

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

( YÜKSEK LİSANS TEZİ )

KOLOREKTAL KANSER OLGULARINDA TRPV5, TRPV6  
GENETİK VARYASYONLARININ İNCELENMESİ

SERVET TUNOĞLU

DANIŞMAN  
PROF. DR. Ş. ÜMİT ZEYBEK

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI


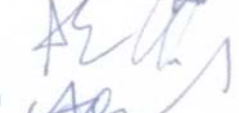



İSTANBUL-2016

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Servet TUNOĞLU tarafından hazırlanan "Kolorektal Kanseri Olgularında TRPV5, TRPV6 Genetik Varyasyonlarının İncelenmesi" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

02 / 05 / 2016

Tez Sınav JürisiÜnvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>              | <u>İmzası</u>   |
|--|---|
| 1. Prof. Dr. İlhan YAYLIM      DETAE      Moleküler Tıp Anabilim Dalı          |    |
| 2. Prof. Dr. Ş.Ümit ZEYBEK      DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı              |   |
| 3. Prof. Dr. Arzu ERGEN      DETAE      Moleküler Tıp Anabilim Dalı            |  |
| 4. Doç Dr. Ali Osman GÜROL      DETAE İmmünoloji Anabilim Anabilim Dalı        |  |
| 5. Yard. Doç. Dr. E. Sinem BİRELLER      İst. Yeniüzyıl Ü. Ecz. Fak. Farm.Mik. |  |

**BEYAN**

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

Servet TUNOĞLU



## İTHAF

Dedem *Salih Toplu*'ya ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. İlhan Yaylım**'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen ve benden desteğini, iyi niyetini hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın **Prof. Dr. Ş.Ümit Zeybek**'e,

Değerli katkılarıyla tezimin tamamlanmasında desteklerini esirgemeyen Sayın **Prof. Dr. H. Arzu Ergen**'e, Sayın **Dr. Özlem Timirci Kahraman**'a,

Bugüne dek attığım adımlarda sevgileri ve destekleriyle yanımda bulunan, bendeki yeri her zaman apayrı olan canım annem **Şaziye Tunoğlu**'na ve babam **Cevdet Tunoğlu**'na, ailemin mutluluk kaynağı kardeşlerim **Mert Tunoğlu**'na ve **Zülal Merve Tunoğlu**'na,

Tez çalışmam boyunca bizzat bulunarak, birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım, sabrıyla ve sevgisiyle desteğini her an hissettiren, hep yanımda olan, varlığıyla en büyük destekçim olan sevgili arkadaşım **M.Sc. Bio. Ezgi Nurdan Yenilmez**'e,

En içten duygularıyla teşekkür eder, şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 53482

## İÇİNDEKİLER

|  |     |
|--|-----|
| TEZ ONAYI .....  | İİ  |
| BEYAN.....   | İİİ |
| İTHAF.....   | İV  |
| TEŞEKKÜR.....  | V   |
| İÇİNDEKİLER .....  | VI  |
| TABLolar LİSTESİ.....  | İX  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....   | X   |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                          | Xİİ |
| ÖZET .....   | XİV |
| ABSTRACT.....  | XV  |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....  | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER .....  | 3   |
| 2.1. Kolorektal Kanser .....                                   | 3   |
| 2.2. Epidemiyoloji.....  | 4   |
| 2.3. Kolorektal Kanser İçin Risk Faktörleri.....               | 7   |
| 2.3.1. Yaşam Tarzı ve Diyete Bağlı Faktörler .....             | 7   |
| 2.3.2. Toplam Kalori ve Obezite.....                           | 7   |
| 2.3.3. Sigara Kullanımı .....                                  | 8   |
| 2.3.4. Aile Hikayesi.....                                      | 8   |
| 2.3.5. İnflamasyonlu Bağırsak Hastalıkları.....                | 8   |
| 2.3.6. Radyasyon.....  | 8   |
| 2.3.7. Kolorektal Polipler .....                               | 8   |
| 2.3.8. Kalıtsal Faktörler.....                                 | 9   |
| 2.3.9. Cinsiyet .....  | 10  |
| 2.3.10. İleri Yaş.....   | 11  |
| 2.3.11. Diğer Faktörler.....                                   | 11  |
| 2.4. Anatomi ve Fizyoloji .....                                | 12  |
| 2.5. Sınıflandırma ve Evreleme .....                           | 13  |
| 2.6. Kolorektal Kanser Genetiği ve Moleküler Mekanizması ..... | 14  |
| 2.7. İyon Kanalları, TRPV5 ve TRPV6 .....                      | 15  |

|   |    |
|---|----|
| 2.8. İyon Kanalları ve Kanser .....   | 21 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....  | 22 |
| 3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı .....  | 22 |
| 3.1.1. Çalışmaya Alınma Ölçütleri.....  | 22 |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....   | 22 |
| 3.1.3. Kullanılan Gereçler .....  | 23 |
| 3.2. Kullanılan Çözeltiler .....  | 24 |
| 3.2.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer).....                                    | 24 |
| 3.2.2. 0,5M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (pH 8,0) .....                          | 25 |
| 3.2.3. 4M Sodyum Klorür (NaCl).....   | 25 |
| 3.2.4. Lökosit Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL).....                       | 25 |
| 3.2.5. 1M Tris Tamponu (Stok) .....   | 25 |
| 3.2.6. 9,5M Amonyum Asetat.....   | 25 |
| 3.2.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).....   | 25 |
| 3.2.8. Proteinaz K (20 mg/ml).....  | 25 |
| 3.2.9. Etidyum Bromür (10 mg/ml) .....  | 26 |
| 3.2.10. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE) Tamponu .....                    | 26 |
| 3.2.11. DNA Taq Polimeraz Enzimi (5U/ $\mu$ l).....                                       | 26 |
| 3.2.12. 10X DNA Taq PZR Tamponu (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 'lü ..... | 26 |
| 3.2.13. MgCl <sub>2</sub> (25mM/ml) .....   | 26 |
| 3.2.14. dNTP'ler (100 $\mu$ mol/ml) .....   | 26 |
| 3.2.15. Primerler.....  | 26 |
| 3.3. Kullanılan Kitler .....  | 26 |
| 3.4. Kullanılan Yöntemler.....  | 27 |
| 3.4.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu .....  | 27 |
| 3.4.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini .....                      | 27 |
| 3.4.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin PZR ile Çoğaltılması .....                           | 28 |
| 3.4.3.1. TRPV5 ve TRPV6 Gen Bölgelerinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması .....               | 30 |
| 3.4.3.2. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması .....   | 32 |
| 3.4.3.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel'e Yüklenecek Kontrol Edilmesi .....                   | 33 |
| 3.4.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....   | 34 |
| 3.4.5. PZR Ürünlerinin Dizi Analizi için Hazırlanması Amacıyla Döngü Dizileme..           | 34 |
| 3.4.6. Döngü Dizileme Ürünlerinin Saflaştırılması .....                                   | 36 |

|  |    |
|--|----|
| 3.4.7. Ürünlerin Dizi Analizi için Cihaza Yüklenmesi .....                   | 36 |
| 3.4.8. Sonuçların Analizi.....   | 37 |
| 3.4.9. İstatistiksel Analiz.....   | 37 |
| 4. BULGULAR.....   | 38 |
| 4.1. Kontrol ve Hasta Grubu Verileri.....                                    | 38 |
| 4.2. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel’de Görüntülenmesi .....                      | 38 |
| 4.3. Saflaştırılmış PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü .....               | 39 |
| 4.4. TRPV5 ve TRPV6 Gen Bölgelerinin Dizilenmesi ve Analizi.....             | 40 |
| 4.5. TRPV Genotiplerinin Hasta ve Kontrol Gruplarında Karşılaştırılması..... | 53 |
| 5. TARTIŞMA .....  | 56 |
| KAYNAKLAR .....  | 61 |
| HAM VERİLER .....  | 75 |
| FORMLAR .....  | 76 |
| GÖNÜLLÜ ONAY FORMU .....   | 79 |
| ETİK KURUL KARARI .....  | 81 |
| PATENT HAKKI İZİNİ .....   | 84 |
| TELİF HAKKI İZİNİ.....   | 85 |
| ÖZGEÇMİŞ .....   | 86 |

**TABLolar LİSTESİ**

|   |    |
|---|----|
| Tablo 2-1 : Polip Tipleri   | 9  |
| Tablo 2-2 : Kolorektal Kansere Yatkınlıkta Bazı Kalıtsal Sendromlar   | 10 |
| Tablo 2-3 : Kolorektal Kansere Risk Faktörleri ve Göreceli Risk   | 11 |
| Tablo 2-4 : Tümör, Nod, Metastaz Değerlendirmesi  | 13 |
| Tablo 2-5 : İnsan ve Fare TRP Kanallarının Hücresel Sentezlenme ve Fiziksel Özellikleri                                   | 19 |
| Tablo 3-1 : TRPV5 Gen Bölgesi için Kullanılan PZR Protokolü   | 30 |
| Tablo 3-2 : TRPV5 Gen Bölgesi için Kullanılan Amplifikasyon Sıcaklıkları  | 31 |
| Tablo 3-3 : TRPV6 Gen Bölgesi için Kullanılan PZR Protokolü   | 31 |
| Tablo 3-4 : TRPV6 Gen Bölgesi için Kullanılan Amplifikasyon Sıcaklıkları  | 32 |
| Tablo 3-5 : Döngü Dizileme Reaksiyon Karışım Protokolü  | 35 |
| Tablo 3-6 : Döngü Dizileme Koşulları  | 35 |
| Tablo 4-1 : Çalışma gruplarına ait veriler  | 38 |
| Tablo 4-2 : KKK Hastalarında TRPV5 rs4252372 ve TRPV6 rs4987667 Gen Polimorfizmlerine Ait Genotip Dağılımları             | 53 |
| Tablo 4-3 : Hasta Grubunda TRPV5 rs4252372 ve TRPV6 rs4987667 Genotiplerinin Klinikopatolojik Parametrelere Göre Dağılımı | 54 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|  |    |
|--|----|
| Şekil 2-1 : 2012 Yılı Dünyada Kanser Görülme Oranları ve Ölüm Oranları .....   | 5  |
| Şekil 2-2 : 2012 Yılı Dünyada Kolorektal Kanser Görülme Oranları ve Ölüm Oranları. 6   |    |
| Şekil 2-3 : Kalın Bağırsak Anatomisi .....   | 12 |
| Şekil 2-4 : Adenokarsinom Sekansı.....   | 15 |
| Şekil 2-5 : İnsan TRP Kanallarının Filogenetik Ağacı .....   | 17 |
| Şekil 2-6 : Öngörülen TRP Kanallarının Yapısal Topolojisi.....   | 17 |
| Şekil 2-7 : A: TRPV5 A8V ve TRPV6 M378V Polimorfizmleri B: TRPV5 ve TRPV6 Yapısal Gösterimi .....  | 20 |
| Şekil 3-1 : PZR aşamaları .....  | 29 |
| Şekil 3-2 : Yükleme Tamponu ile Kuyucuklara Yüklenen PZR Ürünleri.....   | 33 |
| Şekil 3-3 : Sanger Döngü Dizileme Yönteminin Prensibi.....   | 37 |
| Şekil 4-1 : Gen Bölgeleri için Bazı Örneklerin PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü .....  | 39 |
| Şekil 4-2 : Bazı PZR ve Saflaştırmış (Pürifiye Edilmiş) PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....  | 40 |
| Şekil 4-3 : TRPV5 A8V C>T'ye Ait Kromatogram.....  | 40 |
| Şekil 4-4 : 7, 13, 26 Numaralı Hasta Örneklerinin Heterozigot Mutant Alleli ile 20 Numaralı Hasta Örneğinin Homozigot Wild-type Alleline Ait Kromatogram ..... | 41 |
| Şekil 4-5 : 1-4 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 41 |
| Şekil 4-6 : 5-8 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 42 |
| Şekil 4-7 : 10-12, 14 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 42 |
| Şekil 4-8 : 15-18 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 42 |
| Şekil 4-9 : 19, 21-23 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 43 |
| Şekil 4-10 : 24, 25, 27, 28 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 43 |
| Şekil 4-11 : 29-32 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....   | 43 |
| Şekil 4-12 : 1-4 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram .....  | 44 |
| Şekil 4-13 : 5-8 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram .....  | 44 |
| Şekil 4-14 : 9-12 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram .....   | 44 |
| Şekil 4-15 : 13-16 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram .....  | 45 |
| Şekil 4-16 : 17, 20-22 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram .....  | 45 |
| Şekil 4-17 : 23-26 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram .....  | 45 |

|  |    |
|--|----|
| Şekil 4-18 : 27, 29, 31, 32 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 46 |
| Şekil 4-19 : 33-36 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram .....  | 46 |
| Şekil 4-20 : 37-40 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram .....  | 46 |
| Şekil 4-21 : TRVP6 M378V A>G'ye Ait Kromatogram .....  | 47 |
| Şekil 4-22 : 5, 28, 29 Numaralı Hasta Örneklerinin Heterozigot Mutant Alleli ile 6 Numaralı Hasta Örneğinin Homozigot Wild-type Alleline Ait Kromotogram ..... | 47 |
| Şekil 4-23 : 21, 25, 27, 34 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 48 |
| Şekil 4-24 : 13, 19, 26, 35 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 48 |
| Şekil 4-25 : 12, 20, 23, 33 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 48 |
| Şekil 4-26 : 14, 16, 31, 39 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 49 |
| Şekil 4-27 : 10, 22, 24, 36 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 49 |
| Şekil 4-28 : 11, 17, 38, 40 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 49 |
| Şekil 4-29 : 1, 3, 8, 9 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 50 |
| Şekil 4-30 : 7, 6 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 50 |
| Şekil 4-31 : 14, 25, 29, 35 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 50 |
| Şekil 4-32 : 3, 22, 24, 39 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram.....   | 51 |
| Şekil 4-33 : 8, 23, 30, 37 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram.....   | 51 |
| Şekil 4-34 : 17, 20, 28, 38 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 51 |
| Şekil 4-35 : 12, 15, 27, 40 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 52 |
| Şekil 4-36 : 2, 4, 6, 32 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram.....   | 52 |
| Şekil 4-37 : 11, 19, 34, 36 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 52 |
| Şekil 4-38 : 1, 10, 16, 21 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram.....   | 53 |
| Şekil 4-39 : 5, 9, 18 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram.....  | 53 |

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>               | : Kalsiyum İyonu  |
| <b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b> | : Hücre içi Kalsiyum İyonu  |
| <b>µl</b>                            | : Mikrolitre  |
| <b>AIDS</b>                          | : Acquired Immune Deficiency Syndrome/Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu                 |
| <b>AJCC</b>                          | : American Joint Committee on Cancer/Amerikan Kanser Karma Komisyonu                          |
| <b>APAF</b>                          | : Apoptotic Protease Activating Factor/Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör                  |
| <b>APC</b>                           | : Adenomatöz Polipozis Koli   |
| <b>BAX</b>                           | : Bcl-2 İlişkili X Proteini   |
| <b>BCL</b>                           | : Apoptoz Geni  |
| <b>CIN</b>                           | : Kromozomal İnstabilite  |
| <b>dk</b>                            | : Dakika  |
| <b>DNA</b>                           | : Deoksiribonükleik Asit  |
| <b>FAP</b>                           | : Familial Adenomatous Polyposis/Ailesel Adenomatöz Polipozis                                 |
| <b>g</b>                             | : Gram  |
| <b>HNPCC</b>                         | : Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Cancer/Kalıtımsal Polipozis Olmayan Kolorektal Kanserler |
| <b>KRK</b>                           | : Kolorektal Kanser   |
| <b>L</b>                             | : Litre   |
| <b>ml</b>                            | : Mililitre   |
| <b>MLH1/MSH2/MSH6:</b>               | Yanlış-Eşleşme Tamir Genleri  |
| <b>MMR</b>                           | : Miss-Match Repair/Yanlış-Eşleşme Tamir  |
| <b>mRNA</b>                          | : Mesajcı Ribonükleik Asit  |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>MSI</b>                      | : Mikrosatellit İnstabilite  |
| <b>PI3K</b>                     | : Fosfotidilinositol-4,5-bifosfat-3-kinaz  |
| <b>RAD50</b>                    | : DNA Tamir Geni   |
| <b>RFLP</b>                     | : Restrüksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi  |
| <b>ROCCs</b>                    | : Receptor Operated Calcium Channels/Reseptöre Duyarlı Kalsiyum Kanalları                  |
| <b>rpm</b>                      | : Revolutions per minute/Dakikadaki devir  |
| <b>SOCCs</b>                    | : Store Operated Calcium Channels/Depolanmış Kalsiyum Miktarına Duyarlı Kalsiyum Kanalları |
| <b>TCF-4</b>                    | : Transkripsiyon Faktör 4  |
| <b>TGF<math>\beta</math>RII</b> | : Dönüştürücü Büyüme Faktör Beta Reseptör II   |
| <b>TP53</b>                     | : Tümör Baskılayıcı Gen  |
| <b>TRP</b>                      | : Transient Receptor Potential/Geçici Reseptör Potansiyeli                                 |
| <b>TÜİK</b>                     | : Türkiye İstatistik Kurumu  |
| <b>U</b>                        | : Ünite  |
| <b>VOCCs</b>                    | : Voltage Operated Calcium Channels/Voltaja Duyarlı Kalsiyum Kanalları                     |

## ÖZET

Tunoğlu S. Kolorektal Kanser Olgularında TRPV5, TRPV6 Genetik Varyasyonlarının İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2016

Kolorektal kanser, gastrointestinal sistemin en sık görülen kanser türü olup tüm kanser olgularında yaklaşık %10 oranla üçüncü sırada yer alır.

Kolorektal kanser oluşumunda çeşitli çevresel ve genetik faktörler önemli yer tutmaktadır. İyon kanalları, aksiyon potansiyelini düzenleyen ve diğer elektriksel sinyalleri ileten hücre zarına yerleşik proteinler olup kas kasılması ve hormon salınımı gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynar. Kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir.

Vanilloidler, vanilloid almaçları yoluyla faaliyet gösterir. TRPV5 ve TRPV6, vanilloid almaçları ailesinden olan TRP iyon kanalları olup TRPV6, bağırsaklarda yüksek oranda sentezlenirken, onun böbreklerdeki temel izoformu TRPV5'tir. Yapılan çalışmalarda, özellikle prostat kanserinde TRPV6 ekspresyon düzeylerinin hastalık evresinde önemli etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, Sanger Döngü Dizileme yöntemi uygulanan hasta ve kontrol grupları arasında TRPV5 rs4252372 ve TRPV6 rs4987667 genotip dağılımlarında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Hasta grubunda TRPV5 rs4252372 ve TRPV6 rs4987667 genotipleri ile metastaz, kadın cinsiyet ve hastalık evresi arasında bağlantı tespit edilmiştir. Ayrıca, TRPV5 rs4252372 genotipi ile tümör yerleşim yeri arasında bağlantı tespit edilmiştir. İleri evre kolorektal kanserde ve hastalığın metastazında TRPV5 T alleli ve TRPV6 G alleli bulundurmanın riskli olabileceği belirlenmiştir. Bu sonuçlar; TRPV5 ve TRPV6 kalsiyum kanal proteini genlerindeki mutasyonların, kolorektal kanser prognozu üzerinde rol oynayabileceğini belirtmektedir.

Anahtar Kelimeler: kolorektal kanser, kanal proteinleri, genetik varyasyon, geçici reseptör potansiyel vanilloid reseptör, dizileme.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 53482

## ABSTRACT

Tunoglu S. Investigation of Genetic Variations of TRPV5, TRPV6 in Colorectal Cancer Patients. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. Master Thesis. Istanbul. 2016.

Colorectal cancer is the most common gastrointestinal system cancer and the third most frequent cancer with 10% incidence world wide.

Environmental and genetic factors are known to be related with colorectal cancer progression. Ion channels are pore-forming membrane proteins whose functions include regulating action potential and transmitting electrical signals. They play role in physiological processes such muscle contraction and hormone secretion. They have been associated in various human diseases including cancer.

The vanilloids exhibit activity via vanilloid receptors. TRPV5 and TRPV6 are TRP ion channels which belongs to vanilloid receptor family. TRPV6 is highly synthesized in intestine, basic isoform in kidney of TRPV6 is TRPV5. TRPV6 expression levels are reported to be affected with prostate cancer stage especially.

In our study, cases and controls were studied with Sanger Cycle Sequencing method. Significant differences were not detected between TRPV5 rs4252372 and TRPV6 rs4987667 genotypes distributions in cases and controls. Within the patients, both genotypes and the metastasis, female gender and disease stage was related. In addition, TRPV5 rs4252372 genotype and tumor location was related. Presence of TRPV5 T allele and TRPV6 G allele may be risky in late stage colorectal cancer and metastasis. These results indicate the potential role of TRPV5 and TRPV6 calcium channel protein genes mutation on colorectal cancer progression.

