÇLARI

Tümör Örnekleri					
Örnek ID	Tarih	ng/ul	260/280	260/230	Constant
23-01 T RNA	05.04.2023	465,55	1,96	1,79	40
23-02 T RNA	24.08.2023	443	1,95	2,09	40
23-03 T RNA	25.08.2023	372,52	1,93	2,24	40
23-04 T RNA	24.08.2023	705,57	1,98	2,09	40
23-06 T RNA	24.08.2023	195,01	1,95	1,88	40
23-07 T RNA	24.08.2023	569,46	1,99	2,1	40
23-08 T RNA	24.08.2023	236,28	1,94	2,08	40
23-09 T RNA	24.08.2023	254,67	1,94	2,1	40
23-10 T RNA	25.08.2023	226,19	1,91	2,24	40
23-11 T RNA	25.08.2023	285,14	1,94	2,21	40
23-12 T RNA	25.08.2023	399,77	1,94	2,24	40
23-13 T RNA	25.08.2023	376,23	1,96	2,29	40
23-14 T RNA	25.08.2023	225,69	1,93	2,35	40
23-15 T RNA	25.08.2023	228,23	1,92	2,25	40
23-16 T RNA	25.08.2023	117,09	1,85	2,19	40
23-17 T RNA	13.10.2023	593,72	2,03	2,18	40
23-18 T RNA	13.10.2023	291,29	1,94	2,19	40
23-19 T RNA	13.10.2023	465,24	2	2,19	40
23-20 T RNA	13.10.2023	300,58	1,94	2,09	40
23-21 T RNA	24.11.2023	267,02	1,95	1,84	40
23-22 T RNA	24.11.2023	504	02,04	1,79	40
23-23 T RNA	24.11.2023	372,18	1,98	1,63	40
23-24 T RNA	24.11.2023	538,72	02,02	2,23	40
23-25 T RNA	27.12.2023	570,05	1,99	1,99	40
23-26 T RNA	27.12.2023	478,64	1,93	2,13	40
23-27 T RNA	27.12.2023	513,55	1,99	2,2	40
23-28 T RNA	27.12.2023	449,52	1,95	1,84	40
23-29 T RNA	23.01.2024	608,78	02,01	2,16	40
23-30 T RNA	22.03.2024	253,17	02,06	1,81	40
Normal Örnekleri					
Örnek ID	Tarih	ng/ul	260/280	260/230	Constant
23-01 N RNA	05.04.2023	861,18	2,03	2,17	40
23-02 N RNA	01.09.2023	373,36	1,95	2,2	40
23-03 N RNA	01.09.2023	364,67	1,95	2,2	40
23-03 N RNA	01.09.2023	375,55	1,97	2,18	40
23-04 N RNA	01.09.2023	189,82	1,92	2,12	40
23-03 N RNA	01.09.2023	364,23	1,95	2,13	40
23-06 N RNA	01.09.2023	364,82	1,96	2,2	40
23-07 N RNA	01.09.2023	455,63	2,02	2,24	40
23-08 N RNA	01.09.2023	427,47	1,96	2,16	40
23-09 N RNA	01.09.2023	236,96	1,93	2,3	40

23-10 N RNA	18.09.2023	368,92	1,9	2,08	40
23-11 N RNA	18.09.2023	381,62	1,81	2,12	40
23-12 N RNA	18.09.2023	317,29	1,77	2,22	40
23-13 N RNA	18.09.2023	280,99	1,87	2,24	40
23-14 N RNA	18.09.2023	300,68	1,82	2,06	40
23-15 N RNA	18.09.2023	300,38	1,81	2,19	40
23-16 N RNA	18.09.2023	286,34	1,83	2,14	40
23-17 N RNA	20.10.2023	333,23	1,93	2,22	40
23-18 N RNA	20.10.2023	297,49	1,96	2,12	40
23-19 N RNA	20.10.2023	254,57	1,93	2,06	40
23-20 N RNA	20.10.2023	438,82	1,96	1,98	40
23-21 N RNA	24.11.2023	482,48	2	2,17	40
23-22 N RNA	24.11.2023	462,45	1,92	2,19	40
23-23 N RNA	24.11.2023	508,74	1,98	2,14	40
23-24 N RNA	24.11.2023	452,82	1,97	02,07	40
23-25 N RNA	27.12.2023	565,12	02,02	2,21	40
23-26 N RNA	27.12.2023	203,71	1,91	2,24	40
23-27 N RNA	27.12.2023	446,77	2	2,2	40
23-28 N RNA	27.12.2023	239,85	1,93	2,23	40
23-29 N RNA	23.01.2024	444,79	02,01	02,05	40
23-30 N RNA	22.03.2024	246,86	02,03	2,13	40