Key Words: colorectal cancer, channel proteins, genetic variation, transient receptor potential vanilloid receptor, sequencing.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 53482

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK), gastrointestinal sistemin en sık görülen kanser türüdür. Dünyanın değişik toplumlarında farklı sıklıklarda görülmenin yanısıra, sanayileşmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere daha sık görülmektedir. Kolon ve rektum kanserleri birlikte değerlendirildiği takdirde, erkeklerde prostat ve akciğer, kadınlarda ise meme ve akciğer kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Toplam kanser olgularının yaklaşık %10'unu KRK oluşturmaktadır (1, 2).

KRK'nın erken evrelerinde prognoz iyi olmasına karşın, tümör semptomatik hale geldiği zaman, genel olarak ileri evre olarak değerlendirilir ve buna bağlı olarak ölüm oranı yüksektir. KRK'nın gelişmesi ve ilerlemesi diğer kanserler gibi çoklu genetik değişimlere bağlıdır. Çeşitli moleküler mekanizmalara ve farklı fenotiplere sahip heterojen yapıya sahip bir hastalık olup, normal kolon mukozasının invaziv kansere dönüşümüne yol açan genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesiyle gelişmektedir. KRK karsinogenezinin anlaşılması için tümör gelişimi esnasında meydana gelen moleküler değişikliklerin detaylı olarak araştırılması gerekmektedir (3). KRK karsinogenezinde, normal kolon epitelinin etkilenmesiyle başlayarak, büyüme faktörleri üzerinde de etkisi olan sinyalizasyon sistemi ve bu sistem yollarında bir takım değişiklikler olabilmektedir (4).

İyon kanalları; geçici zar potansiyeli oluşturan, aksiyon potansiyelini düzenleyen ve diğer elektriksel sinyalleri ileten hücre zarına yerleşik proteinlerdir. Tüm hücrelerde bulunan iyon kanalları iyonofor proteinlerin bir grubudur. Sodyum-kalsiyum değiştiricisi, sodyum-potasyum pompası ve sodyum glukoz nakil proteinleri diğer iyonofor proteinleri olarak belirtilmiştir. İyon kanalları, kas kasılması ve hormon salınımı gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynarken kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir (5).

TRP kanal proteinleri ilk olarak *Drosophila melanogaster*'de keşfedilmiştir. TRP gen bölgelerinde mutasyon taşıyan ışığa duyarlı fotoreseptör rodopsinin, sürekli ışık maruziyeti sonucunda aralıklı voltaj farklılığı görülmektedir (6).

Vanilloidler, kapsaisinle ilgili bileşik grupları olmakla birlikte vanilloid almaçları yoluyla faaliyet göstermektedir. Günümüzde, vanilloid almaç ailesi TRP iyon kanallarının (TRPV), TRPV1-6 olmak üzere altı farklı alt üyesi olduğu bilinmektedir; TRPV5 ve TRPV6 yüksek oranda  $Ca^{2+}$ , seçici ve kısmen de  $[Ca^{2+}]_i$  tarafından düzenlenen kanallardır. TRPV6, bağırsaklarda yüksek oranda sentezlenirken, onun böbreklerdeki temel izoformu TRPV5'tir (7,8).

TRPV5 ve TRPV6,  $Ca^{2+}$  homeostazında önemli role sahip olan iki kanal proteindir. Bu bilgi ışığında; çalışmamızda, iki kanal proteininde oluşan bir takım genetik varyasyonların, Türk halkındaki KKK olgularında bir arada incelenerek bu kanallar ve KKK arasındaki ilişkiye farklı bir boyut kazandırmayı amaçladık.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kolorektal Kanser

Kanser; birçok genetik ve epigenetik faktörün etkisiyle, çok aşamalı olarak, kalıtsal ve/veya sonradan kazanılmış mutasyonların somatik hücrelerde birikmesi sonucunda ortaya çıkan genetik bir hastalıktır (9). Ülkemizde Devlet İstatistik Enstitüsü'nün 2015 verilerine bakıldığında; kanser, bütün ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra %40,4 oran ile ikinci sırada yer almaktadır (10). KRK, dünyada akciğer ve meme kanseri ile birlikte en sık görülen malign tümörlerdir. Dünya genelinde KRK'dan kaynaklanan ölüm yaklaşık %9 iken, az gelişmiş ülkelerde bu oran %52'yi bulmaktadır (11).

Moleküler hücre biyolojisi, biyolojik bilimlerin temelini oluşturan ve hızla büyüyen araştırma alanıdır. Watson ve Crick'in DNA yapısını tanımlayan tarihsel makalelerinin yayımlanmasının ardından, 2001'de insan genom dizisi ön çalışmalarının tanıtımını takiben 2003'te dizinin yüksek kalite versiyonu tamamlanmıştır (12, 13). İnsan genom çalışmaları; her insan genomunda DNA'nın %99,9 benzerlik gösterdiğini kanıtlamıştır. Geriye kalan %0,1'lik fark ise bireysel genotip ve fenotipik değişikliklerden sorumludur (14). İnsan genom dizisinin şifresinin çözülmesi, genlerin işlevi ve düzenlenmesi çalışmalarına yeni bakış açıları kazandırmaktadır (15, 16). Ayrıca; moleküler bilgidaki bu hızlı artışla birlikte, tüm genomdaki genlerin ve nükleotit dizilerinin belirlenmesinin ardından genlerin ifade düzeyleri, ifade edilen gen ürünlerinin yapı ve işlevindeki farklılıklarını belirleme çalışmaları, tıp alanındaki klinik uygulamalara ilişkin yeni ufuklar açmış olup kanserden korunma ve kanserin tedavisiyle ilgili olarak yeni imkanlar sunmuştur (17-19).

Evrimsel süreçte; türlerin ve tür üyeleri arasındaki tüm farklılıklardan, genetik çeşitlilik sorumludur. Genlerde; genetik çeşitliliğe yol açan bu değişikliklerden biri polimorfizmdir. Genetik polimorfizmler; çoğunluğu genomda tek nükleotit düzeyinde olmak üzere (insanda on milyon kadar); değişik uzunlukta ikili ya da üçlü nükleotit tekrarlarında değişiklikler ve daha az olarak kromozom düzeyinde bazı yapısal düzenlemeler olmak üzere üç tiptir. Genetik hastalıklar; DNA'daki bir değişiklik sonucu, genin mRNA ya da protein ürününün niteliğinin ve/veya niceliğinin değişmesi sonucu oluşan hastalıklardır (9).

Herhangi bir hastalığın ortaya çıkmasında ve tedavi amacıyla verilen ilaca yanıtta; çevre, yaş, beslenme, yaşam biçimi gibi faktörlerin yanında, kişinin genetik yapı değişikliklerinin de rolü büyüktür. Bu nedenle; toplumların genom yapısındaki değişimlerin ve gen mutasyonlarının çalışılması kanser oluşum riskinin, bireylerdeki ilaç toksisitesi ve etkinliğinin belirlenmesinde etkili olmaktadır. Tek nükleotit değişimleri insan genomunda en çok bulunan, %1'den daha fazla sıklıktaki (ortalama her 1000 nükleotitte bir) DNA dizi değişimleridir.

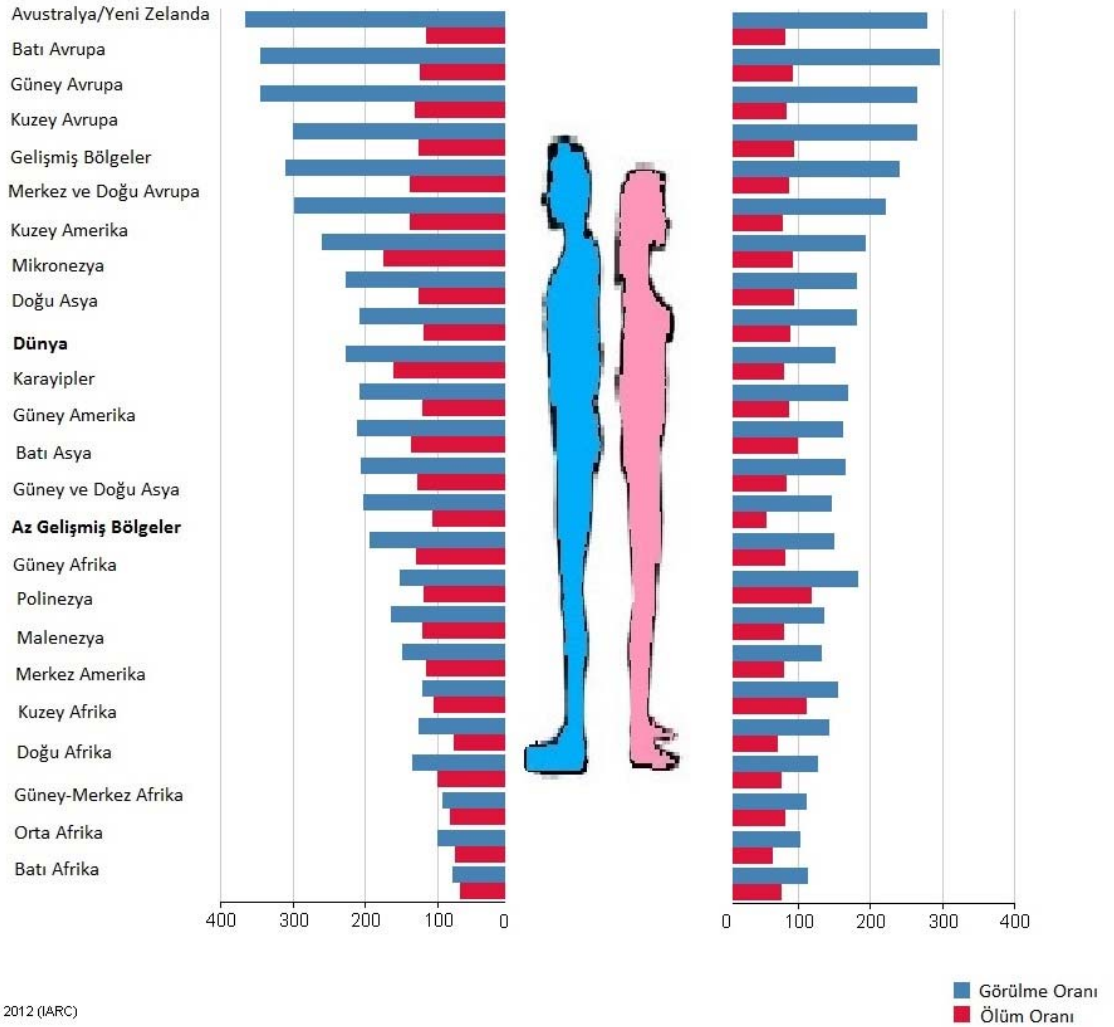
Yüzlerce hücresel işlevin birinden sorumlu olan herhangi bir genin kodlayıcı bölgesindeki değişiklik fenotipi etkiler. Genin ifadesi; yüksek oranda genin promotör veya enhansır gibi düzenleyici bölgeler, bu bölgelere bağlanan transkripsiyon faktörleri ve diğer yardımcı düzenleyici moleküller aracılığıyla kontrol edilmektedir. Gen ifadesi düzenleyici protein genlerinin; kontrol ve kodlayıcı DNA bölgesindeki nükleotit dizi değişiklikleri genlerin ifade edilme düzeyini, yani; ürün oluşumu ve miktarını etkiler. Böylece bir genin ifade edilme düzeyinin kişiden kişiye değişebilmesi, hem genin kontrol bölgesindeki DNA diziliminin hem de bu bölgeye bağlanan düzenleyici transkripsiyon faktörlerinin farklılığından kaynaklanır (20).

## **2.2. Epidemiyoloji**

Dünyada KRK; en güncel olarak, 2012 yılı verilerine göre erkeklerde toplam 746.000 vaka ve %10 oranla en yaygın üçüncü kanser türü olup, kadınlarda 614.000 vaka %9,2 oranla en yaygın görülen ikinci kanser türüdür. Gelişmiş ülkelerde en sık görülen kanser tipleri arasında üçüncü sırada yer almakta olup bütün kanserlerin yaklaşık %9'unu oluşturmaktadır (11).

Yaşam boyu KRK gelişme riski yaklaşık %6'dır. Ortalama görülme yaşı ise 62 olup, hem kadın hem de erkek bireylerde 40 yaşından sonra görülme riski artmaktadır. 75 yaşından önce kansere yakalanma riski %18,5'tir (21, 22).

2012 yılı dünyada kanser görülme oranları ve ölüm oranları Şekil 2-1'de gösterilmiştir.



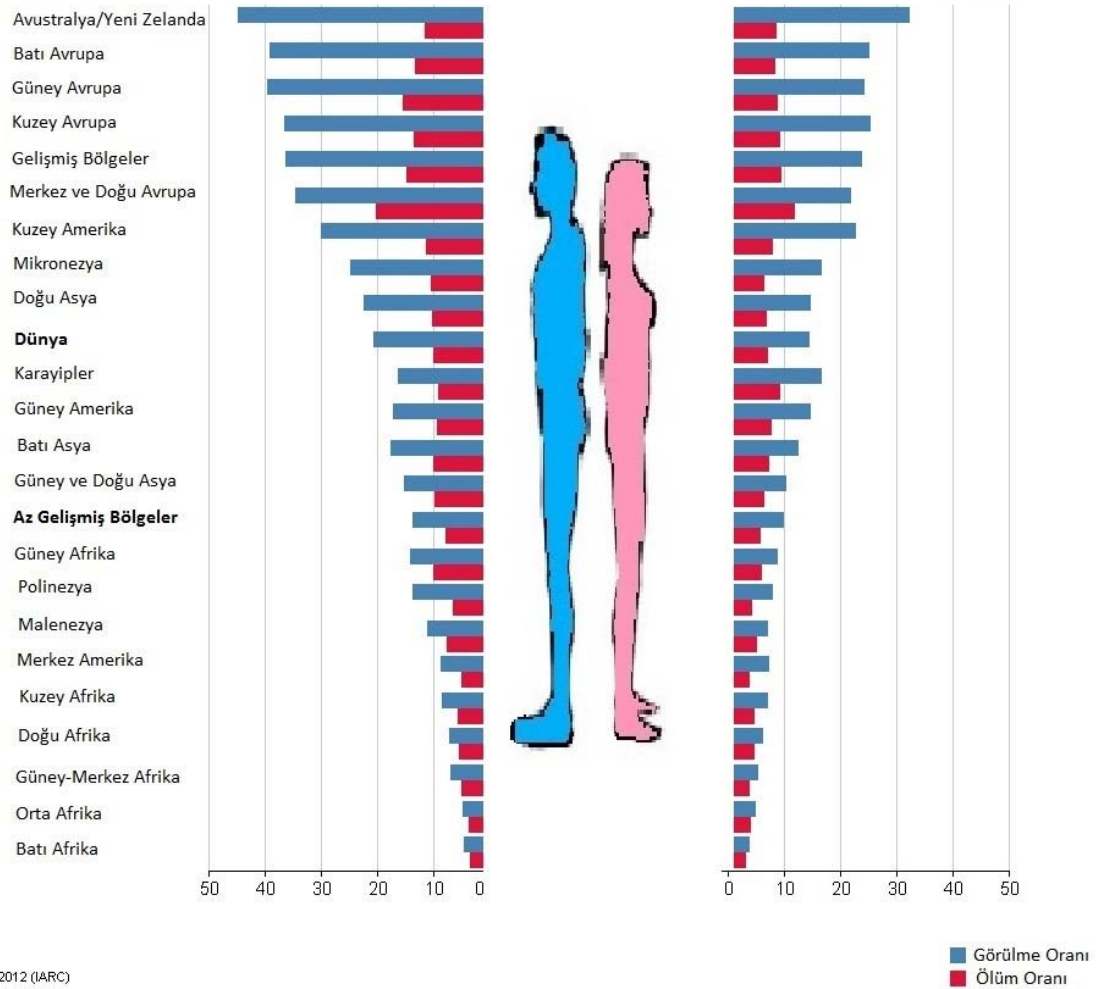
**Şekil 2-1 : 2012 Yılı Dünyada Kanser Görülme Oranları ve Ölüm Oranları (11)**

KRK; erkeklerde akciğer, kadınlarda meme kanserinden sonra kanserden ölüm nedenleri sıralamasında ikinci sırada yer almaktadır (21). Avustralya, Batı Avrupa, İskandinavya, Kuzey Amerika gibi gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada yaygın olarak rastlanan ve kanser ile ilişkili ölümlerin yaklaşık %10'u KRK kaynaklıdır.

Hastalık; Avrupa ve Amerika'da yaygın görülürken, Asya ve Afrika'da görülme oranı azalmaktadır. 60-70 yaşlarında en yüksek düzeye ulaşmaktadır (23). Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda, Avustralya gibi endüstriyel ülkelerde görülme sıklığı yüksektir. Polonya ve Japonya gibi risk oranı düşük bölgelerden Avustralya, Amerika

Birleşik Devletleri gibi risk oranı yüksek bölgelere göç edenlerde KRK görülme oranları hızlı bir artış göstermektedir. Gelişmişlik düzeyinin arttığı bölgelerde KRK görülme oranı da doğru orantılı olarak artmaktadır (24, 25). Türkiye’de 2012 yılındaki genel kanser insidansı 100.000’de 233,0’dır. Erkek kanser insidansı 100.000’de 277,7 ve KRK insidansı 8,9’dur , kadın kanser insidansı 100.000’de 188,2 ve KRK insidansı 8,9’dur (26).

2012 yılı dünyada kolorektal kanser görülme oranları ve ölüm oranları Şekil 2-2’de gösterilmiştir.



Şekil 2-2 : 2012 Yılı Dünyada Kolorektal Kanser Görülme Oranları ve Ölüm Oranları (11)

### **2.3. Kolorektal Kanser İçin Risk Faktörleri**

KRK etiyojisi karmaşık olmakla beraber çevresel ve genetik faktörlerin etkileşiminden meydana gelmektedir. KRK etiyojisinde; yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları, obezite, sigara ve/veya alkol kullanımı, kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları, radyasyona maruz kalma, aile hikayesi (familyal adenomatoz polipozis (FAP) ve diğer otozomal dominant gastrointestinal polipozis sendromları), genetik faktörler, cinsiyet, ileri yaş, adenomlar ve *Diabetes mellitus* gibi bazı kronik hastalıklar rol almaktadır.

#### **2.3.1. Yaşam Tarzı ve Diyete Bağlı Faktörler**

Fiziksel aktivitenin minimum düzeyde olan bir yaşam tarzı KRK için yüksek risk faktörlerinden biridir. Yağ oranı yüksek diyetler de KRK riskini arttırmaktadır. Bu nedenle, yağ oranı düşük olan balık ve kümes hayvanları ürünlerinin tüketimi tavsiye edilmektedir (27). Hayvansal protein içeren kırmızı et tüketimi KRK'dan bağımsız bir etken olarak görülmektedir. Lifli, yeşil yapraklı sebzeler ve meyveler gibi antioksidan kaynaklarının kanser oluşumunu baskıladığı görülmüştür. C vitamininin, tokoferoller ve selenyumun bağırsak epitelini kuvvetli mutajen olan fekapentanlardan ve diğer karsinojenlerin hasarından koruduğu belirtilmektedir. C vitamini, nitritlerin nitrosamine ve nitratlara dönüşümünü engelleyen bir antioksidandır. Sarımsağın; detoksifiye enzim içermesi, tümör çoğalmasına engel olması veya antibakteriyel aktivitesi bakımından KRK riskini azalttığı görülmüştür. Alkol tüketimi de normal olmayan DNA metilasyonundan dolayı KRK ve adenom görülme riskini arttırmaktadır. Yeşil çay ve kahvenin KRK gelişimine karşı koruyucu olabildiği düşünülmektedir (4, 27-30).

#### **2.3.2. Toplam Kalori ve Obezite**

Yapılan çalışmalarla, toplam kalori alımı ve obezitenin KRK için bağımsız risk faktörleri oldukları belirlenmiştir. Vücut kitle indeksindeki artışın KRK riskini erkeklerde 2 kat arttırdığı gösterilmiştir (1).

Özellikle abdominal bölgede yağlanma ve vücut kitle indeksinin yüksek olması KRK riskini arttırmaktadır. Fiziksel aktivitesi az, fazla kilolu erkeklerde KRK gelişim riski yüksektir (4, 27, 28).

### 2.3.3. Sigara Kullanımı

Tütün kullanımı rektal kanser ve adenom görülme sıklığını önemli ölçüde arttırmaktadır. İlk kullanım yaşının erken olması ve yıllık içilen paket sayısının fazlalığı kanser görülme riskini arttırmaktadır (25, 28).

### 2.3.4. Aile Hikayesi

Birinci derece yakın akrabalarında KRK görülen bireylerde; kansere yakalanma riski diğer bireylere göre daha yüksek olabilmektedir. Özellikle, bir kişide KRK görülebilme oranı, yakın akrabası olan bireyde genç yaşlardayken KRK görülmüşse daha yüksektir (31).

### 2.3.5. İnflamasyonlu Bağırsak Hastalıkları

KRK gelişiminde önemli bir risk faktörü olan inflamasyon, yıllık olarak, görülen tüm KRK'ların %2'sinin daha azından sorumludur. İnflamasyon bağırsak hastalığı olan bireylerde hastalığın görülmesinden itibaren 8-10 yıl sonra KRK riski artmaya başlar. Ancak yine de bu yatkınlığı aydınlatan genetik bir temel bulunamamıştır. İnflamasyonlu bağırsak hastalığı KRK'lı bireylerde ölüm oranını arttırmaktadır (32, 33).

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı, kolon ve rektum mukozalarının iltihaplanmasıyla oluşur (34). Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı bulunanlarda KRK gelişme riski artış göstermektedir. Ülseratif kolitte 4,4 kat, Crohn hastalığında ise 3 kat artmış risk vardır. Kanser gelişimi, hastalığın süresi ve tutulan bölgenin genişliği ile ilgilidir (25, 28).

### 2.3.6. Radyasyon

Radyasyon, KRK etiyolojisinde çok az rol oynamaktadır. Uterus, prostat ve servikal karsinomların tedavisinde radyoterapi gören hastalarda rektal kanserin çok daha sık ortaya çıktığı görülmüştür (28).

### 2.3.7. Kolorektal Polipler

KRK'ların çoğu kanser öncüsü sayılan polip zemininden gelişir. Polipler, kolon ve rektumun iç yüzeyini döşeyen hücre gruplarının bağırsak lümeni içine uzanmasıyla oluşurlar. Poliplerin çoğu semptomatik olmamakla birlikte; en önemli klinik belirtisi rektal kanama olarak görülmektedir (35-37).

Kolorektal polip tipleri Tablo 2-1'de verilmiştir.

**Tablo 2-1 : Polip Tipleri (37)**

| Nonneoplazik Polipler              |   |   | Neoplazik Polipler |   |
|------------------------------------|---|---|--------------------|---|
| Hiperplazik                        | Hamartomatöz                            | İltihabi  | Benign (Adenom)    | Malign  |
| - Geniş Tip                        | - Peutz Jeghers                         | - Basit İltihabi Polip                            | - Tübüler          | - Noninvaziv karsinom (karsinoma insitu ve intramukozal karsinom) |
| - Adenom alanları içeren tip       | - Cowden Hastalığı                      | - İltihabi, lenfoid, fibroid, granülatöz stromalı | - Tübülovilloz     | - İnvaziv karsinom (muskularis mukozayı geçmiş)                   |
| - Mikst hiperplazik-adenomatöz tip | - Juvenil polip<br>- Ganglionöromatozis | - Lenfoid tip                                     | - Villoz           |   |

### 2.3.8. Kalıtsal Faktörler

Gastrointestinal kanalda binlerce polipin oluşmasıyla karakterize olan kalıtsal kolorektal polipozis sendromları bilinmektedir. FAP, Gardner Sendromu ve Turcot Sendromu adenomatöz sendromlardandır (38, 39).

FAP, otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır (40). FAP tanısı, FAP ailesi bireylerinden birinde adenom saptanması ya da kolonda 100'ün üzerinde adenomatöz polip bulunmasıyla konur. 5. kromozomun q21 lokusunda bulunan APC geninde ortaya çıkan hasarın, FAP'tan sorumlu olduğu bilinmektedir (41).

Gardner Sendromu'nda; adenomatöz polipozisle birlikte, sert ve yumuşak dokularda tümörlerin görülmesiyle karakterize olan kolon poliplerinden kanser gelişme riski %95'in üzerindedir. Turcot Sendromu'nda ise, kolonda adenomatöz polipozisle birlikte merkezi sistem tümörleri de yer alır ve otozomal resesif geçişlidir (42).

Peutz-Jeghers Sendromu, Familial Juvenil Polipozis, Cronkhite-Kanada Sendromu ve Cowden's Hastalığı, adenomatöz olmayan polipozis sendromlardır.

Peutz-Jeghers Sendromu; ince bağırsaklar başta olmak üzere tüm gastrointestinal kanal boyunca hamartomatöz polipler ve vücudun değişik bölgelerinde mukokutanöz pigmentler ile birlikte karakterize olup, otozomal dominant geçişli ailesel bir hastalıktır. Familial Juvenil Polipozis; kolon ve rektumda multipl juvenil hamartomatöz poliplerle karakterize olmakla birlikte, polipler mide ve ince bağırsakta da görülebilmektedir. Kanserleşme riski çok azdır. Cronkhite-Kanada Sendromu yine

gastrointestinal kanalda juvenil poliplerin ortaya çıktığı bir hastalıktır. Cowden's Hastalığı otozomal dominant geçişlidir. Multipl küçük polipler, genellikle rektosigmoid bölgede yerleşim göstermektedir. Polipler üst gastrointestinal sistemde de görülürler (38, 39).

Bu sendromların yanı sıra kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanserler (HNPCC) de bulunmaktadır. HNPCC'ler, Lych sendromu olarak da bilinir ve tüm vakaların %2-3'ünü oluşturmasıyla en sık görülen sendromdur. MLH1, MSH2 gibi DNA tamir genlerindeki mutasyonların HNPCC'ye yol açtığı bilinmektedir (41).

Kolorektal kansere yatkınlıkta bazı kalıtsal sendromlar Tablo 2-2'de verilmiştir.

**Tablo 2-2 : Kolorektal Kansere Yatkınlıkta Bazı Kalıtsal Sendromlar (40, 43)**

| <b>Kalıtsal Sendrom</b>                   | <b>Kolorektumda Meydana Gelen Semptomlar</b>   | <b>Etkilenen Gen</b> |
|---|--|----------------------|
| Ailesel adenomatöz polipozis (FAP)        | Multipl adenomatöz polipler, karsinom          | APC                  |
| Gardner                                   | Multipl adenomatöz polipler, karsinom          | APC                  |
| Peutz-Jeghers                             | Hamartomatöz polipler, karsinom                | LKB1 (STK11)         |
| Cowden's                                  | Sık görülen hamartomatöz, artan karsinom riski | PTEN                 |
| Juvenil Polipozis                         | Polipler, artan karsinom riski                 | SMAD                 |
| Hereditör Non-Polipozis Kolorektal Kanser | Karsinom, polipler                             | MSH2, MLH1, PMS2     |

### 2.3.9. Cinsiyet

KRK görülme sıklığı; kadın ve erkekler arasında benzer olmakla beraber, kolon kanseri kadınlarda, rektum kanseri ise erkeklerde daha sık görülmektedir (44, 45).

### 2.3.10. İleri Yaş

KRK için en önemli risk faktörleri yaş ve genetikdir. KRK'nın görülme sıklığı; ilerleyen yaşla (50 yaşından sonra) birlikte %90'a ulaşırken, 60-70 yaş arasında zirve yapmaktadır (43-49).

### 2.3.11. Diğer Faktörler

*Diabetes mellitus*, pernisiyöz anemi, çölyak ve AIDS hastalarında da kolorektal adenokarsinom gelişme riski artabilmektedir (28).

Amerikan Kanser Birliği, yapılan çalışmalara paralel olarak KRK risk faktörlerini ve göreceli risklerini belirlemiştir (Tablo 2-3) (50). KRK risk faktörlerinin göreceli riskinin 1'in üzerinde olması yüksek riski, 1'in altında olması ise düşük riski göstermektedir.

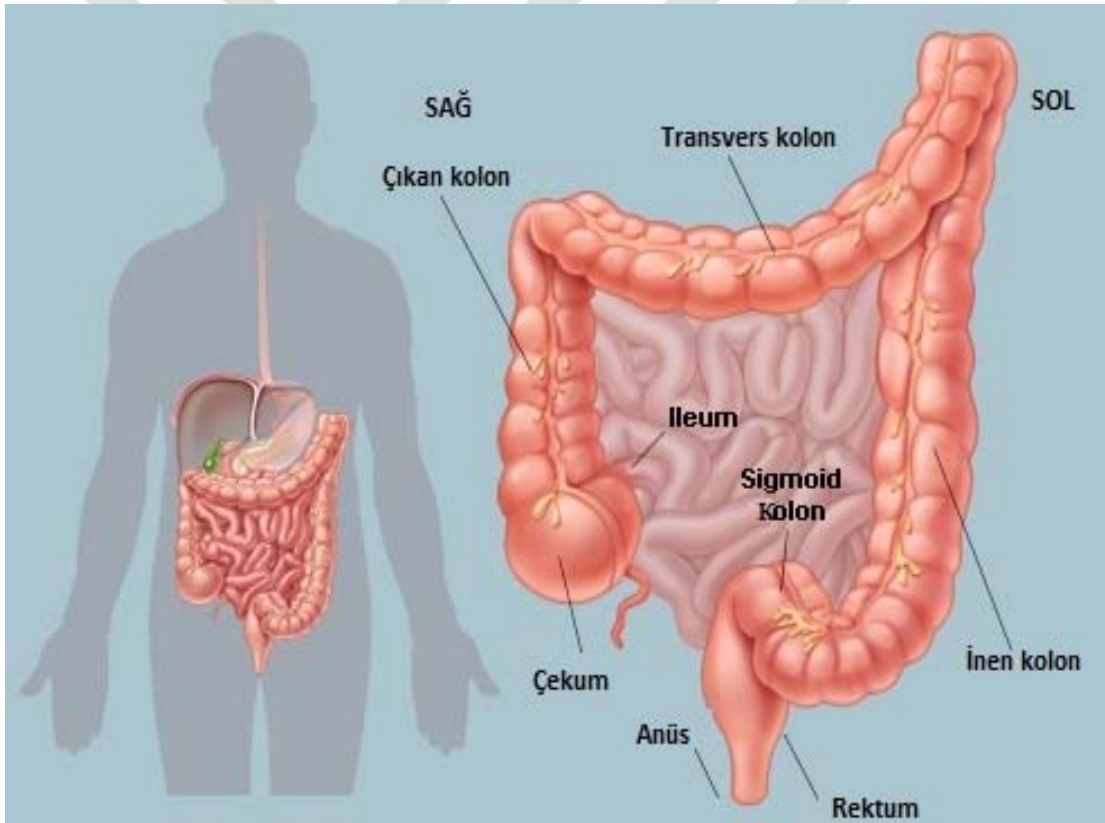
**Tablo 2-3 : Kolorektal Kanser Risk Faktörleri ve Göreceli Risk (50)**

| Riski Arttıran Faktörler              | Göreceli Risk |
|---------------------------------------|---------------|
| <b>Aile Öyküsü ve Genetik</b>         |               |
| 45 yaşından önce teşhis edilen akraba | 3,9           |
| Birinci derece akraba                 | 4,0           |
| Birden fazla akraba                   | 2,2           |
| <b>Kişisel Öykü</b>                   |               |
| Crohn Hastalığı                       | 2,6           |
| Ülseratif Kolit                       |               |
| -Kolon                                | 2,8           |
| -Rektum                               | 1,9           |
| Diyabet                               | 1,2           |
| <b>Davranışsal Risk Faktörleri</b>    |               |
| Sigara İçme                           | 1,2           |
| Obezite                               | 1,2           |
| Kırmızı Et Tüketimi                   | 1,2           |
| İşlenmiş Et Tüketimi                  | 1,2           |
| Aşırı Alkol Tüketimi                  | 1,6           |
| <b>Riski Azaltan Faktörler</b>        |               |
| Fiziksel Aktivite (Kolon)             | 0,7           |
| Meyve ve Sebze Tüketimi               | 0,9           |
| Süt Ürünleri Tüketimi                 | 0,8           |
| Lif Tüketimi (10gr/gün)               | 0,9           |

#### 2.4. Anatomi ve Fizyoloji

Sindirim sisteminin bir kısmını oluşturan kalın bağırsakta ortaya çıkan kanserler KRK olarak adlandırılmaktadır. Kalın bağırsak, ileumun bitiminden başlayıp anüse kadar devam etmektedir. Yaklaşık 150 cm uzunluğunda olup sindirim kanalının 1/5'ini oluşturan kalın bağırsak; çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum olmak üzere 6 bölümden oluşmuştur. Kolon, sağ ve sol kolon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Sağ kolon, sol kolondan daha geniş çaplıdır. Yaklaşık 7,5-8,5 cm çapı ve ortalama 6 cm uzunluğuyla kolonun en geniş bölümü çekumdur. Kolon, sigmoid kolona doğru giderek daralır ve en dar yeri 2,5 cm çapındadır.

Şekil 2-3'te kalın bağırsak anatomisi gösterilmiştir.



Şekil 2-3 : Kalın Bağırsak Anatomisi (51)

Sigmoid tümörler küçük boyutlarda belirti gösterebilirken, çekum tümörleri büyük boyutlara erişmeden belirti göstermezler (52, 53). Anüsten önceki 12-15 cm'lik kısım rektumdur ve sigmoid kolon ile anal kanal arasında sakrum eğikliğine uygun olarak yerleşmiştir (54). Kolon duvarı tabakaları sırasıyla; mukoza, submukoza, içte sirküler kaslar, dışta uzun kaslar ve serozadır. Kolonik mukozanın epitel hücrelerinde meydana gelen genetik değişiklikler hastalığın net sebebi olarak görülebilmektedir (29, 55). Günlük olarak yaklaşık 600-1000 ml ileum içeriği (%90'ı su) kolona geçmektedir. Ancak dışkı ile atılan su miktarı 180 ml düzeyindedir. Su emiliminin hemen tamamı çekum ve çıkan kolonda gerçekleşir. Ayrıca kolondan sodyum, klorür, sakkaroz ve laktoz da emilmektedir.

## 2.5. Sınıflandırma ve Evreleme

Evreleme sistemleri, kanserin yayılım derecesini saptamak, tedaviyi planlanmak ve prognoz tahmininde bulunmak için kullanılmaktadır. Bu amaçla kolorektal kanser için de günümüzde en sık kullanılan evreleme TNM (T=Tümör, N=Nod, M=Metastaz) (Tablo 2-4) olarak bilinen AJCC (American Joint Committee on Cancer) sınıflandırmasıdır. Bunun yanında Dukes ve Astler-Coller gibi sınıflandırma sistemleri de kullanılmaktadır (56).

**Tablo 2-4 : Tümör, Nod, Metastaz Değerlendirmesi (56)**

|   |
|---|
| <b>T:</b> Primer Tümör  |
| <b>Tx:</b> Primer tümör değerlendirilemiyor.  |
| <b>T0:</b> Primer tümör yok   |
| <b>Tis:</b> Karsinoma in situ   |
| <b>T1:</b> Tümör submukozaya yayılmış   |
| <b>T2:</b> Tümör muskularis propriaya yayılmış  |
| <b>T3:</b> Tümör muskularis propria içinden subseroza ya da nonperitoneal periferik veya perirektal dokulara yayılmış |
| <b>T4:</b> Tümör diğer organlara ya da viseral peritona yayılmış  |
| <b>N:</b> Bölgesel lenf nodları   |
| <b>Nx:</b> Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor  |
| <b>N0:</b> Bölgesel lenf nodu metastazı yok   |
| <b>N1:</b> 1-3 bölgesel lenf nodunda metastaz   |
| <b>N2:</b> 4 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz   |
| <b>N3:</b> Ana arter kökünde lenf nodu tutulumu   |
| <b>M:</b> Uzak metastaz   |
| <b>Mx:</b> Uzak metastaz değerlendirilemiyor  |
| <b>M0:</b> Uzak metastaz yok  |
| <b>M1:</b> Uzak metastaz var  |

## 2.6. Kolorektal Kanser Genetiği ve Moleküler Mekanizması

KRK; çeşitli moleküler mekanizmalara ve farklı fenotiplere sahip heterojen bir hastalık olup, normal kolon mukozasının invaziv kansere dönüşümüne yol açan genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesiyle gelişmektedir. Hücre metabolizması, proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve sağkalım gibi sinyal yolları regülasyonunun kaybına yol açan birtakım genetik ve epigenetik modifikasyonlar kolorektal kanser gelişiminde etkilidir (57, 58). KRK oluşumunda, normal kolon epitelinin değişimiyle başlayan ve adenomatöz ile adenokarsinomaya kadar devam eden olaylar dizisi meydana gelmektedir (59, 60).

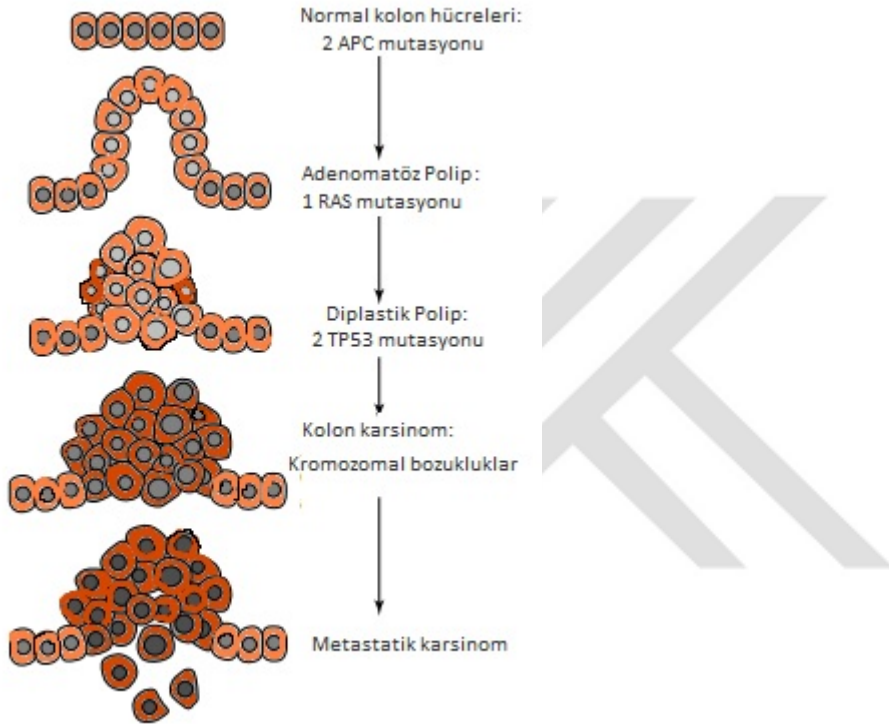
KRK oluşumunda etkili role sahip olan genomik instabilitenin oluşumu ile ilgili bugüne kadar, üç moleküler mekanizma tanımlanmıştır. İlki, kromozomal instabilite (CIN) olup KRK'daki genomik instabilitenin en sık nedenlerinden biridir. İkincisi, kalıtsal kanserlerin bir alt grubunda yer alan mikrosatellit instabilitesi (MSI) olup sporadik KRK olgularının %20'sinde gözlenir ve yanlış-eşleşme onarım (MMR/mismatch repair) genlerindeki defektlerle ortaya çıkar. Üçüncüsü ise CpG adacık metilatör fenotipi olarak tanımlanan, birçok genin promotör bölgesindeki CG dinükleotitlerinin birbiriyle uyumlu olan metilasyonlarıdır (58, 61).

Kromozomal instabilitesi olan tümörlerin kromozom sayısında, artış veya azalış şeklinde karyotipik değişiklikler görülebilmektedir (62, 63). Anöploidi bu tür tümörlerin karakteristik özelliği olup, allel kayıpları bir veya birden fazla lokusun dahil olduğu (5q, 17p ve 18q) allelik dengesizliklerle sonuçlanmaktadır (64). Bu durumun başlatıcı faktörü olarak, tümör baskılayıcı bir genin kaybı düşünülmektedir. 5q ve 17p allellerindeki kayıp APC, DCC/SMAD4 ve TP53 inaktivasyonunu kolaylaştırırken, 18q allel kaybı II. ve III. evre kolorektal kanserler için kötü prognoz belirteci olarak bilinmektedir (65-67).

Mikrosatellit instabilitesi, tümör DNA dizilimindeki nükleotit tekrarlarından oluşan kısa uzunluk değişiklikleri olarak bilinmekte olup yanlış-eşleşme tamir genlerinde inaktivasyona sebebiyet vermekte ve KRK'ların %6-15'inde görülmektedir (68). DNA onarım, (RAD50, MSH2, MSH6, MLH1, BLM), hücre döngüsü (PTEN), sinyal iletimi (TGF $\beta$ RII, ACTRII, WISP-3), apoptoz (APAF1, BAX, BCL10, Kaspaz-5) ve transkripsiyon faktörleri (TCF-4) genlerinin mikrosatellit instabilitesiyle tekrar kodları oluşturması, KRK mutasyonlarının oluşmasına sebep olmaktadır (56, 69).

KRK gelişiminde, kromozomal instabilite yolağı olarak da bilinen, normal kolon epitelinin değişimiyle başlayan ve adenokarsinomaya kadar devam eden “adenokarsinom sekansı” denilen olaylar serisi gerçekleşmektedir. Adenokarsinom sekansında; APC, p53 ve k-RAS genlerinin yanı sıra PI3KCA ve TGFβR genlerinde birtakım genetik değişiklikler görülebilmektedir (56, 70).

Şekil 2-4’te “adenokarsinom sekansı” gösterilmiştir.



Şekil 2-4 : Adenokarsinom Sekansı (12)

## 2.7. İyon Kanalları, TRPV5 ve TRPV6

İyon kanalları; geçici zar potansiyeli oluşturan, aksiyon potansiyelini düzenleyen ve diğer elektriksel sinyalleri ileten hücre zarına yerleşik proteinlerdir. Tüm hücrelerde bulunan iyon kanalları iyonofor proteinlerin bir grubudur. Sodyum-kalsiyum değiştiricisi, sodyum-potasyum pompası ve sodyum-glukoz nakil proteinleri diğer iyonofor proteinleri olarak belirtilmiştir (72). Sodyum, kalsiyum ve potasyum gibi iyonik maddelerin hücre içerisine alınması sürecinde rol almaktadırlar.