EK 4: TOPLANAN HASTA VE ELKİ NORMAL DOKULARINDAN İZOLE EDİLEN PROTEİN ÖRNEKLERİNİN BCA DEĞERLENDİRİLMESİ SONUÇLARI

Tümör Örnekleri		
Örnek ID	Replikaların ortalaması	Protein konsantrasyonu
23-01 T	2,354	11,801
23-02 T	1,795	8,019
23-03 T	1,489	6,522
23-04 T	2,366	10,815
23-05 T	2,044	9,241
23-06 T	1,371	5,942
23-07 T	1,568	6,909
23-08 T	0,980	4,029
23-09 T	1,680	7,458
23-10 T	1,239	5,297
23-11 T	1,165	4,932
23-12 T	1,260	5,397
23-13 T	1,532	6,730
23-14 T	1,012	4,186
23-15 T	1,354	6,372
23-16 T	1,196	5,503
23-17 T	2,303	11,575
23-18 T	1,840	9,034
23-19 T	2,010	9,970
23-20 T	2,611	13,264
23-21 T	1,956	9,674
23-22 T	2,896	14,828
23-23 T	2,538	12,861
23-24 T	2,990	15,343
23-25 T	2,730	13,821
23-26 T	1,673	8,121
23-27 T	0,966	4,244
23-28 T	1,825	8,954
23-29 T	3,190	16,439
23-30 T	1,345	6,323
Eşli-Normal Örnekler		
Örnek ID	Replikaların ortalaması	Protein konsantrasyonu
23-01 N	2,444	12,282
23-02 N	1,54	6,79
23-03 N	1,53	6,71
23-04 N	1,833	9,002

23-05 N	1,77	7,88
23-06 N	1,23	5,27
23-07 N	1,68	8,18
23-08 N	2,67	12,29
23-09 N	1,26	5,42
23-10 N	1,93	8,67
23-11 N	1,23	5,26
23-12 N	1,56	6,86
23-13 N	1,66	7,34
23-14 N	1,75	7,79
23-15 N	1,42	6,75
23-16 N	1,73	8,46
23-17 N	1,96	9,68
23-18 N	2,76	14,10
23-19 N	1,87	9,21
23-20 N	2,16	10,78
23-21 N	2,85	14,59
23-22 N	1,71	8,32
23-23 N	1,97	9,77
23-24 N	1,71	8,32
23-25 N	2,45	12,37
23-26 N	1,52	7,27
23-27 N	1,64	7,94
23-28 N	1,12	5,07
23-29N	2,08	10,34
23-30 T	1,35	6,32

EK 5: TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN GEO VERİ SETLERİ

Geo Accs.	Başlık	Tümör örnek sayısı	Normal örnek sayısı	Varsa eşli örnek sayısı	Method	Platform
GSE10402	A 50-Gene Predictor of Recurrence as a Guide to Therapy in Early-Stage Colon Cancer.	73	0		Microarray	GPL6465 Hs-OperonV2-vB2.2
GSE106535	Gene expression data from colorectal cancers	35	0		Microarray	GPL5175 [HuEx-1_0-st] Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array [transcript (gene) version]
GSE106582	ColoCare Project: Gene expression analysis in colorectal cancer and adjacent mucosa tissues	77	117	Paired (68 tanesi)	Microarray	GPL10558 Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip
GSE110224	Expression data from 17 patients with colorectal cancer	17	17	Paired	Microarray	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE128435	Differences in expression profiling between tumoral colorectal carcinomas subsets and normal tissue and polyps [mRNA]	31	5 Normal 22 Polyp		Microarray	GPL4133 Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F (Feature Number version)
GSE12945	Expression data from colorectal cancers	62	0		Microarray	GPL96[HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array
GSE14333	Expression data from 290 primary colorectal cancers	290	0		Microarray	GPL570[HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE151021	Differentially expressed SE-lncRNAs and mRNA in colorectal cancer	4		U	Microarray	GPL24592 Arraystar Human SuperEnhancer microarray (Agilent-085154)