Kalsiyumun evrenselliği; yaşamın ilk basamağı olan fertilizasyondan başlayarak kas kasılması, hormon salınımı, hafıza, öğrenme, hücrelerin farklılaşması, gelişmesi, nekroz ve apoptoz, gen transkripsiyonu gibi birçok olaydan sorumlu olan bir hücre içi ikincil haberci olan, birçok hücrel reaksiyonda üstlendiği görevden kaynaklanmaktadır. İstirahat halindeki bir hücrede hücre içi kalsiyum ( $[Ca^{2+}]_i$ ) konsantrasyonu yaklaşık olarak 100 nM civarındadır. Kalsiyum iyonunun; kas kasılması, transmitter madde salınımı, hücre bölünmesi, genlerin ifadesi ve hücre sağkalımı/ölümü gibi birçok hücrel olayda ortamda yeteri miktarda bulunması ve hücre içerisine/dışarisına geçişi oldukça önemlidir (113). Kalsiyumun hücre içine alınmasında görevli kanallar bulunmaktadır.

Bu kanallar kalsiyumun hücre içerisine girmesine neden olabilecek aktivasyon mekanizmalarına göre;

-Mekanik olarak aktive olan kalsiyum kanalları (mechanically activated calcium channels),

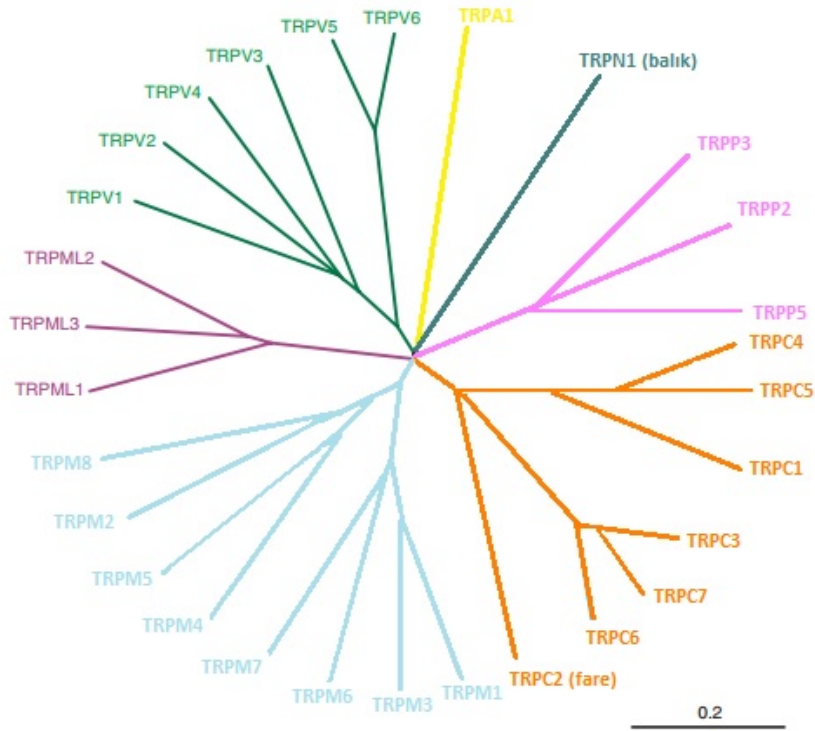
-Reseptöre duyarlı kalsiyum kanalları (ROCCs: receptor operated calcium channels),

-Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları (VOCCs: voltage operated calcium channels),

-Depolanmış kalsiyum miktarına duyarlı kalsiyum kanalları (SOCCs: store operated calcium channels) olarak sınıflandırılmaktadır (72, 73).

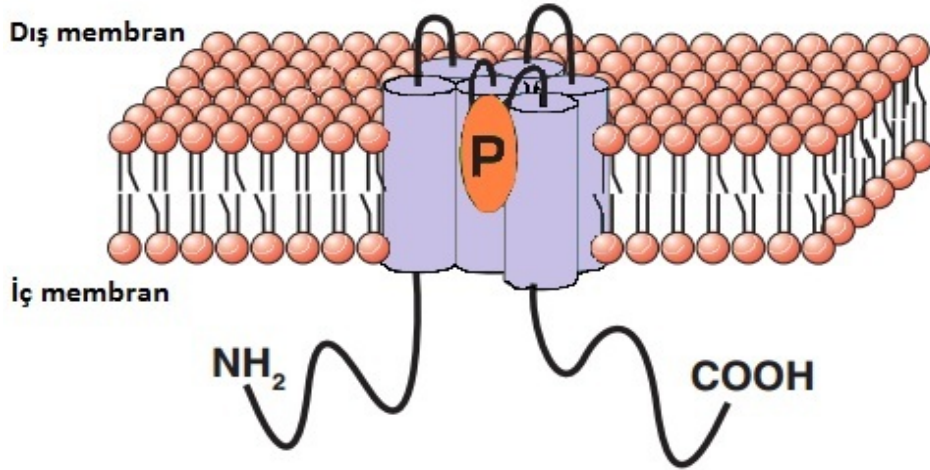
SOCCs; hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarının boşalmasına cevap olarak aktive olabilecekleri gibi farmakolojik bir ajan veya  $Ca^{2+}$ u fizyolojik olarak hareketlendirecek haberciler aracılığıyla aktif hale geçerler. Bu kanallara en iyi örnek olarak geçici reseptör potansiyeli proteinleri (TRP) verilebilir (75). TRP'ler ilk olarak *Drosophila melanogaster*'de keşfedilmiştir. TRP gen bölgelerinde mutasyon taşıyan ışığa duyarlı fotoreseptör rodopsinin, sürekli ışık maruziyeti sonucunda aralıklı voltaj farklılığı görülmektedir (76).

İnsan TRP kanallarının filogenetik ağacı Şekil 2-5'te gösterilmiştir.



Şekil 2-5 : İnsan TRP Kanallarının Filogenetik Ağacı (74)

Öngörülen TRP kanallarının yapısal topolojisi Şekil 2-6'da gösterilmiştir.



Şekil 2-6 : Öngörülen TRP Kanallarının Yapısal Topolojisi (77)

\*Tüm kanallar S5 ve S6 arasında varsayılan por bölgesi (P) ile 6 transmembran segment (S1-S6) içerir.

TRP kanalları, çekirdek ve mitokondri zarları dışında tüm hücre membranlarında bulunarak  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  gibi katyonların hücre içine alınmasında, hücreler arası taşımada görev almaktadır. Bugüne kadar memelilerde yaklaşık 30 TRP kanalı keşfedilmiştir. TRP süperailisi, TRPC (klasik ya da canonical), TRPM (melastatin), TRPV (vanilloid reseptör), TRPA (ankirinden zengin), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPN (NOMPC; no mechanoreceptor potential C) olmak üzere 7 gruba ayrılmaktadır (78).

Vanilloidler, kapsaisinle ilgili bileşik grupları olmakla birlikte vanilloid almaçları yoluyla faaliyet göstermektedir. Günümüzde vanilloid almaç ailesi TRP iyon kanallarının (TRPV), TRPV1-6 olmak üzere altı farklı alt üyesi olduğu bilinmektedir (79). TRPV üyeleri; yapısal olarak incelendiğinde ve fonksiyonlarına bakıldığında TRPV1/2, TRPV3, TRPV4 ve TRPV5/6 olmak üzere dört farklı grupta toplanır (80).

İnsan ve fare TRP kanallarının hücresel sentezlenme ve fiziksel özellikleri Tablo 2-5'te verilmiştir.

**Tablo 2-5 : İnsan ve Fare TRP Kanallarının Hücresel Sentezlenme ve Fiziksel Özellikleri (81)**

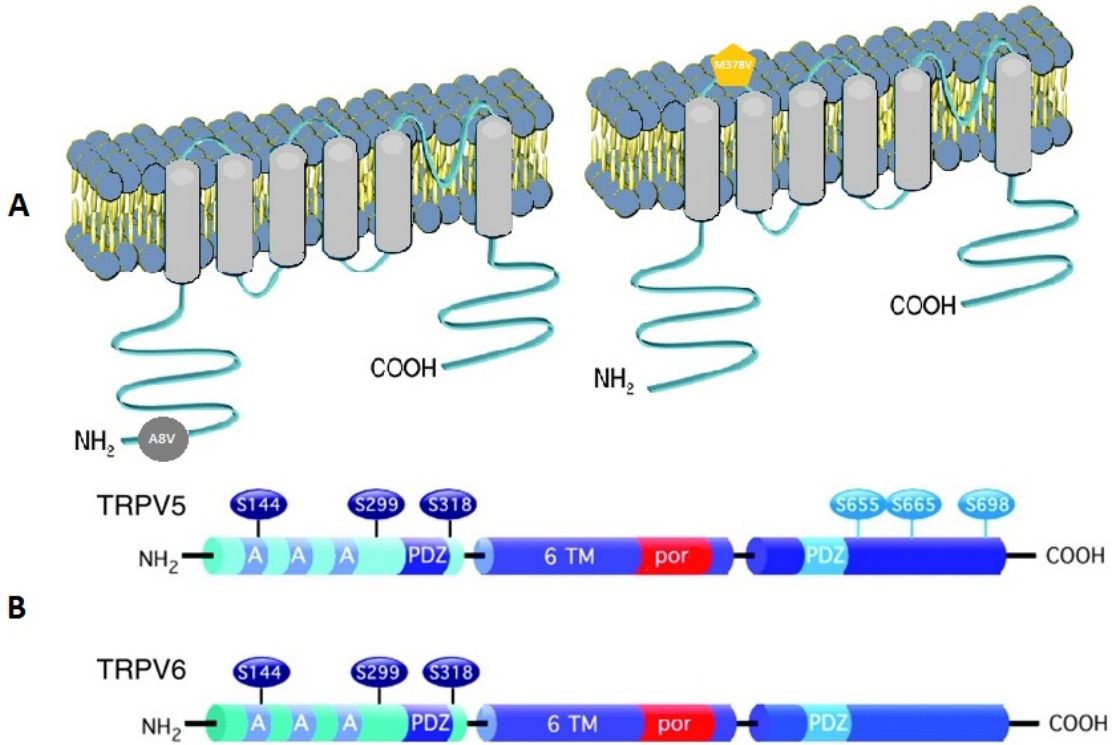
| Alt Birim | Kromozom bölgesi            | Hücresel sentezlenme   | Fizyolojik Özellik  |
|-----------|-----------------------------|--|---|
| TRPV1     | İnsan: 17p13.3; Fare: 11 B3 | Dorsan kök, spinal ve periferik sinir terminalleri, beyin, deri (duyu sinir lifleri, epidermal keratinositler, kıl folikülleri) pankreas, mesane (düz kaslar, kan damarları, sinirler)   | Isı duyarlılığı, otonomik termoregülasyon, ağrı yönetimi, beyinde sinaptik plastisite (uzun süreli depresyon), gıda alımı düzenlenmesi, bağırsakta çok fonksiyonlu  |
| TRPV2     | İnsan: 17p11.2; Fare: 11 B2 | Dorsal kök gangliyası, merkezi sinir sistemi nöronları, gastrointestinal sistem, dalak, mast hücreleri, düz, kalp ve iskelet kas hücreleri   | Zararlı sıcaklıklara duyarlılık, ağrı iletimi, spinal motor nöronlarda aksonun fazla büyümesi, makrofajlarda fagositoz açısından kritik   |
| TRPV3     | İnsan: 17p13.3; Fare: 11 B4 | Dorsal kök ve trigeminal ganglion nöronları, beyin, keratinositler, saç folikülleri, dil ve testis   | Orta derecede ısıya duyarlılık, ağrı iletimi, cilt bütünlüğü, yara iyileşmesi, saç büyüme ve sebosit fonksiyonu   |
| TRPV4     | İnsan: 12q24.1; Fare: 5 F   | MSS (büyük nöronlar), trigeminal ganglion, kalp, karaciğer, böbrek, deri (keratinositler), osteoblastlar, kan damarları (endotel), mesane (ürotelyum) ve testis, koklea (iç ve dış kıl hücreleri, koklear stria vaskularis marjinal hücreleri), böbrek (tübüller ve glomerül epitel hücreleri) | Orta derecede ısıya duyarlılık, mekanik ve osmoduyarlılık, ağrı iletimi; hücre göçünün düzenlenmesi, ürotelyumda mekanoreseptör (boşaltım kontrolü için önemli), osteogenez ve osteoklast fonksiyonları, insanda kemik hastalıkları ve nörodegeneratif hastalıklarda önemli |
| TRPV5     | İnsan: 7q35; Fare: 6 B2     | Böbrekte yüksek seviye, gastrointestinal bölge, pankreas, testis, prostat, plasenta, düşük seviyede beyin ve tükürük bezinde   | Böbrek ve bağırsaklarda kalsiyum geri emilim kanalı   |
| TRPV6     | İnsan: 7q33-q34; Fare: 6 B2 | Gastrointestinal bölgede yüksek seviyede, böbrekte düşük seviyede, testis, prostat, plasenta, beyin ve tükürük bezi  | Böbrek ve bağırsaklarda kalsiyum geri emilim kanalı, ciltte $Ca^{2+}/1,25$ -dihydroxyvitamin D3 ile tetiklenen keratinosit gelişiminde önemli etken   |

TRPV5 ve TRPV6, TRP süperaillesinin eşsiz üyeleridir. 15 ekzon, yaklaşık 730 amino asit kodlarlar ve %75 homoloji gösterirler. TRPV5 ve TRPV6 yüksek oranda  $Ca^{2+}$ , seçici ve kısmen de  $[Ca^{2+}]_i$  tarafından düzenlenen kanallardır (82, 83). Ağırlıklı olarak epitel ve kolonda, böbrek, duodenum gibi transselüler  $Ca^{2+}$  transportunun aracılık ettiği organlarda, pankreas, meme bezi, ter bezi ve tükürük bezi gibi ekzokrin dokularda ve birçok dokuda ifade edilir (84). Kalsiyum emilimini sağlayan,  $Ca^{2+}$  iyonu için yüksek oranda seçici olan bu iki molekül, özellikle böbrek ve bağırsakta birlikte sentezlenmektedir (85, 86).

Bağırsaklarda yüksek oranda sentezlenen TRPV6'nın böbreklerdeki temel izoformu TRPV5'tir (87). Her iki epitel kalsiyum kanalının düzensizliği veya işlev bozukluğu, kalsiyum homeostazı ve birçok hastalıkla ilişkilendirilebilmektedir (88).

$Ca^{2+}$  emiliminin yüksek oranda gerçekleştiği kolonda,  $Ca^{2+}$  transportu önem kazanmaktadır.  $Ca^{2+}$  transportunu gerçekleştiren mekanizma TRP kanal proteinleri tarafından düzenlenmektedir. Günümüze kadar; TRP kanal proteinlerinin düzensizliği ya da işlev bozukluğunun sebep olduğu çok sayıda hastalık gösterilmiştir. Birçok çalışmada; bu kanal proteinlerinden TRPV1, TRPV5 ve TRPV6 özellikle kanserle ilişkilendirilmiştir. Buna bağlı olarak; KRK ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz TRPV5 ve TRPV6 genlerindeki bir mutasyonu, literatürde ilk olarak araştırmayı amaçladık.

TRPV5 ve TRPV6 yapısal gösterimi Şekil 2-7'de verilmiştir.



Şekil 2-7 : A: TRPV5 A8V ve TRPV6 M378V Polimorfizmleri B: TRPV5 ve TRPV6 Yapısal Gösterimi (89)

## 2.8. İyon Kanalları ve Kanser

Çoğalmanın artması, hücre ölümünün normal seyrinde olmaması ve farklılaşmanın anormalleşmesi gibi hücresel düzeydeki değişimler, kanserin karakteristik özellikleri olan kontrolsüz genişleme ve invazyonla sonuçlanabilen doku gelişiminin temel sebepleridir (90). Bu değişimleri büyük ölçüde iyon kanal ekspresyonlarındaki değişiklikler izlemekte ve dolayısıyla iyon kanallarının yer aldığı hücresel olaylar da bundan etkilenmektedir. Kalsiyum dengesindeki değişimler; hücre farklılaşmasının uyarılmasına, bölünmenin artmasına ve apoptoz gibi önemli mekanizmaların etkilenmesine neden olmaktadır (91, 92).

İyon kanalları, kas kasılması ve hormon salınımı gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynarken kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla da ilişkilendirilmektedir (93, 94).  $K^+$  kanalları (95, 96),  $Na^+$  ve  $Cl^-$  kanalları (97), katyon kanalları (98), voltaj bağımlı  $Ca^{2+}$  kanalları (99) ve depolanmış kalsiyum miktarına duyarlı  $Ca^{2+}$  kanallarının (100) kanserle olan ilişkisi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Hücre membranından iyon geçişi; hacim kontrolü (101), migrasyon (102), göç etme (103), hücre döngüsünün devamlılığı ve hücrelerin çoğalması (102, 103) gibi temel tümör hücre fonksiyonları için büyük önem arz etmektedir. Tüm bu fonksiyonlar kanser hücrelerinin hayatta kalması ve metastazı açısından son derece önemli olaylardır (104). Hem tümör vaskülerizasyonunun düzenlenmesi hem de tümör hücrelerine karşı immün hücrelerinin yanıt oluşturması ve sayılarının artması bakımından iyon kanalları kritik rol üstlenmektedir. Bu sebeplerden ötürü tümör olmayan hücrelerde iyonların hücre membranı boyunca taşınması, tümör hücrelerinde ise iyon kanallarının bloklanması tümör hücrelerinin yaşamsal fonksiyonlarını durdurabilecek önemli unsurlar olarak görülmektedir (105, 106).

Yaptığımız çalışma;  $Ca^{2+}$  homeostazında önemli role sahip olan iki kanal proteininden TRPV5 ile TRPV6'da birtakım genetik varyasyonların; Türk halkındaki KRK olgularında bir arada incelendiği, bu kanallar ve kolorektal kanser arasındaki ilişkiye farklı bir boyut kazandırıldığı ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı

Çalışmamızda iki örnek grubu bulunmaktadır. Birinci grup, herhangi bir malignitesi bulunmayan sağlıklı 37 bireyden oluşan kontrol grubudur. İkinci grup ise, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen 33 kolorektal kanserli hastadan oluşmaktadır. Projemize dahil edilen, kolorektal kanser tanısı konmuş hastalarımızın klinik, histopatolojik değerlendirmeleri ve kan örneği alımları, ilgili klinik tarafından gerçekleştirilmiştir.

Örneklemeimizi oluşturan bireylerden kan örnekleri toplanırken konu hakkında aydınlatılarak çalışma öncesi yazılı onamları alınmıştır. Etik kurul onayı alındıktan sonra çalışmaya başlanmıştır. Diğer klinik parametrelere ait ayrımlar yukarıda belirtilen klinik tarafından yapılmış olup, kan örnekleri bu birim tarafından sınıflandırılarak İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı'na gönderilmiştir.

TRPV5 ve TRPV6 gen polimorfizmleri için, hasta ve kontrol grubuna ait bireylerden DNA izolasyonu yapılmak üzere alınan 7-8 ml venöz kan, 1 ml %2'lik etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren, 15 ml'lik steril tüplere konulmuştur. DNA'lar, en geç bir gün içerisinde çalışılmak suretiyle elde edilmiş ve analiz edilinceye kadar +4°C'de saklanmıştır. 33 kolorektal kanserli hastada ve 37 sağlıklı bireyde TRPV5 ve TRPV6 genlerine ait polimorfizmlerin analizlerini yapmak için Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PZR), Agaroz Jel Elektroforezi ve Sanger Döngü Dizileme Yöntemi teknikleri kullanılmıştır.

##### 3.1.1. Çalışmaya Alınma Ölçütleri

- 18-85 yaş arası kadın-erkek hasta ve sağlıklı bireyler
- Kolorektal kanser tanısı almış hastalar

##### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552)
- Amonyum klorür (Sigma)
- EDTA (Sigma E-5134)
- Sodyum hidroksit (Sigma)

- Sodyum dodesil sülfat (Sigma)
- Proteinaz K (Fermentas)
- Amonyum asetat (Sigma A-8920)
- Sodyum klorür (Carlo Erba 368257)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Tris-EDTA (Sigma)
- i-Star Taq DNA polimeraz (Intron Biotech.)
- 2,5 mM dNTP mix (Intron Biotech.)
- 10X PCR buffer with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Intron Biotech.)
- 25 mM  $\text{MgCl}_2$  (Intron Biotech.)
- Primerler (DNA Technology)
- Bidistile Su
- Tris base (Sigma T-6066)
- Borik asit (Carlo Erba 302177)
- Sodyum sitrat (Sigma S-4641)
- Etidyum bromid (Sigma E-1510)
- Agaroz (LE Prone Basica 051342 PR)
- Gene Ruler 100bp DNA Ladder (Intron Biotech.)

### 3.1.3. Kullanılan Gereçler

- Elektroforez için güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation, E-C4000P)
- Hassas terazi (Mettler)
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak EL LOGIC 100 görüntüleme sistemi)
- Mikrodalga fırın (Philco)
- Beher
- Mezür

- Mikrosantrifüj (TDX)
- Mini soğutucu
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Elektromag)
- Çeker ocak
- Thermal cycler cihazı (Applied Bio.)
- pH metre (Hanna)
- Pipet takımı (Eppendorf)
- 10, 20, 100, 1000 µl'lik pipet uçları
- 15 ml ve 50 ml'lik konik tüp (Falkon)
- 200, 500 µl'lik mikrosantrifüj tüpü
- Etüv (Nüve)
- Su banyosu (Elektromag)
- Vorteks (Nüve mix)
- Elektroforez sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis)
- Nanodrop (ND-1000 spectrophotometer)
- Buzdolabı (-30°C) (Regal)
- Buzdolabı (+4°C) (Arçelik)
- Santrifüj (Nüve Mf 048)
- Genetik analizör (Applied Biosystems/Hitachi 3130 (XL))

### **3.2. Kullanılan Çözeltiler**

#### **3.2.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)**

8,74 g amonyum klorür, 1 g potasyum bikarbonat, 200 µl 0,5M etilendiamintetraasetat'ın (EDTA) tartımları yapılarak cam şişe içine alındı. 900 ml distile su eklendi ve çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Daha sonra 1 L'ye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

**3.2.2. 0,5M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (pH 8,0)**

186,1 g etilendiamintetraasetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü ve pH'sı NaOH çözeltisi ile 8,0'e ayarlanarak distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterile edildi.

**3.2.3. 4M Sodyum Klorür (NaCl)**

233,6 g NaCl tartılarak beher içine alındı. Üzerine 800 ml distile su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözdürüldü. Cam şişeye aktarılarak 1 L'ye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterile edildi.

**3.2.4. Lökosit Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL)**

25 ml 4M NaCl ve 50 ml 0,5M etilendiaminasetat (EDTA) cam şişeye konularak 1 L'ye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterile edildi. Oda ısısında saklandı.

**3.2.5. 1M Tris Tamponu (Stok)**

121,1 g Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 42 µl hidroklorik asit (HCl) ile yaklaşık 800 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü. Daha sonra cam şişeye aktarıldı ve 1 L'ye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterile edildi.

**3.2.6. 9,5M Amonyum Asetat**

73,22 g amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Cam şişeye aktarıldı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek sterile edildi ve +4°C'de saklandı.

**3.2.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)**

10 g sodyum dodesil sülfat tartıldı. Beher içine alınarak üzerine 80 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürüldü ve pH'sı 7,2'ye ayarlandı. 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek sterile edildi ve oda ısısında saklandı.

**3.2.8. Proteinaz K (20 mg/ml)**

20 mg Proteinaz K tartılarak steril bir tüp içinde steril distile su ile 1 ml'ye tamamlandı. -30°C'de saklandı.

**3.2.9. Etidyum Bromür (10 mg/ml)**

10 g etidyum bromür tartılarak steril ddH<sub>2</sub>O ile 10 ml'ye tamamlandı.

**3.2.10. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE) Tamponu**

54 g tris baz ve 27,5 g borik asit tartılarak bir behere alındı. Üzerine 20 ml 0,5M'lık etilendiamintetraasetat ve 800 ml ddH<sub>2</sub>O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Cam şişeye aktarılarak 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterile edildi ve oda ısısında saklandı.

**3.2.11. DNA Taq Polimeraz Enzimi (5U/µl)**

25 µl'lik PZR karışımındaki konsantrasyonu 2,5U olacak şekilde (0,25 µl) eklendi.

**3.2.12. 10X DNA Taq PZR Tamponu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'lü**

25 µl'lik PZR karışımına 2,5 µl 10X Taq PZR tamponu eklendi.

**3.2.13. MgCl<sub>2</sub> (25mM/ml)**

MgCl<sub>2</sub>'den 25 µl'lik PZR karışımına 1,5 µl eklendi.

**3.2.14. dNTP'ler (100 µmol/ml)**

dNTP'lerden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10'ar µl alınıp (toplam 40 µl) 1 µl'lik tüpe kondu ve üzerine 960 µl distile su eklenerek (dH<sub>2</sub>O) 1000 µl 1mM'lık dNTP karışımı hazırlandı ve -30°C derin dondurucuda saklandı. 25 µl'lik PZR karışımına 1,5 µl eklendi.

**3.2.15. Primerler**

25 µl'lik PZR karışımına, çoğaltılacak DNA bölgesine uygun tasarlanan ileri ve geri primerlerin (10 pmol) her birinden 0,5 µl eklendi.

**3.3. Kullanılan Kitler**

- Ex's Pure™ Enzymatic PCR Cleanup Kit (NimaGen BV)
- BrightDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (NimaGen BV)
- Sephadex G-50 DNA Grade Fine (Sigma-Aldrich, Inc.)

### 3.4. Kullanılan Yöntemler

#### 3.4.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplerle alınan 10 ml'lik kan örnekleri çalışma için konik tüplere aktarıldı. Üzerlerine 1:3 oranında parçalama tamponu eklenerek +4°C'de 15 dk bekletildi. Daha sonra 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısımları atılarak pelletler tamamen süspansiyon haline getirildi ve üzerlerine tekrar 15-20 ml lizis eklendi. Örnekler +4°C'de 15 dk bekledikten sonra 10 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısımları atıldı ve süspansiyon olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS, 75 µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 9,4 ml lökosit parçalama tamponu eklenerek 56°C'de su banyosunda bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her 1 ml örnek başına 0,37 ml olacak şekilde 9,5M'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dk santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir konik tüpe aktarıldı ve üzerine 1:2 oranında %99'luk etil alkol eklenerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkolün yüzeyine çıkması beklendi ve DNA mikropipet ucuyla alındı. DNA %70'lik alkolde yıkandı ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisinde çözdürülerek +4°C'de saklandı.

#### 3.4.2. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Elde edilen DNA örneklerinde konsantrasyon ve miktar tayini yapmadan önce her örnekten 20 µl alınarak üzeri 380 µl 0,5X TE tamponu ile tamamlandı ve bu şekilde 1/20 oranında sulandırıldı. Bu örneklerin daha sonra nanodropta 260 nm ve 280 nm dalga boylarında optik densite (OD) ölçümleri yapıldı.

Nanodropta 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> oranı 1,7-1,8 olan DNA'lar temiz olarak kabul edildi. DNA'nın 50 µg/ml çift iplikçikli içeriğinin 260 nm dalga boyunda bir OD verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değerine aşağıdaki formül uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

**DNA Konsantrasyonu (ng/µl): Sulandırma katsayısı (100) x A<sub>260</sub> x 50**

DNA örneklerinin saflığı OD260/OD280 oranı kullanılarak belirlendi. İyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD260/OD280 değeri yaklaşık 1,8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8'den küçük olacaktır. OD260/OD280 değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

### 3.4.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin PZR ile çoğaltılması

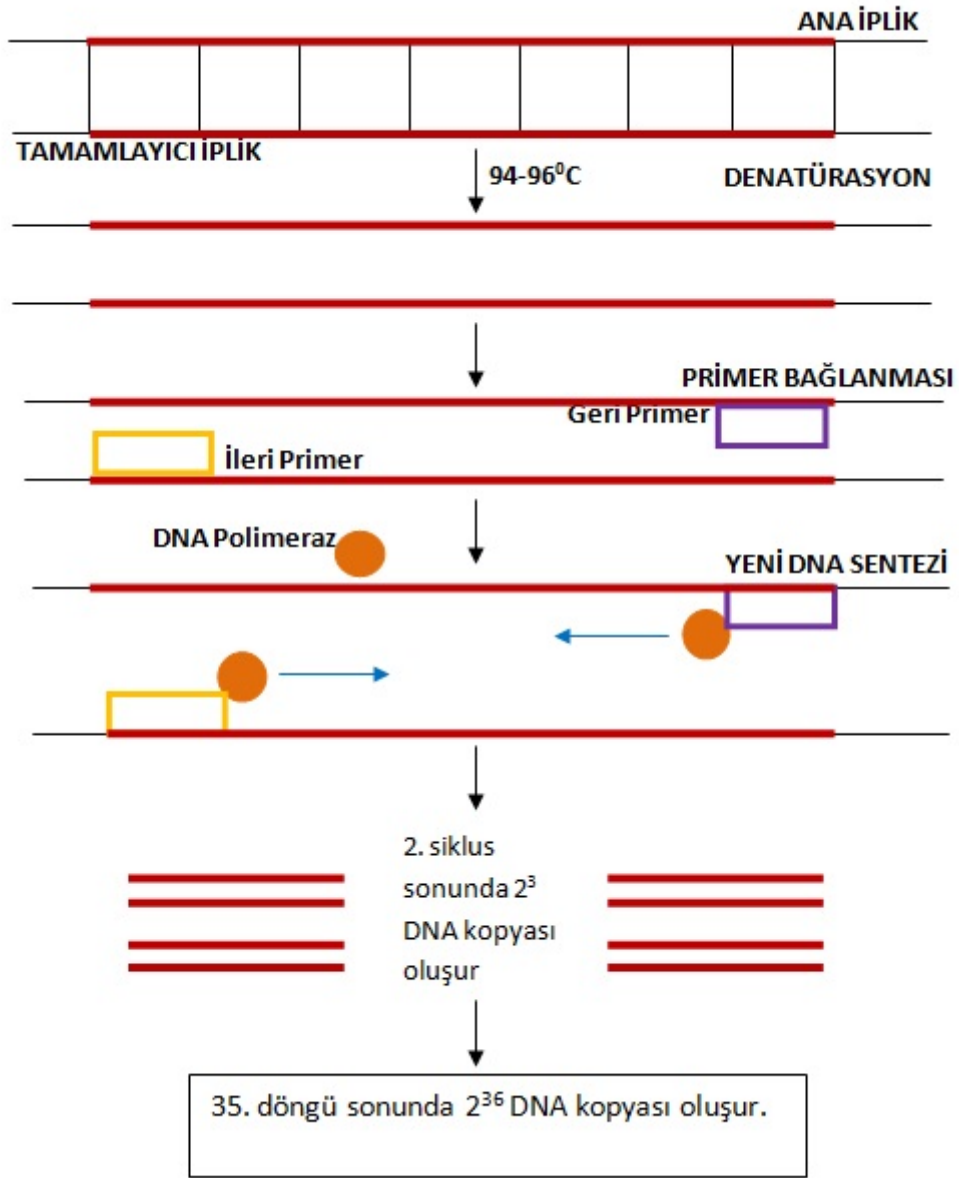
PZR ilk olarak Kary Mullis ve ark. (107) tarafından uygulanmış olup ve hedef DNA veya RNA parçasının 20-30 nükleotitlik primerler kullanılarak in vitro şartlarda kopyalanmasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem basitçe üç aşamadan oluşur:

\*Çift iplikli DNA'nın denatürasyonu,

\*Primerlerin DNA üzerinde kendilerine özgü bölgelerine bağlanması,

\*Yeni DNA zincirlerinin sentezi.

PZR'nin ilk aşamasında; çift iplikli DNA, yüksek sıcaklıklarda (95-100°C) denatüre edilir. Denatürasyon aşamasından sonra reaksiyon ortamı kullanılan primerlere özgü bağlanma sıcaklığına düşürülür ve oligonükleotit primerler komplementer bölgelere bağlanır. Son aşamada Taq DNA polimeraz uygun tampon, uygun sıcaklık ve dört çeşit dNTP varlığında primerleri 5'→3' yönünde uzatmaya başlar. Her döngü sonucunda, ilgili DNA bölgesi iki katına çıkar (108). PZR aşamaları Şekil 3-1'de gösterilmiştir.



**Şekil 3-1 : PZR aşamaları**

Bu çalışmada, herhangi bir malignitesi bulunmayan sağlıklı 37 birey ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen 33 kolorektal kanserli hastadan oluşan iki gruba ait DNA örneklerinden TRPV5 A8V ve TRPV6 M378V polimorfizmlerinin gözleendiği bölgelerin çoğaltılması amacıyla PZR gerçekleştirildi.

### 3.4.3.1. TRPV5 ve TRPV6 Gen Bölgelerinin PZR Yöntemi ile Çoğaltılması

TRPV5 A8V polimorfizminin gözleendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotit dizileri aşağıdaki gibidir.

Primerler (5' → 3'): İleri- 5'-GTCCCAGCCCCAAATAGACC-3'  
Geri- 5'-CTGACCAGAAAGGAGGGCAG-3'

TRPV6 M378V polimorfizminin gözleendiği bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotit dizileri aşağıdaki gibidir.

Primerler (5' → 3'): İleri- 5'-CGGGACAACACCCTCTTAC-3'  
Geri- 5'-TGGAACCTCTACCAGCAGGA-3'

TRPV5 gen bölgesi optimize edilmiş PZR protokolü (Tablo 3-1) ve döngü şartları (Tablo 3-2) ile çoğaltılmıştır.

TRPV6 gen bölgesi optimize edilmiş PZR protokolü (Tablo 3-3) ve döngü şartları (Tablo 3-4) ile çoğaltılmıştır.

**Tablo 3-1 : TRPV5 Gen Bölgesi için Kullanılan PZR Protokolü**

| <b>KİMYASALLAR</b>  | <b>MİKTARLAR</b> |
|---------------------|------------------|
| Distile su          | 16,8 µl          |
| dNTP                | 1,5 µl           |
| 10X buffer          | 2,5 µl           |
| MgCl <sub>2</sub>   | 1,5 µl           |
| Primer <i>İleri</i> | 0,5 µl           |
| Primer <i>Geri</i>  | 0,5 µl           |
| Taq polimeraz       | 0,2 µl           |
| DNA                 | 1,5 µl           |

Bu işlem 0,2 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde ve buz içerisinde gerçekleştirildi. Örnekler ısı-döngü cihazına yerleştirilerek, aşağıda belirtilen program uygulandı.

**Tablo 3-2 : TRPV5 Gen Bölgesi için Kullanılan Amplifikasyon Sıcaklıkları**

|       |       |            |
|-------|-------|------------|
| 95 °C | 5 dk  |            |
| 94 °C | 35 sn | } 35 döngü |
| 60 °C | 35 sn |            |
| 72 °C | 35 sn |            |
| 72 °C | 5 dk  |            |

**Tablo 3-3 : TRPV6 Gen Bölgesi için Kullanılan PZR Protokolü**

| KİMYASALLAR       | MİKTARLAR |
|-------------------|-----------|
| Distile su        | 16,8 µl   |
| dNTP              | 1,5 µl    |
| 10X buffer        | 2,5 µl    |
| MgCl <sub>2</sub> | 1,5 µl    |
| Primer İleri      | 0,5 µl    |
| Primer Geri       | 0,5 µl    |
| Taq polimeraz     | 0,2 µl    |
| DNA               | 1,5 µl    |

Bu işlem 0,2 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde ve buz içerisinde gerçekleştirildi. Örnekler ısı-döngü cihazına yerleştirilerek, aşağıda belirtilen program uygulandı.

**Tablo 3-4 : TRPV6 Gen Bölgesi için Kullanılan Amplifikasyon Sıcaklıkları**

|       |       |            |
|-------|-------|------------|
| 95 °C | 5 dk  |            |
| 94 °C | 35 sn | } 35 döngü |
| 60 °C | 35 sn |            |
| 72 °C | 35 sn |            |
| 72 °C | 5 dk  |            |

Polimeraz zincir reaksiyonu uygulamalarında kontaminasyonun takibi için ek olarak negatif kontrol de çalışmaya eklendi. Negatif kontrol için PZR bileşenleri, örnekler ile aynı miktarda olup kalıp DNA kullanılmadı, son hacim ise distile su ile tamamlandı.

#### 3.4.3.2. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması

Agaroz jel elektroforezi ile DNA tayininde, çözülmüş halde bulunan DNA parçaları elektrik akımı ve jeldeki porlar sayesinde büyüklükleri, yükleri ve biçimlerine göre farklı hızlarda hareket etmektedirler. Bu sayede farklı boyutlardaki DNA molekülleri tanımlanabilmektedir. Küçük DNA fragmanları için konsantrasyonu yüksek agaroz, büyük DNA fragmanları için konsantrasyonu düşük agaroz ile agaroz jeller hazırlanarak DNA parçaları birbirinden ayırt edilmektedir. Ayrıca agaroz jel hazırlanırken DNA'nın görünür hale gelmesi için etidyum bromür kullanılmaktadır. Agaroz jeldeki etidyum bromür, DNA ile etkileşerek 300-360 nm dalga boylu UV ışık altında floresan etki gösterir. Böylece, DNA agaroz jelde görünür hale gelir (109). Genellikle jel elektroforezinde bilinen büyüklüklerdeki bir belirteç olan DNA kullanılır ve moleküler büyüklüğü bilinmeyen DNA kolayca saptanabilir (110).

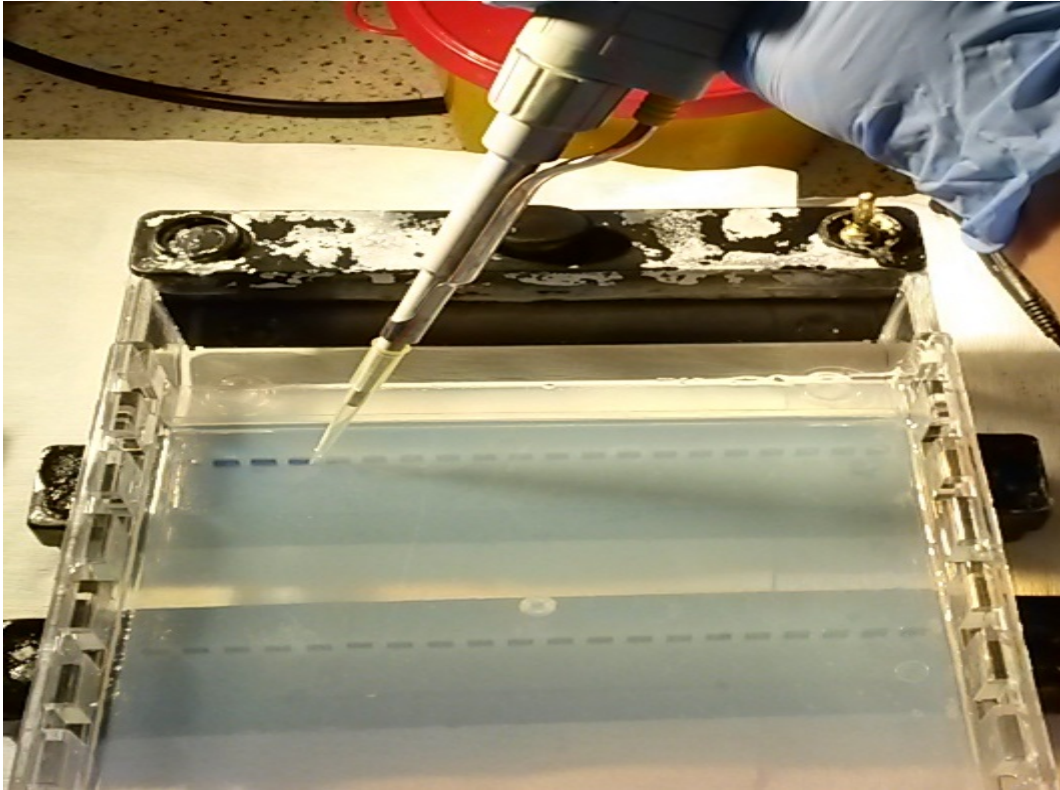
Elektroforezde stok 5X TBE tamponundan hazırlanan 1X TBE kullanıldı. 4 g agaroz tartılarak beher içine konuldu. Üzerine son hacim 200 ml olacak şekilde 1X TBE tamponu eklenerek, mikrodalga fırında çözdürüldü. Beherin sıcaklığı elle tutulabilecek duruma geldiğinde, behere 1 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edildi.

Hazırlanan jel, yatay jel yatağı içine dökülerek, yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek oda ısısında bekletildi. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı.

### 3.4.3.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel'e Yüklenecek Kontrol Edilmesi

Yükleme tamponu olarak %40 sükröz ve %0,25 brom fenol mavisi karışımı kullanıldı. %2'lik jel hazırlandıktan sonra 1X TBE tamponu içeren jel tankı içine uygun şekilde konuldu. Agaroz jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE tamponu eklendi.

TRPV5 ve TRPV6 genlerine ait istenilen bölgelerinin PZR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacı ile her iki bölge için ayrı ayrı PZR tüpünden alınan 7  $\mu$ l PZR ürününe, 1,5  $\mu$ l yükleme tamponu eklenip pipetleme yapıldı. 8,5  $\mu$ l'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi (Şekil 3-2). Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı, 500 mA 100 V'ye ayarlanarak elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işleminden sonra, TRPV5 geninden 178 bç ve TRPV6 geninden 432 bç'lik ürünler jelde UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) incelendi ve UV transillüminator düzeneğinde fotoğrafı çekilerek dijital ortama kaydedildi.