GSE15781	New specific molecular targets for radiochemotherapy in colorectal cancer	10	10	Paired	Microarray	GPL2986ABI Human Genome Survey Microarray Version 2
GSE17536	Metastasis Gene Expression Profile Predicts Recurrence and Death in Colon Cancer Patients (Moffitt Samples)	177			Microarray	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE17537	Metastasis Gene Expression Profile Predicts Recurrence and Death in Colon Cancer Patients (VMC Samples)	55			Microarray	GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE17538	Experimentally Derived Metastasis Gene Expression Profile Predicts Recurrence and Death in Colon Cancer Patients	238		Unpaired	Microarray	GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE20842	Mutated KRAS induces overexpression of DUSP4, a MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas	65	65	Paired	Microarray	GPL4133 Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F (Feature Number version)
GSE21510	Clinical Significance of Osteoprotegerin Expression in Human Colorectal Cancer	123	25	Cancer pair	Microarray	GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE21815	Gene expression profiles in 132 laser microdissected colorectal cancer tissues	132	9	Unpaired	Microarray	GPL6480 Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F (Probe Name version)
GSE22598	Clinical significance of UNC5B Expression in Colorectal Cancer	17	17	Paired	Microarray	GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE28722	EMT is the dominant program	129		Unpaired	Microarray	GPL13425 Rosetta

	in human colon cancer (Agilent)					custom human 23K array
GSE30378	Gene level expression profiling of colorectal cancer tissue samples (test sample series)	95			Microarray	GPL5175 [HuEx-1_0-st] Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array [transcript (gene) version]
GSE37892	A seven-gene signature aggregates a subgroup of stage II colon cancers with stage III.	130			Microarray	GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE38832	NFAT transcriptional activity is associated with metastatic capacity in colon cancer	123			Microarray	GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE40967	Gene expression Classification of Colon Cancer defines six molecular subtypes with distinct clinical, molecular and survival characteristics	586			Microarray	GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE41258	Expression data from colorectal cancer patients	304	74	Unpaired	Microarray	GPL96 [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array
GSE41657	Gene expression profiling of colorectal normal mucosa, adenoma and adenocarcinoma tissues	76	12	Unpaired	Microarray	GPL6480 Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F (Probe Name version)
GSE44076	Gene expression data from healthy, adjacent normal and tumor colon cells	98	148	Paired	Microarray	GPL13667 [HG-U219] Affymetrix Human Genome U219 Array
GSE44861	Affymetrix expression data from colon cancer patient tissues	111	111	Paired	Microarray	GPL3921 [HT_HG-U133A] Affymetrix HT Human Genome U133A Array

GSE5261	Global activation of embryonic colon gene expression in murine colon tumor models and human colorectal cancer	105				
GSE62322	Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinoteca	21			Microarray	GPL96 [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array
GSE68468	caArray_notte-00422: Molecular Dissection of Colon Cancer	315	75	Paired	Microarray	GPL96 [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array
GSE74602	30 paired normal and tumor colorectal samples	30	30	Paired	Microarray	GPL6104 Illumina humanRef-8 v2.0 expression beadchip
GSE8671	Transcriptome profile of human colorectal adenomas.	32	32	Paired	Microarray	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE92921	Prognostic Model for Stage II/III Colon Cancer Based on Gene Expression Subtypes and KRAS Mutation Status	59			Microarray	GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE9348	Expression data from healthy controls and early stage CRC patient's tumor	70	12	Unpaired	Microarray	GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE29621	mRNA and microRNA profile in colon cancer [mRNA data]	65			Microarray	GPL570 - [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE24551	Exon level expression profiling of colorectal cancer tissue samples	160	13		Microarray	
GSE143985	Clinical significance of gene signature generated from the grade of tumor budding in colorectal cancer	92			Microarray	