Şekil 3-2 : Yükleme Tamponu ile Kuyucuklara Yüklenen PZR Ürünleri

#### 3.4.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR karışımındaki; primer, dNTP gibi kimyasal artıkların ortamdaki uzaklaştırılması için Ex'S Pure™ Enzymatic PCR Cleanup Kiti kullanılarak PZR ürünleri saflaştırıldı. Kısaca;

- Her bir örnek için 5 µl PZR ürünü yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Her bir PZR ürününün üzerine 1 µl rSAP ve 5 µl Exo1 eklendi.
- Mikrosantrifüj tüpleri, kapak ısıtılmalı ısı-döngü cihazına yerleştirildi.
- Örnekler, ısı-döngü cihazında öncelikle 37°C'de 15 dk daha sonra 90°C'de 10 dk inkübe edildi.
- Örnekler bir sonraki adımda kullanılmak üzere +4°C'de bekletildi.

#### 3.4.5. PZR Ürünlerinin Dizi Analizi için Hazırlanması Amacıyla Döngü Dizileme

DNA dizi analizi ya da sekanslama; DNA birincil yapılarının tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. 1940'lı yıllarda, DNA baz kompozisyonunu saptama yöntemlerinin var olmasına rağmen, etkin ve doğrudan nükleotit dizi analizine yönelik yöntemlerin gelişmesi 1970'li yıllarda başlamıştır. Rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesiyle birlikte dizi analizi yöntemleri de geliştirilmeye başlamıştır. Allan Maxam ve Walter Gilbert'in (1977) geliştirdiği ilk yöntem; DNA zinciri sentezi, kimyasal temeli DNA'nın belirli dizilerden kırılmasına dayanır. Fred Sanger ve ark.'nın (1951) geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleşmektedir. Her iki yöntemde de dizisi saptanacak DNA'ya her baz için bir tane olmak üzere dört ayrı reaksiyon uygulanmaktadır. Bu dört reaksiyonun ürünleri; bir nükleotit uzunluğu kadar farklı bir dizi DNA parçacıklarıdır. Dört reaksiyonun ürünleri bir jelde, dört ayrı kuyucukta yan yana elektroforez ile ayrıştırılmaktadır ve jeldeki bantlardan DNA parçacığının dizisi belirlenebilmektedir (111, 112). Günümüzde enzimatik ve kimyasal yöntemler olarak bilinen klasik yöntemlerin yanında, DNA bölgelerinin dizi analizi için Sanger döngü dizileme prensibine dayalı otomatik sistemler de kullanılmaktadır. Bu amaçla, dizi analizi reaksiyonunda fotokrom işaretli nükleotitler kullanılmaktadır. Klasik Sanger yönteminden farklı tüm ddNTP'ler tek bir reaksiyon tüpü içerisine konur. Reaksiyon karışımı amplifikasyon sonrası kapiller jelle yüklenir ve bazlar iki farklı floresans dedektör vasıtasıyla saptanır.

Kullanılan bilgisayar programları ile elde edilen veriler renkli kromotogram dosyalarına çevirilir. Bu dosyalarda her bir baz, kendisine özgül olan bir renk eğrisi ile gösterilir (111).

Yapılan bu çalışmada da herhangi bir malignitesi bulunmayan sağlıklı 37 birey ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen 33 kolorektal kanserli hastadan oluşan iki gruba ait DNA örneklerinden TRPV5 A8V ve TRPV6 M378V bölgelerine ait DNA dizilerinin tespiti için Sanger metoduna dayanan otomatik dizi analizi yöntemi kullanıldı. Bu amaçla; döngü dizileme, BrightDye® Terminator Cycle Sequencing Kit ile gerçekleştirildi. Her bir bölge için ileri ve geri primerlerle ayrı ayrı hazırlanan 15 µl'lik döngü dizileme reaksiyon karışım protokolü (Tablo 3-5) ve döngü dizileme koşulları (Tablo 3-6) verilmiştir.

**Tablo 3-5 : Döngü Dizileme Reaksiyon Karışım Protokolü**

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| 5X Döngü Dizileme Tamponu | 2,25 µl |
| BrightDye rr Premix       | 1,5 µl  |
| (5 pMol) Primerler İ/G    | 1,5 µl  |
| Saflaştırılmış PZR ürünü  | 1,5 µl  |
| Distile Su                | 8,25 µl |

Bu işlem 0,2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde ve buz içerisinde gerçekleştirildi ve tüpler ısı-döngü cihazına yerleştirilerek aşağıda belirtilen program uygulandı.

**Tablo 3-6 : Döngü Dizileme Koşulları**

|              |                   |
|--------------|-------------------|
| <b>96 °C</b> | <b>45 sn</b>      |
| <b>96 °C</b> | <b>10 sn</b>      |
| <b>50 °C</b> | <b>5 sn</b>       |
| <b>60 °C</b> | <b>2 sn</b>       |
|              | } <b>28 döngü</b> |

Döngü dizileme işleminin ardından, BrightDye® içeren PZR örnek tüpleri ışıktan korunarak saklandı.

#### **3.4.6. Döngü Dizileme Ürünlerinin Saflaştırılması**

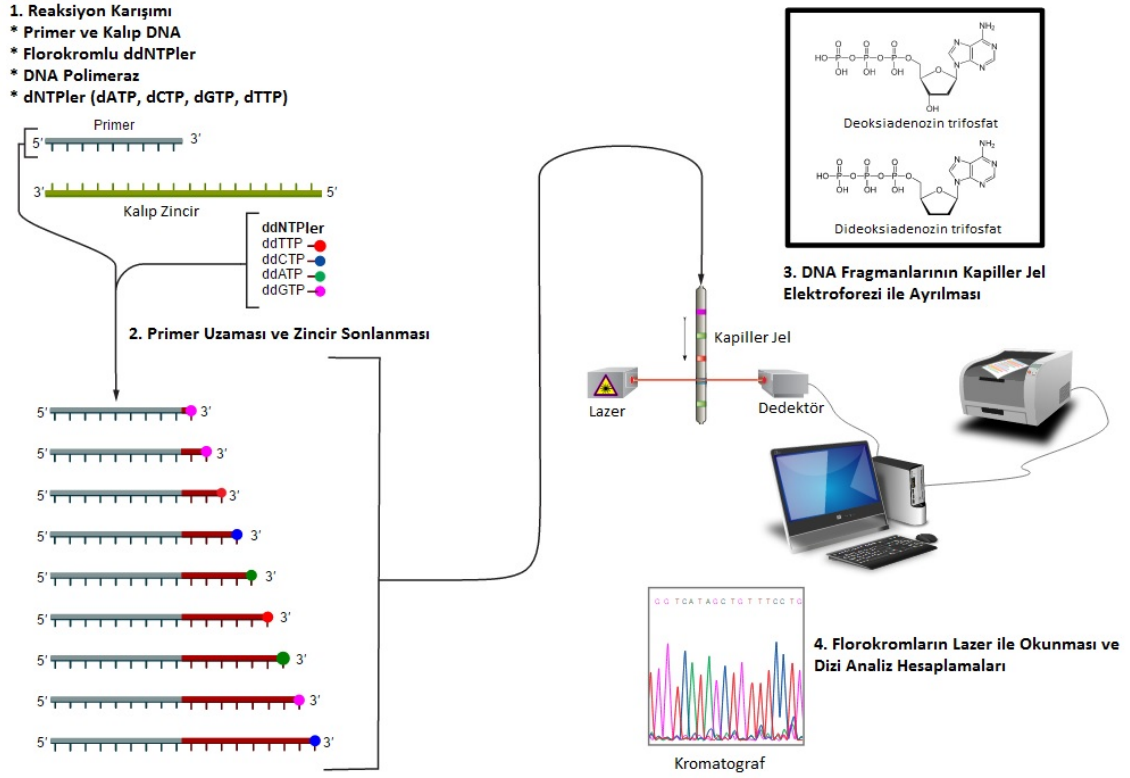
Döngü dizileme sonrası ürünlerin saflaştırılması için Sephadex G-50 DNA Grade Fine ve filtreli 96'lık plate kullanıldı. Protokolü aşağıdaki gibidir.

- Her bir filtreli plate, kullanılacak kuyucuk sayısı kadar Sephadex G-50 DNA Grade Fine ile dolduruldu,
- Sephadex G-50 DNA Grade Fine ile doldurulan her kuyucuğa 300 µl distile su eklenerek +4°C'de 3 saat süreyle inkübasyona bırakıldı,
- Sephadex plate hazır olunca altına boş bir plate eklenerek hassas terazide tartıldı ve santrifüje dengeli olarak yerleştirildi,
- 2000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edilerek distile su kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Alta eklenen plate çıkarılarak boşaltıldı,
- Döngü dizileme ürünleri sırayla sephadex plate kuyucuklarına yüklendi ve alta örneklerin sekansa yükleneceği yeni bir plate yerleştirildi. Döngü dizileme ürünlerinin saflaştırılması sağlandı.

#### **3.4.7. Ürünlerin Dizi Analizi için Cihaza Yüklenmesi**

Saflaştırılmış döngü dizileme ürünleri Applied Biosystems/Hitachi 3130 (XL) cihazına uygun şekilde yerleştirildi. Applied Biosystems/Hitachi 3130 (XL) cihazında örnekler için yeni örnek listesi oluşturulmuş dye/primer set olarak Filterset Z (Dye Set Z for BigDyeTerminator v3.1) seçildi.

Sanger Döngü Dizileme Yönteminin prensibi Şekil 3-3'te gösterilmiştir.



**Şekil 3-3 : Sanger Döngü Dizileme Yönteminin Prensipleri**

### 3.4.8. Sonuçların Analizi

GeneStudio™ Pro 2.2.0.0 ile her iki gen bölgesi için ayrı ayrı analiz edilen sonuçların dizi dosyaları NCBI web sitesinin veritabanı ile karşılaştırmak için BLAST yapılmıştır.

### 3.4.9. İstatistiksel Analiz

Analiz edilen her iki gen bölgesi için hasta ve kontrol örnek bilgileri ile istatistiksel analizi SPSS 18.0 programı ile gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Kontrol ve Hasta Grubu Verileri

Çalışmamıza; İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından kolorektal kanser tanısı konmuş hastalar ile ailede kanser hikayesi bulunmayan sağlıklı bireyler dahil edilmiştir. Gönüllülere yapılacak araştırma ile ilgili bilgi verilmiş ve gönüllü onam formu okutularak imzalatılmıştır.

Çalışma gruplarına ait veriler Tablo 4-1’de verilmiştir.

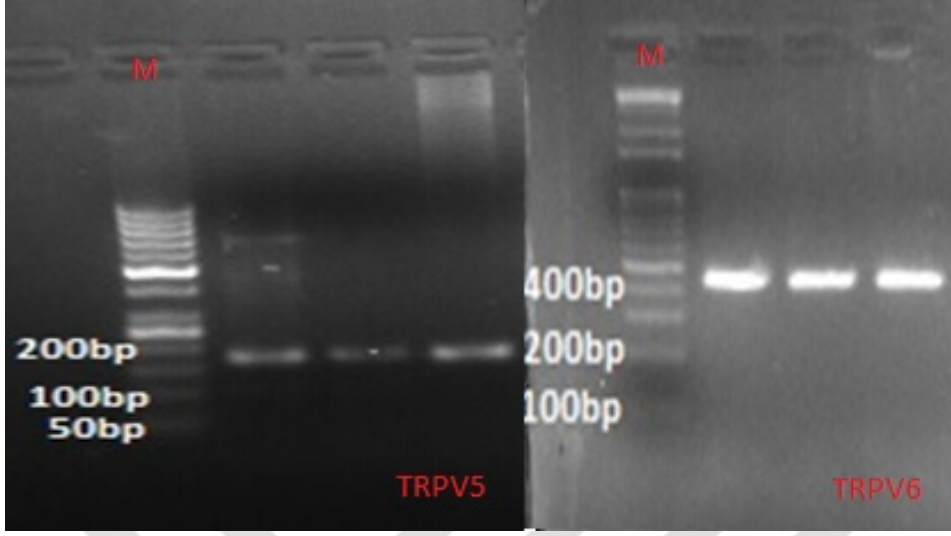
**Tablo 4-1 : Çalışma gruplarına ait veriler**

|                             | <b>Kontrol<br/>n=37</b> | <b>Kolorektal Kanserli<br/>Hastalar<br/>n=33</b> |
|-----------------------------|-------------------------|--|
| <b>Cinsiyet</b>             |                         |  |
| <i>Kadın, n(%)</i>          | 19(51,4)                | 13(39,4)   |
| <i>Erkek, n(%)</i>          | 18(48,6)                | 20(60,6)   |
| <b>Yaş ortalaması (yıl)</b> | 55,8                    | 54,7   |
| <b>Alkol Kullanımı</b>      |                         |  |
| <i>Pozitif, sayı(%)</i>     | 0                       | 0  |
| <i>Negatif, sayı(%)</i>     | 37(100)                 | 33(100)  |
| <b>Sigara Kullanımı</b>     |                         |  |
| <i>İçenler, sayı(%)</i>     | 7(18,9)                 | 10(30,3)   |
| <i>İçmeyenler, sayı(%)</i>  | 30(81,1)                | 23(69,7)   |

### 4.2. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel’de Görüntülenmesi

Herhangi bir malignitesi bulunmayan sağlıklı 37 birey ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen 33 kolorektal kanserli hastadan oluşan iki gruba ait; DNA örneklerinden, TRPV5 A8V ve TRPV6 M378V polimorfizmlerinin gözlendiği bölgeler PZR yöntemiyle çoğaltılıp %2’lik agaroz jele yüklendi ve yürütüldü. Yürütme işleminden sonra, TRPV5 geninden 178 bç ve TRPV6 geninden 432 bç’lik ürünler UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) tespit edildi.

Gen bölgeleri için bazı örneklerin PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4-1'de gösterilmiştir.

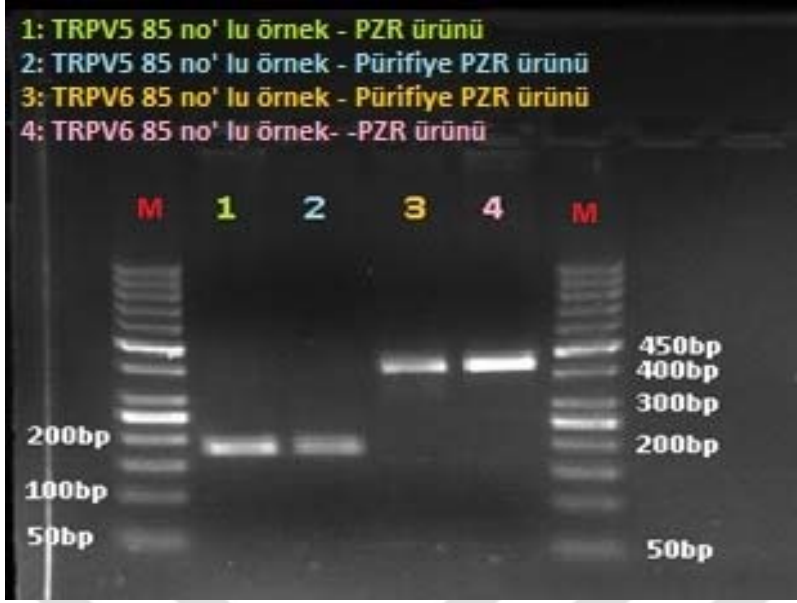


**Şekil 4-1 : Gen Bölgeleri için Bazı Örneklerin PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü**

\*M: Marker (50bp) , bp: Baz çifti

#### 4.3. Saflaştırılmış PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

PZR karışımı; primer, dNTP gibi kimyasal artıkların ortamdan uzaklaştırılması için Ex'S Pure™ Enzymatic PCR Cleanup Kiti ile pürifiye edilerek %2'lik agaroz jele yüklendi ve yürütüldü. Bazı PZR ve pürifiye edilmiş PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4-2'de gösterilmiştir.

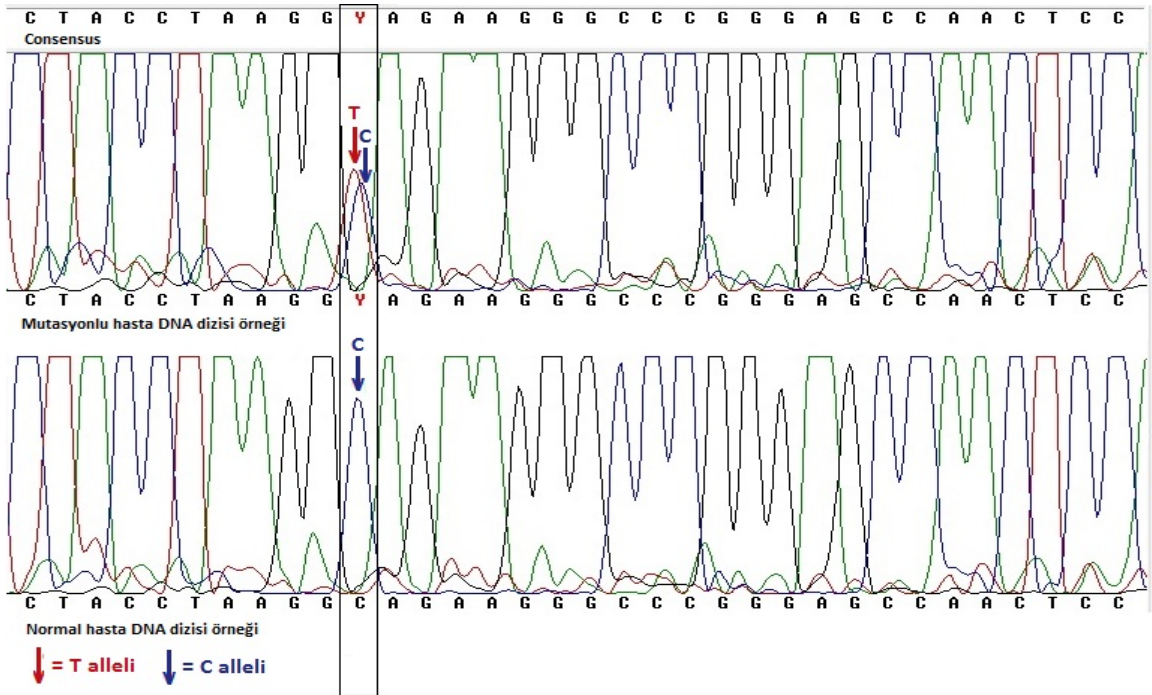


Şekil 4-2 : Bazı PZR ve Saflaştırmış (Pürifiye Edilmiş) PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

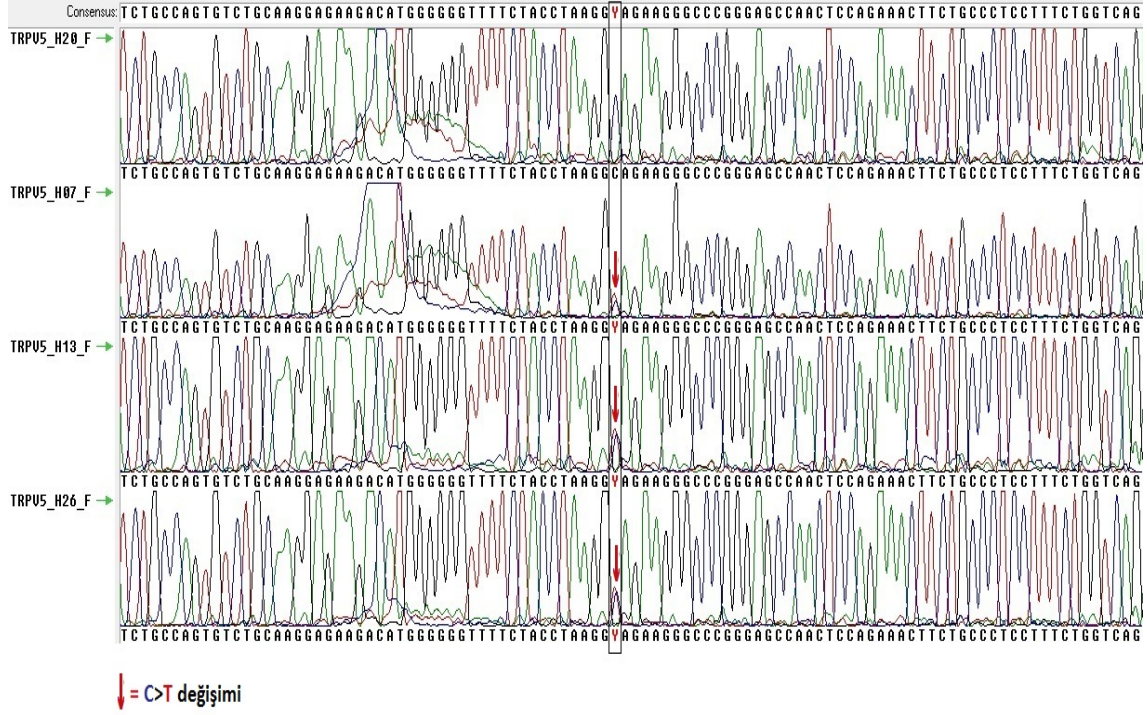
\*M: Marker (50bp) , bp: Baz çifti

#### 4.4. TRPV5 ve TRPV6 Gen Bölgelerinin Dizilenmesi ve Analizi

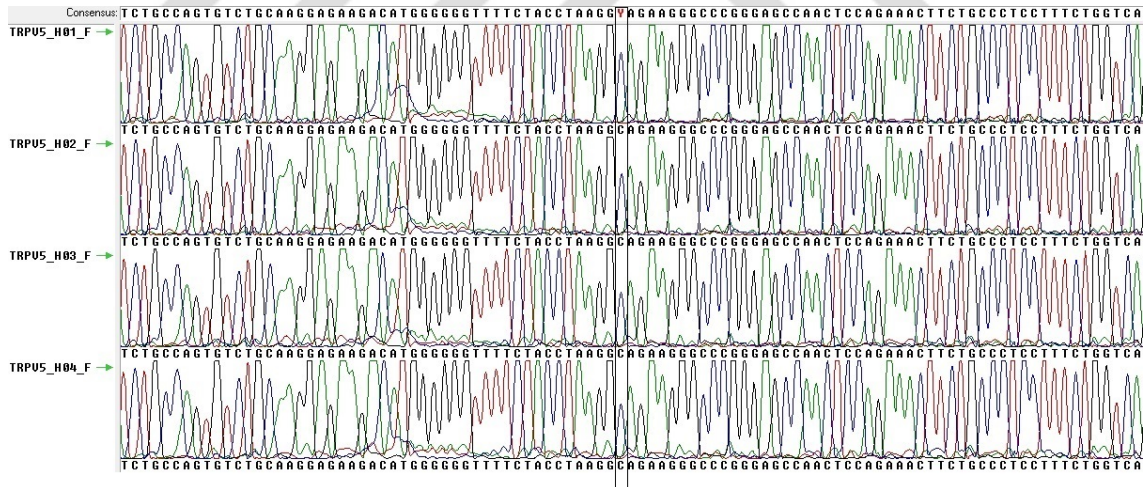
Applied Biosystems/Hitachi 3130 (XL) Genetic Analyzer cihazıyla yapılan TRPV5'e ait dizileme sonuçlarına dair kromatogramlar Şekil 4-3 ile Şekil 4-20 arasında gösterilmiştir.



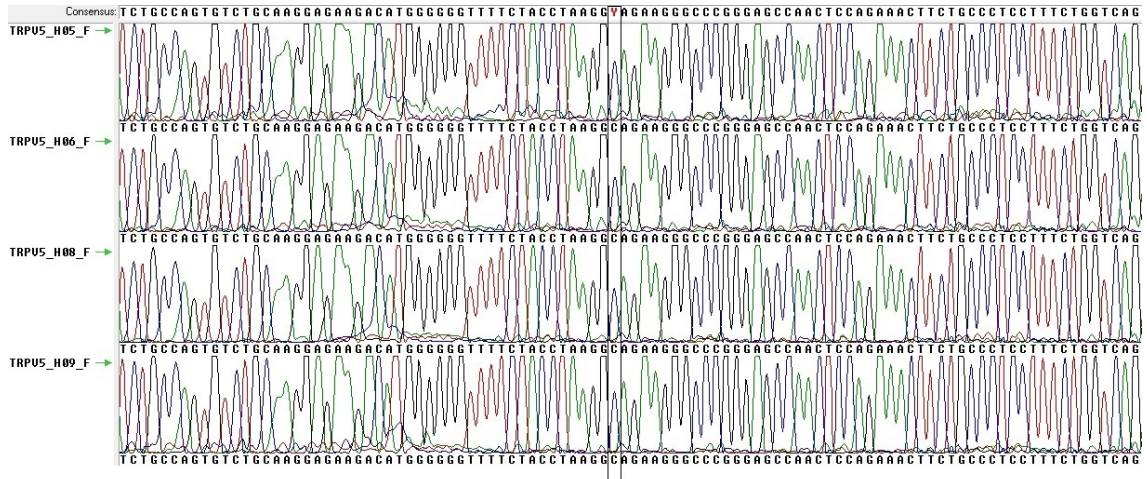
Şekil 4-3 : TRPV5 A8V C>T'ye Ait Kromatogram



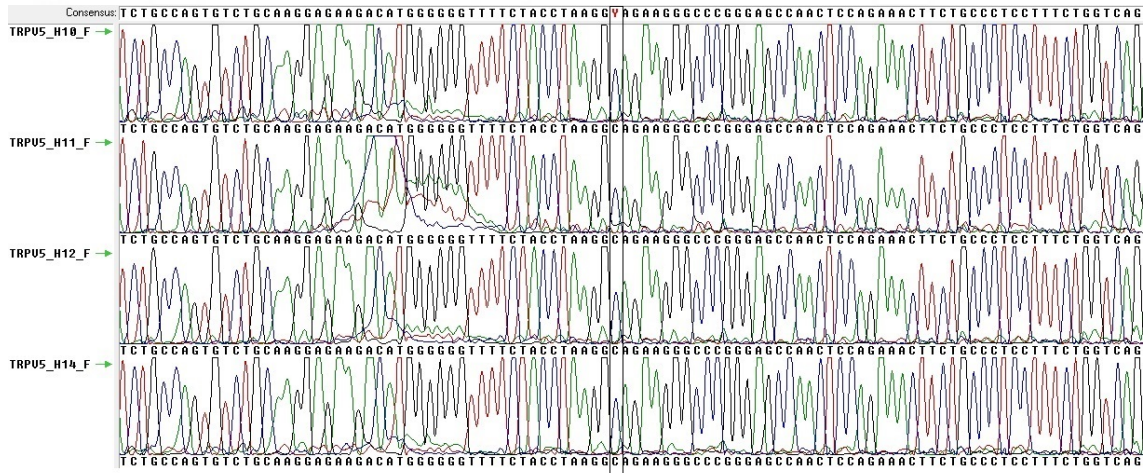
**şekil 4-4 : 7, 13, 26 Numaralı Hasta Örneğlerinin Heterozigot Mutant Alleli ile 20 Numaralı Hasta Örneğinin Homozigot Wild-type Alleline Ait Kromotogram**



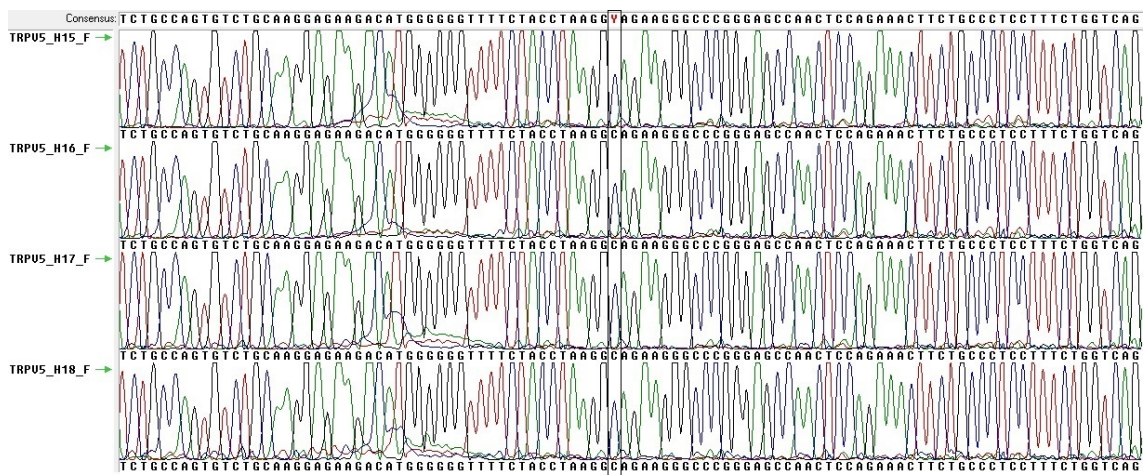
**şekil 4-5 : 1-4 Numaralı Hasta Örneğine Ait Kromotogram**



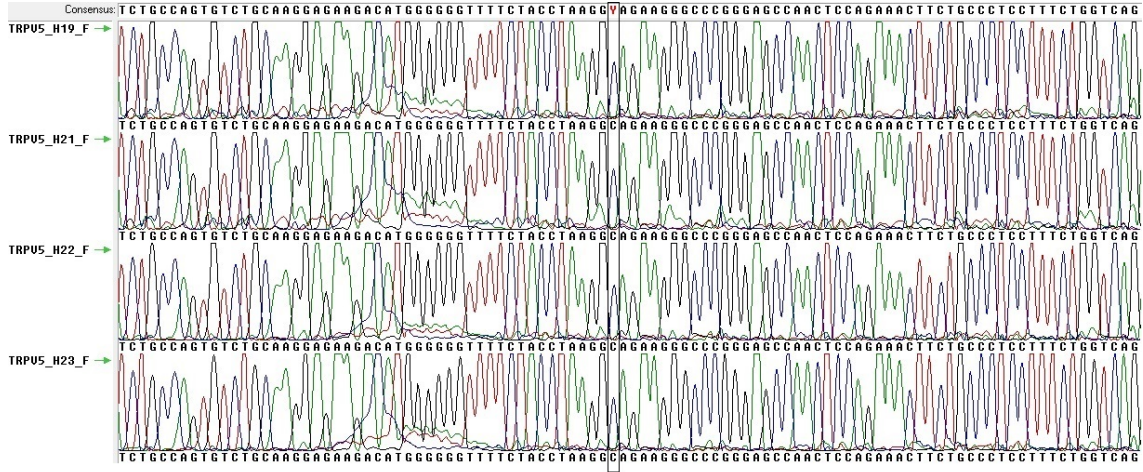
**Şekil 4-6 : 5-8 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram**



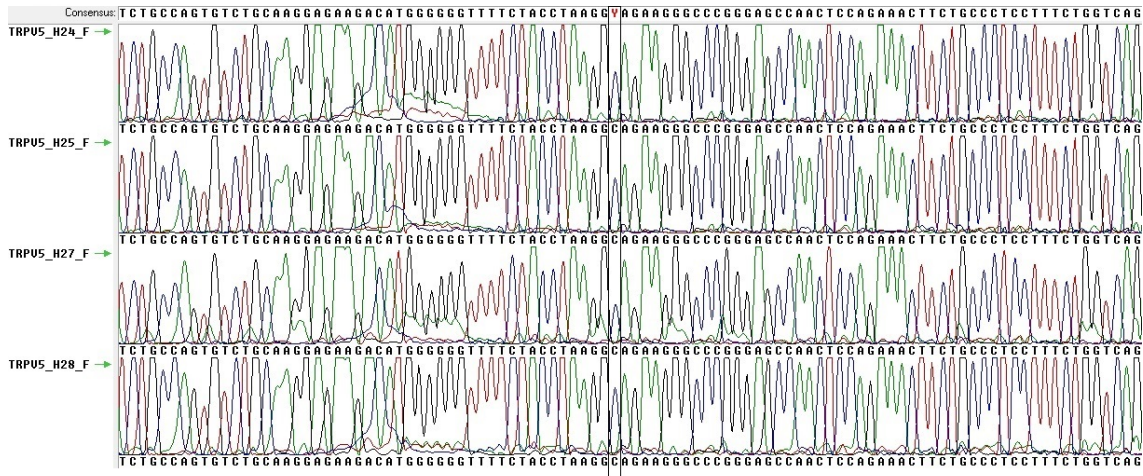
**Şekil 4-7 : 10-12, 14 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram**



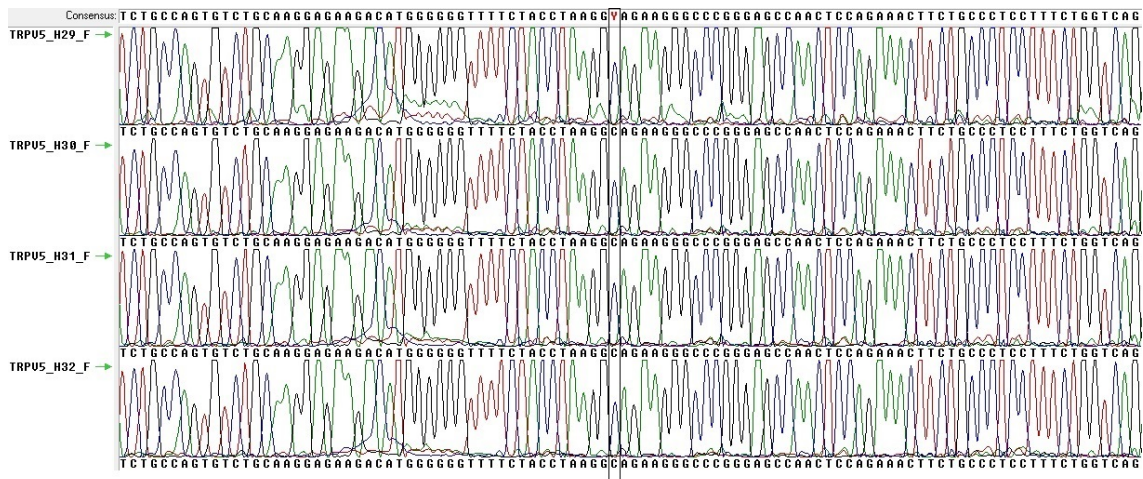
**Şekil 4-8 : 15-18 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram**



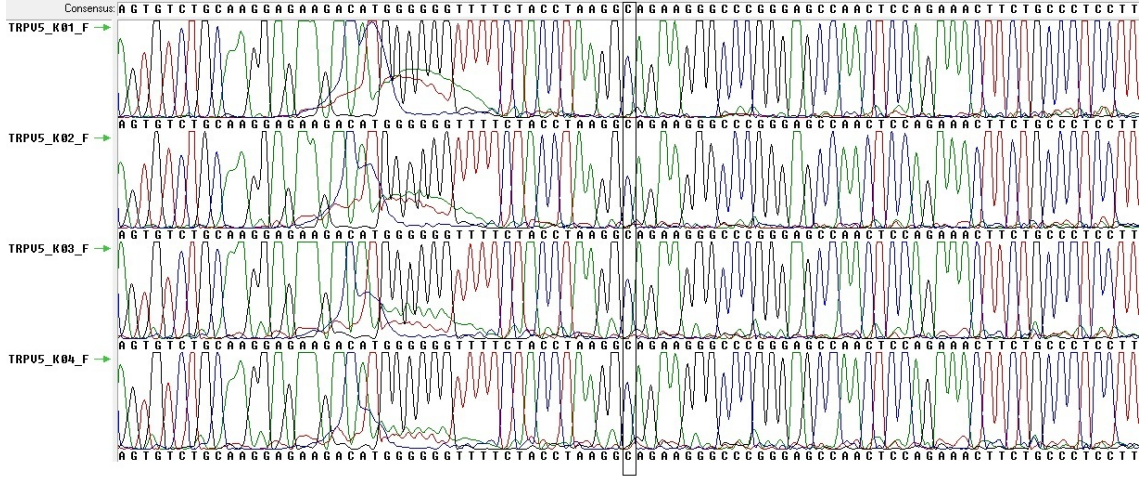
Şekil 4-9 : 19, 21-23 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram



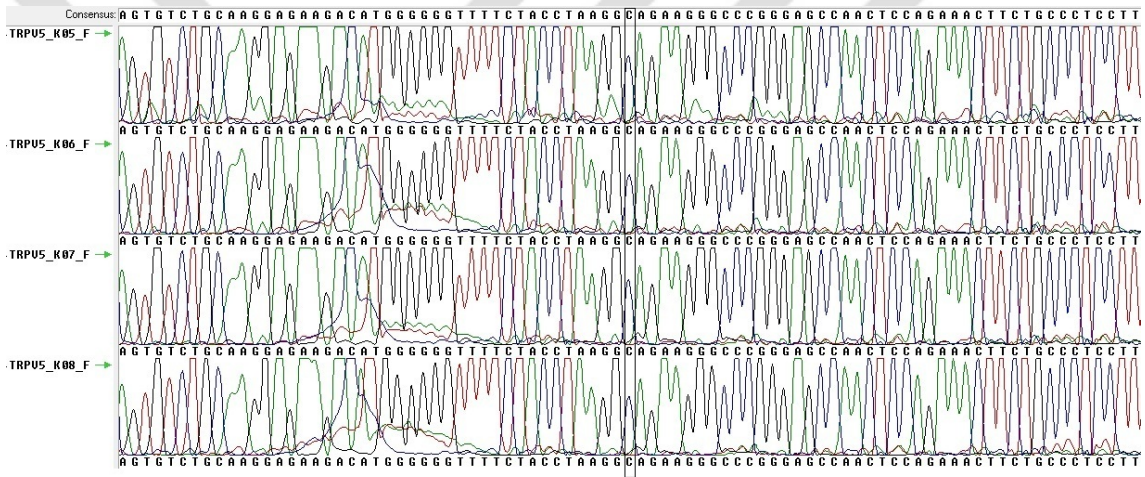
Şekil 4-10 : 24, 25, 27, 28 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram



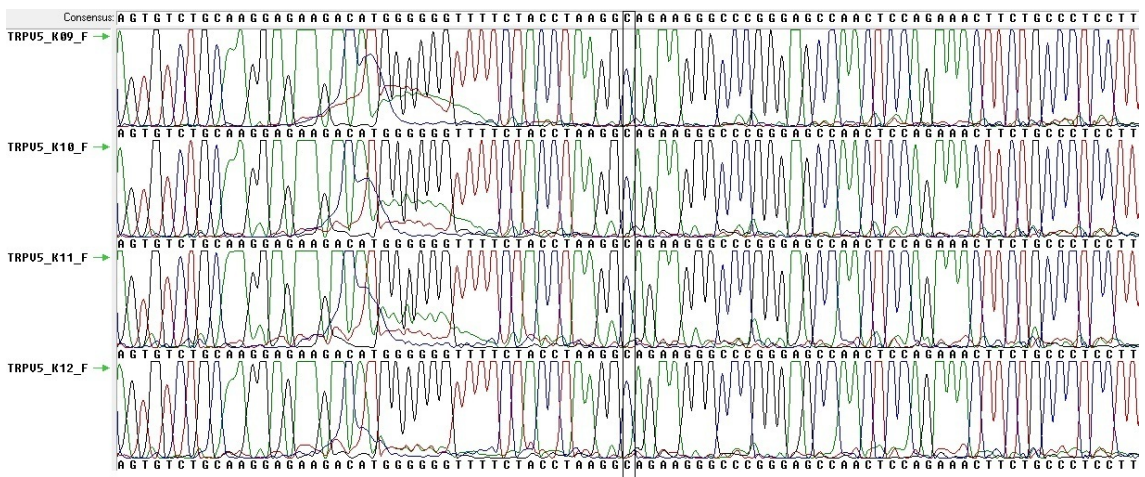
Şekil 4-11 : 29-32 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram



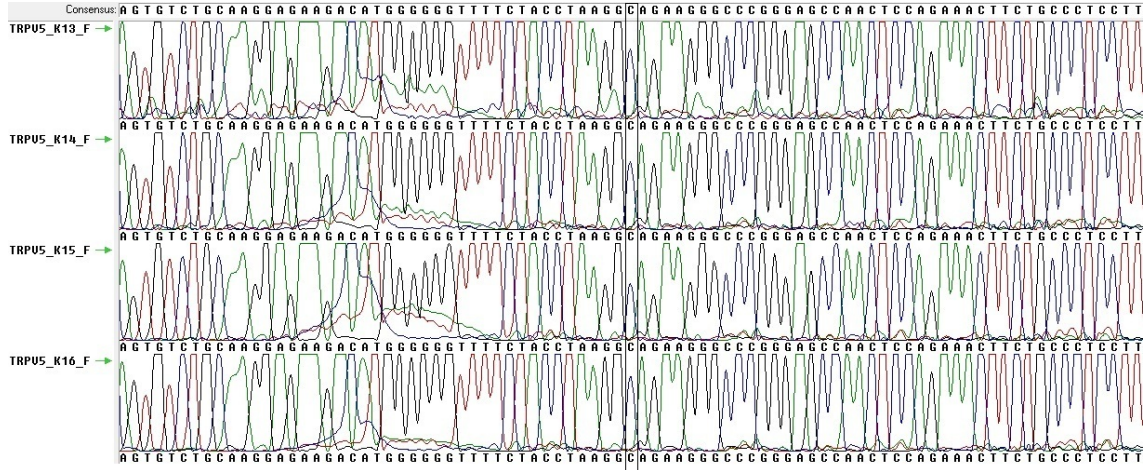
**Şekil 4-12 : 1-4 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**



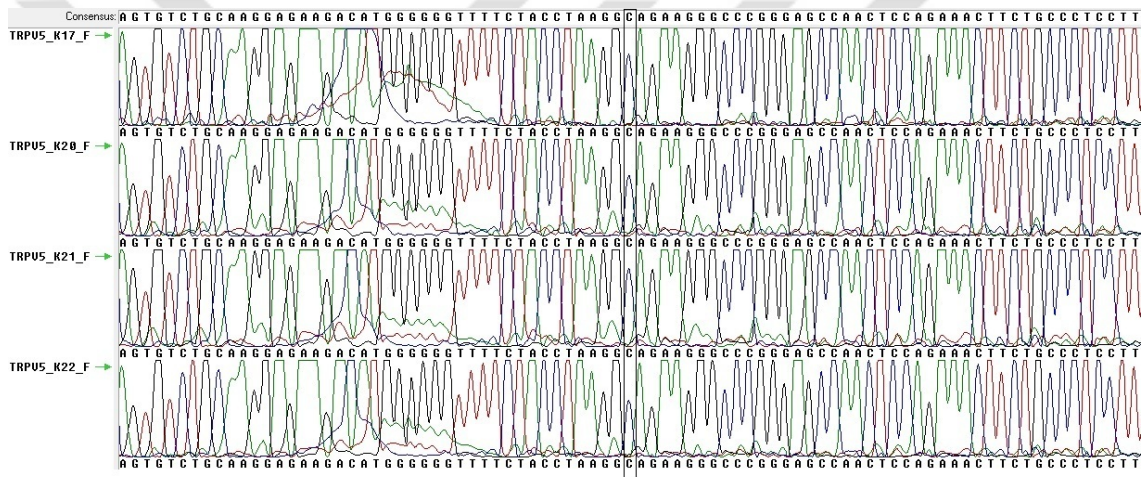
**Şekil 4-13 : 5-8 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**