GSE198692	Transcriptome of sessile serrated adenoma/polyps shows a relation with MSI-high colorectal cancer and decrease of CDX2		10	Paired	Microarray	
GSE10982	Gene expression profiling of colorectal cancers to understand molecular changes and clinicopathological features	80	4		Microarray	GPL6643 Center for Functional Analysis of Human Genome Human 21K
GSE159216	Gene expression profiling of colorectal cancer liver metastases (CRLM).	283 (colorectal cancer liver metastasis tissue sample)			Microarray	GPL17586
GSE75317	BRAF V600E mutant colorectal cancer subtypes based on gene expression	59			Microarray	GPL570
GSE79460	TGFβ signaling directs serrated adenomas to the mesenchymal colorectal cancer subtype [adenomas]	7 sessile serrated adenomas (SSA) and 9 tubular adenomas (TA).			Microarray	GPL13158
GSE35896	Gene expression data from 62 colorectal cancers	62				GPL570-55999
GSE2138	Colon cancer profiling	20				GPL66
GSE39084	Sporadic early-onset colorectal carcinoma is a distinct clinicopathological and molecular entity	70				GPL570

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Fatma Gülce Demir

Yabancı Dil(ler) ve Seviyesi: İngilizce İleri, Almanca Temel, Yunanca Temel

Öğrenim Bilgileri

<u>Derece</u>	<u>Kurum Adı, Fakülte, Bölüm</u>	<u>Yıllar</u>
Lise	Hüseyin Girenes Fen Lisesi	2012-2016
Lisans	Ortadoğu Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2016-2021
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ABD.	2022-2025

Denevim/İşyeri Bilgileri

<u>Kurum</u>	<u>Görevi</u>	<u>Yıllar</u>
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü	Stajyer (Danışman: Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili)	Ekim 2021- Ocak 2022
ODTÜ Kimya Bölümü	Stajyer (Danışman: Doç. Dr. Emrah Görkem Günbaş	Şubat 2019- Haziran 2021

Yayın ve Bildiriler

1) Demir, F. G., Özdağ, H., Belder, N. Pan-cancer analysis reveals prognostic potential of GTSE1 gene in human cancer. Yayına hazırlanıyor.

Bildiriler

1. Demir, F. G., Tamam, S., Çulcu, S., Savaş, B., Akbulut, H., Özdağ, H., Belder, N. Increased Expression of DNA Damage Inducible Transcript 4 Gene is Associated with Poor Prognosis and 'Right-Sidedness' in Colorectal Cancer, Poster sunumu: EACR-AACR Basic and Translational Research Conference: How to Bring Basic Science Discoveries to the Clinic

2. Demir, F. G., Özdağ, H., Belder, N. Diagnostic Significance and Prognostic Role of the GTSE1 Gene in Cancer, Poster sunumu: 18th Medical Biology and Genetics Congress (26-29 October 2023). The Injector, 2(3)

Novel Targets / Undruggable Targets

Abstract: P-226

Increased expression of DNA damage inducible transcript 4 gene is associated with poor prognosis and 'right-sidedness' in colorectal cancer

F.G. Demir¹, S. Tamam², S. Çulcu², B. Savaş³, H. Akbulut⁴, H. Özdağ Sevgili¹, N. Belder¹

¹Ankara University Biotechnology Institute, Department of Biotechnology, Ankara, Türkiye

²Ankara University School of Medicine, Department of Surgical Oncology, Ankara, Türkiye

³Ankara University School of Medicine, Department of Pathology, Ankara, Türkiye

⁴Ankara University School of Medicine, Department of Medical Oncology, Ankara, Türkiye

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is a complex and heterogeneous disease, one of the leading global causes of cancer-related deaths. Despite advances in diagnosis and therapy, it remains a significant health burden, with over a million cases reported worldwide and about a 33% mortality rate in developed countries. Considering its heterogeneous nature, identifying novel molecules associated with factors like disease stage, location, or mutations is crucial. Using these novel molecular signatures, new personalized treatments can significantly enhance CRC treatment outcomes. DNA damage inducible transcript 4 (DDIT4) plays pivotal roles in various cancers, yet its impact on colorectal cancer (CRC) remains unexplored. This study aims to investigate DDIT4's expression and prognostic significance as a CRC biomarker.

Material and Methods

DDIT4 expression in CRC was evaluated through the TCGA COAD-READ dataset and 14 independent CRC datasets obtained from the GEO database. The association between DDIT4 expression and clinic-pathological features, as well as survival outcomes, was then analyzed. Coexpression and GSEA analysis were also performed to gain insights into the possible underlying mechanisms of the DDIT4 gene in CRC. Tumor and matching normal tissues were also collected, and DDIT4 expression was assessed.

Results and Discussions

Our findings revealed significantly elevated DDIT4 expression in cancer tissues across fifteen independent studies ($p < 0.001$). High DDIT4 expression correlated with shorter overall survival ($p < 0.05$), advanced CRC stages ($p < 0.05$), and recurrence ($p < 0.05$). Moreover, we observed a significant increase in DDIT4 expression in samples from right colon tumors, which are characterized as a more aggressive subtype. DDIT4 expression correlated with specific characteristics of

right colon tumors, including MMR deficiency, microsatellite instability, CIMP phenotype, and BRAF mutation ($p < 0.05$). Co-expression and GSEA analyses suggested DDIT4's involvement in CRC carcinogenesis through hypoxia and epithelial mesenchymal transition (EMT), demonstrated for the first time in this study.

Conclusion

Overall, this study reveals DDIT4's potential oncogenic role in CRC prognosis and its contribution to carcinogenesis mechanisms. This study is the first to associate DDIT4 with 'right-sidedness' in CRC. Furthermore, DDIT4 could serve as a promising prognostic marker allowing early diagnosis for more aggressive right-sided colon cancer and a therapeutic target.

No conflict of interest





XVIII. Medical Biology and Genetics Congress

Holiday Inn Hotel, Ankara | 26-29 October 2023



PP-14

Diagnostic significance and prognostic role of the GTSE1 gene in cancer

Fatma Gulce Demir, Hilal Ozdag Sevgili, Nevin Belder

Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara, Türkiye.



Objective: Our study aimed to elucidate the prognostic value of the GTSE1 gene, which regulates genes in the G2 and S phases of the cell cycle and plays a role in carcinogenesis, including its mechanisms in cancer development.

Methods: We compared GTSE1 expression levels in tumor and normal tissues across various TCGA cancers. Survival analyses were performed using TIMER2.0 and GEPIA2, and GTSE1 genetic alterations were studied with cBioPortal. Validation was done for cancers showing significant results using independent patient datasets from GEO, including correlation with cancer progression and survival. LinkedOmics identified pathways associated with genes positively correlated with GTSE1 in cancer RNA-seq data, and String was used to identify interacting proteins with GTSE1.

Results: When examining 33 cancer types in the TCGA database, GTSE1 showed statistically significant overexpression in 24 types compared to normal tissues and exhibited substantial changes in 17 types at various cancer stages. GTSE1 was found to have a significant negative impact on prognosis in 10 cancer types and was associated with poor disease-free survival in 10 different cancers. CBioPortal found that GTSE1 amplification is high in cancers, with the highest alteration rate at 5.26% in lung cancer. Our analyses obtained significant results for glioma, liver, lung, pancreas, and kidney cancers, which are public health concerns regarding incidence and mortality. We also analyzed independent patient datasets for these cancers, confirming the association between high GTSE1 expression and poor prognosis. LinkedOmics analyses revealed that GTSE1 triggers carcinogenesis in these cancers through cell cycle pathways.

Conclusion: In our study, it has been observed that GTSE1 is highly expressed in many cancer types, affects negatively patients' prognosis. Our findings also suggest that the increase in GTSE1 expression levels may have potential as a novel therapeutic and prognostic target.

Keywords: Bioinformatic analyses, cancer, G2 and S-phase expressed gene, prognostic biomarker.



THE INJECTOR

International peer-reviewed medical journal



Year: 2023 Volume: 2 Issue: 3

www.injectormedicaljournal.com

E-ISSN: 2822-4272