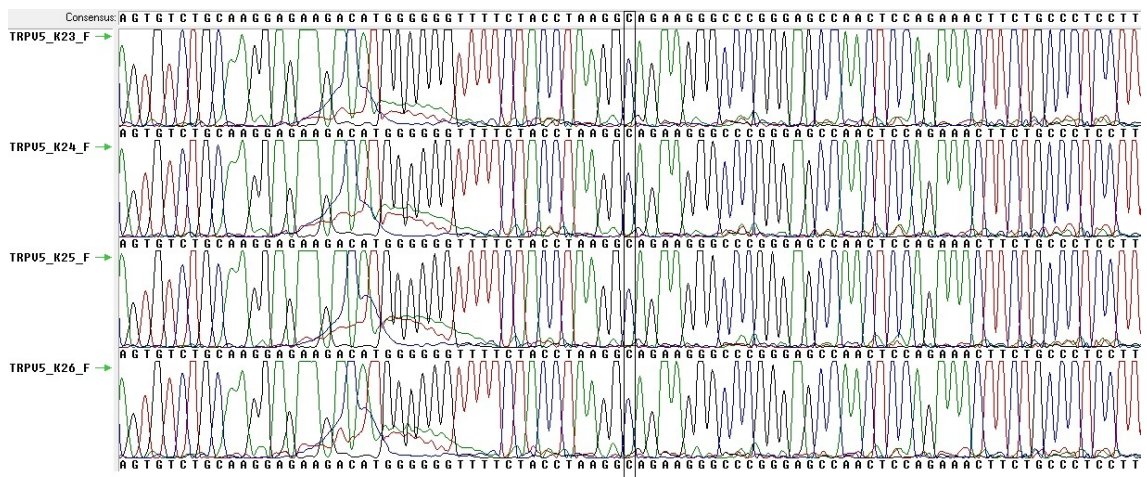
**Şekil 4-14 : 9-12 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**



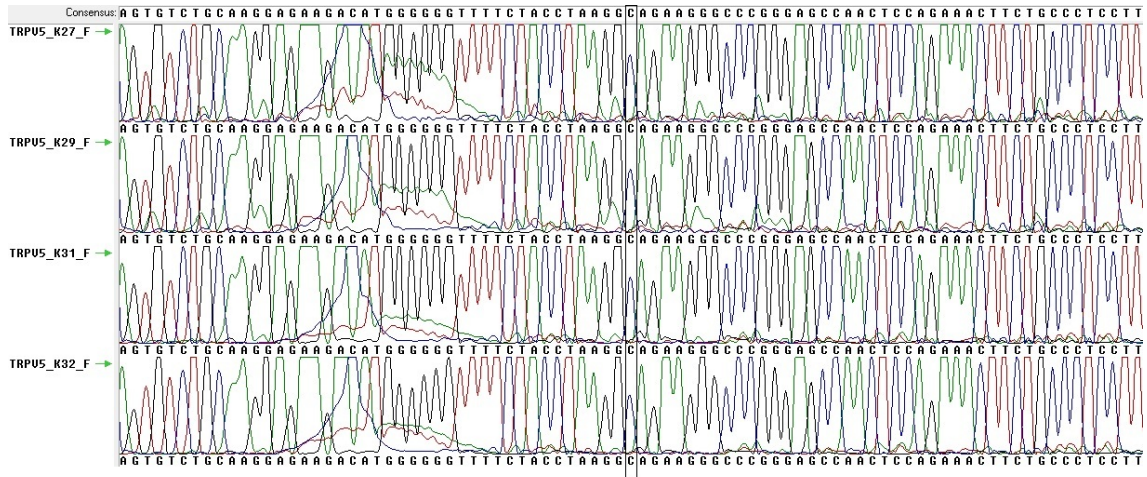
**Şekil 4-15 : 13-16 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**



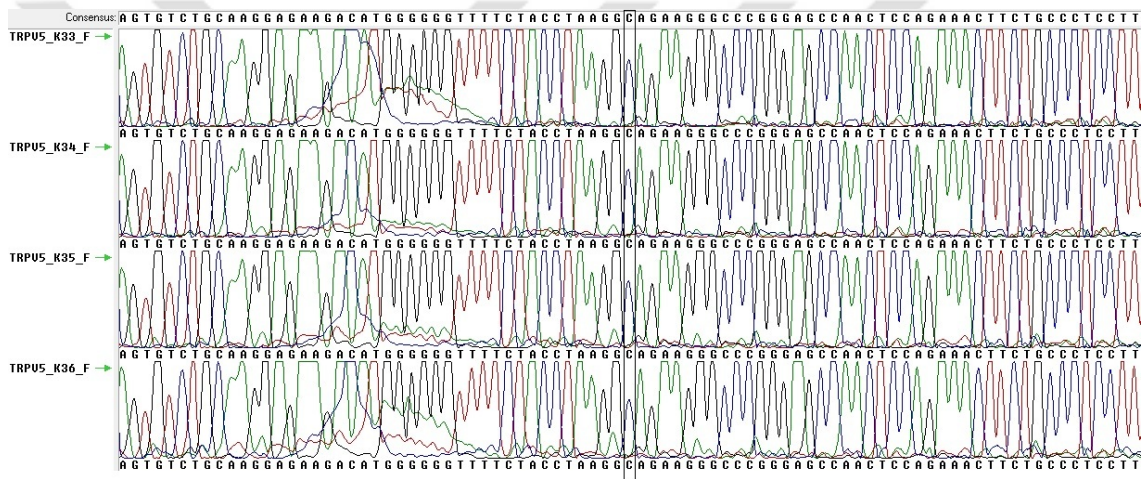
**Şekil 4-16 : 17, 20-22 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**



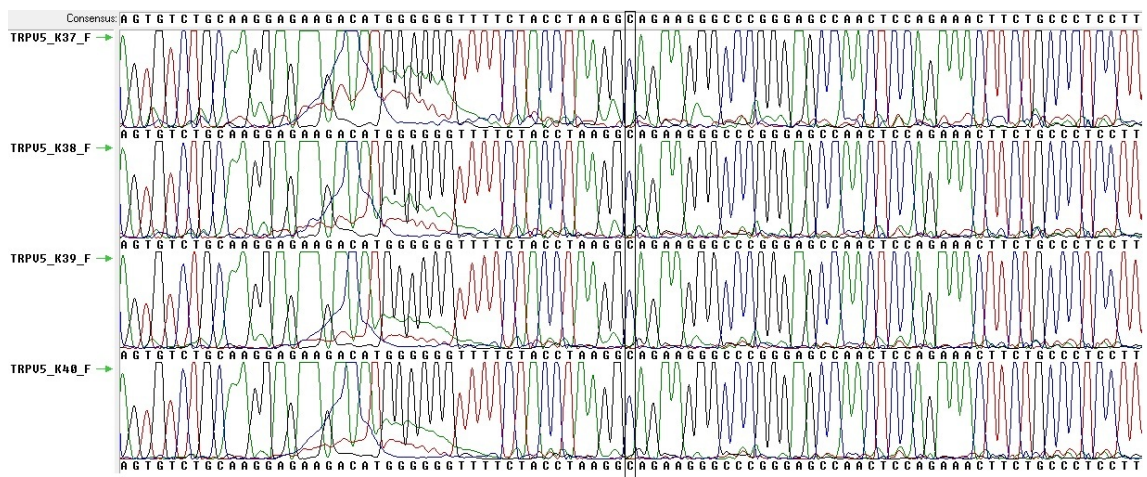
**Şekil 4-17 : 23-26 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**



**Şekil 4-18 : 27, 29, 31, 32 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**

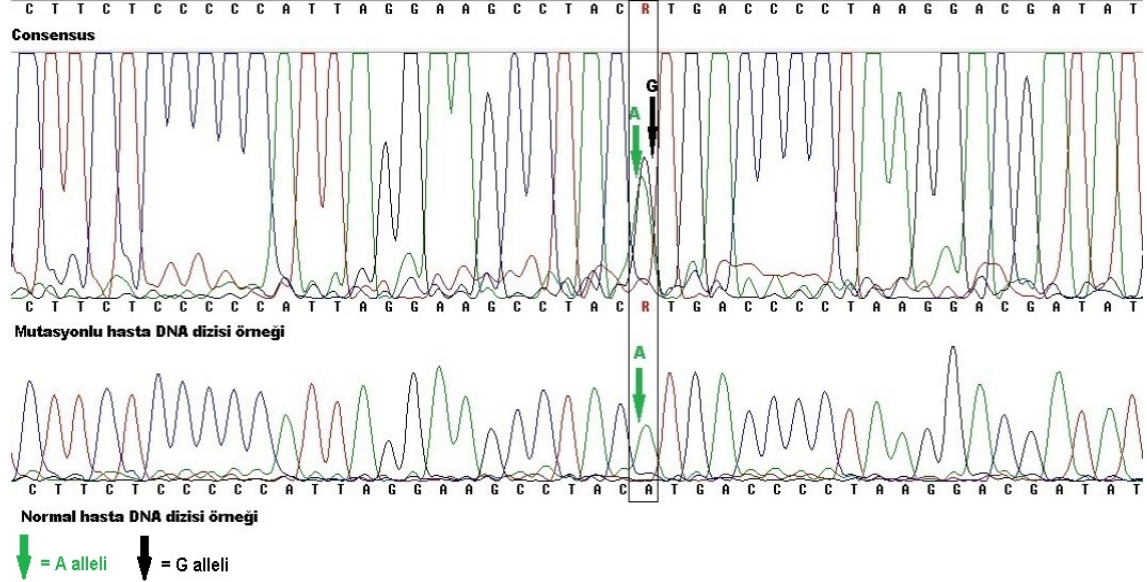


**Şekil 4-19 : 33-36 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**

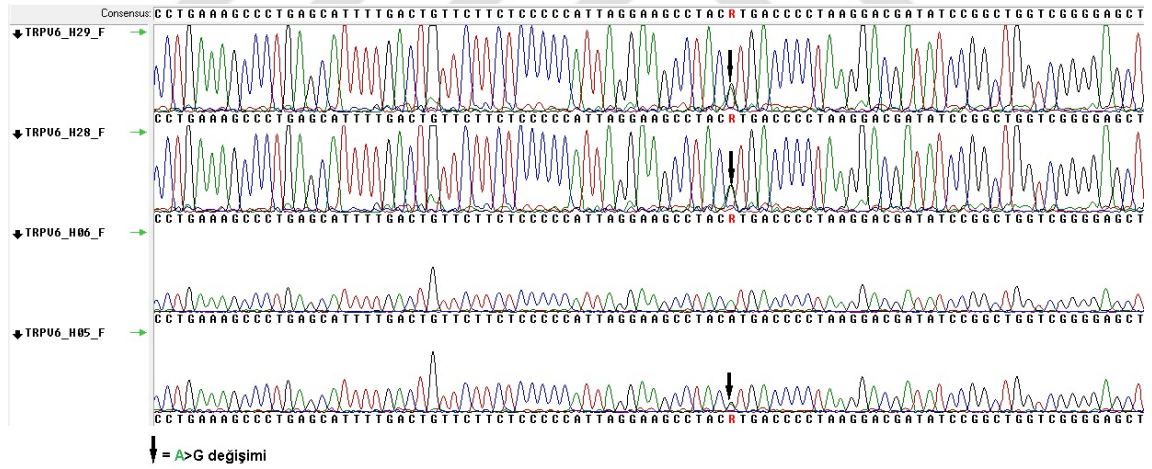


**Şekil 4-20 : 37-40 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**

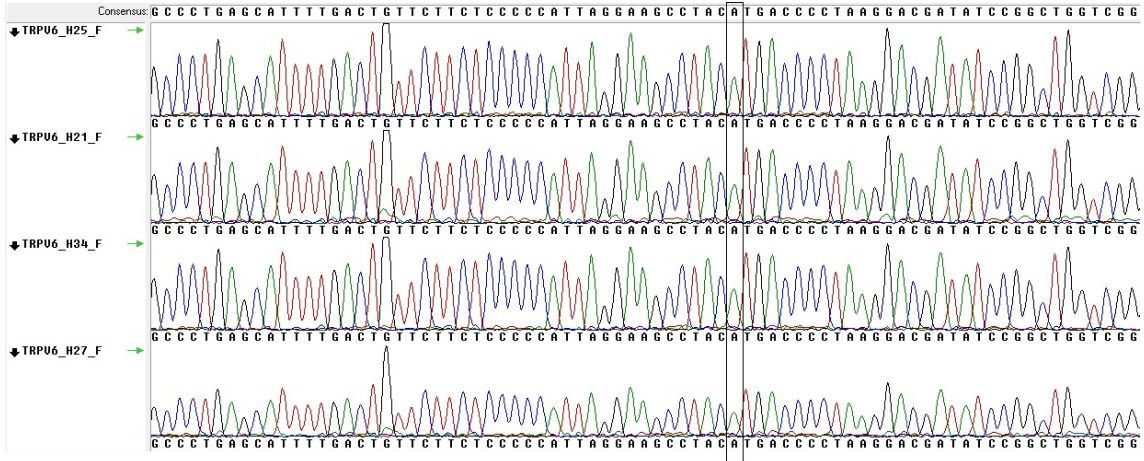
Applied Biosystems/Hitachi 3130 (XL) Genetic Analyzer cihazıyla yapılan TRPV6'ya ait dizileme sonuçlarına dair kromatogramlar Şekil 4-21 ile Şekil 4-39 arasında gösterilmiştir.



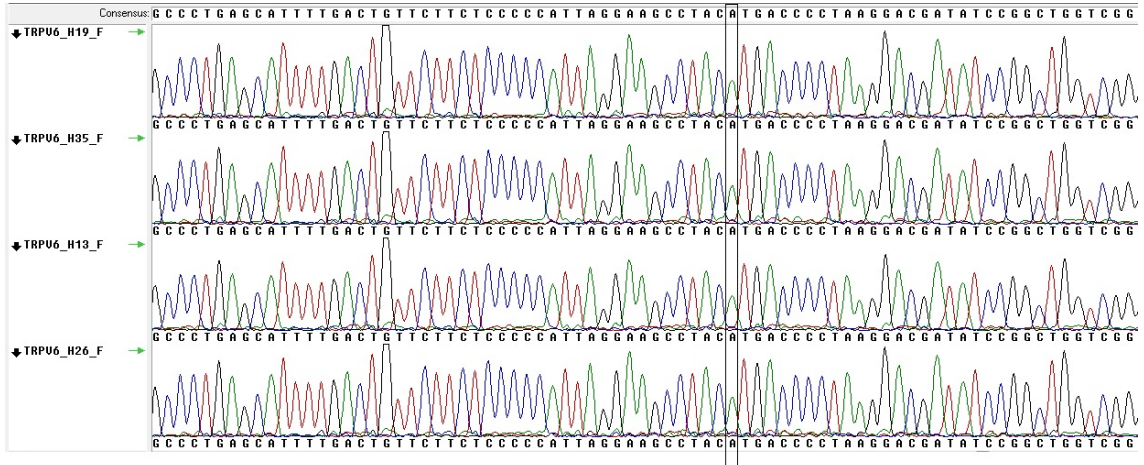
Şekil 4-21 : TRPV6 M378V A>G'ye Ait Kromatogram



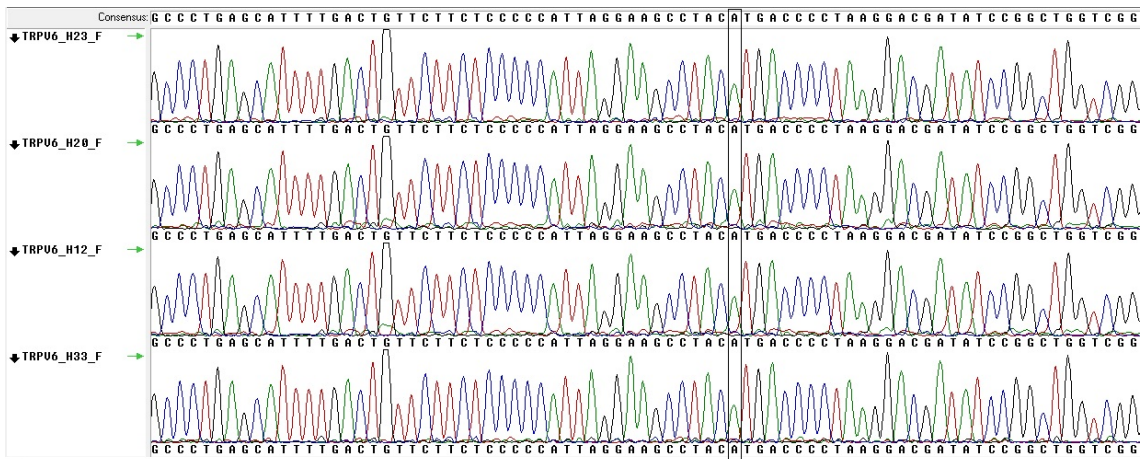
Şekil 4-22 : 5, 28, 29 Numaralı Hasta Örneklerinin Heterozigot Mutant Alleli ile 6 Numaralı Hasta Örneğinin Homozigot Wild-type Alleline Ait Kromatogram



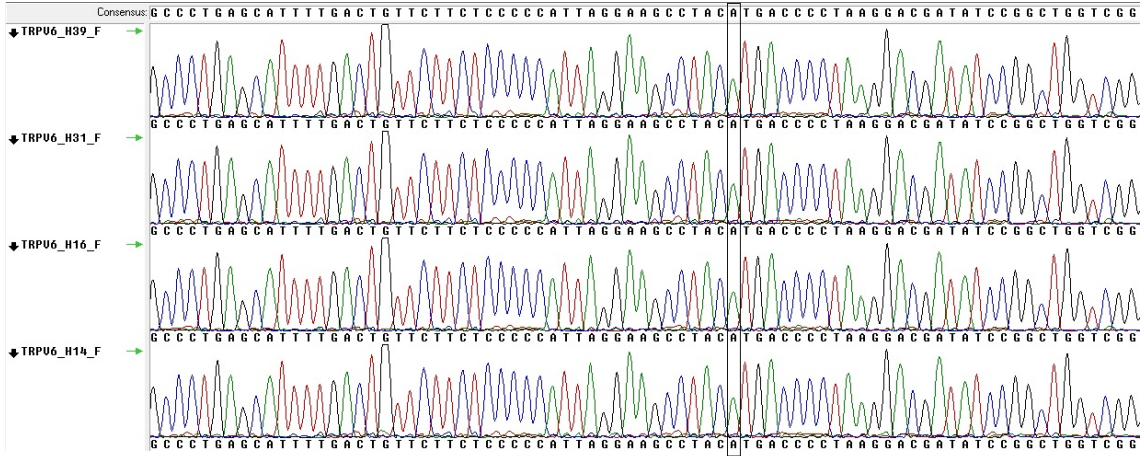
Şekil 4-23 : 21, 25, 27, 34 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram



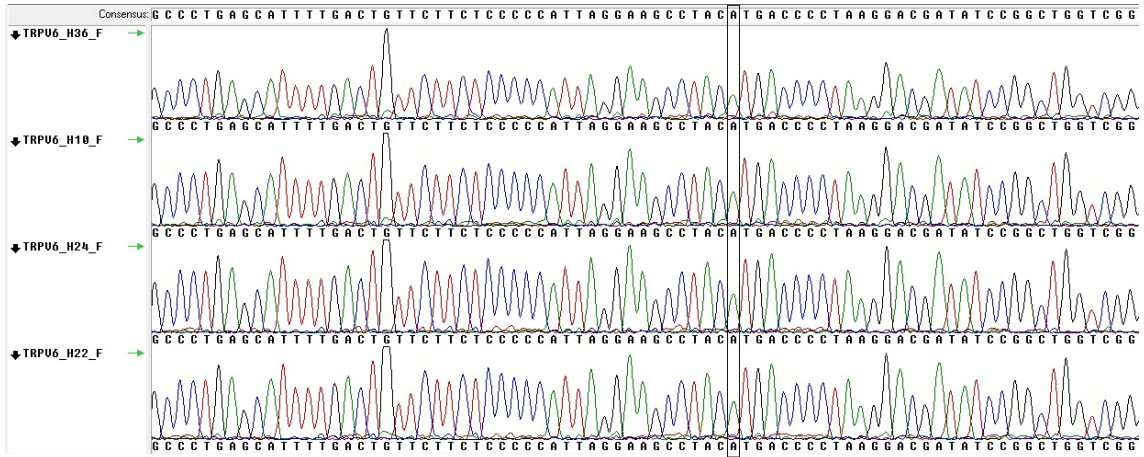
Şekil 4-24 : 13, 19, 26, 35 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram



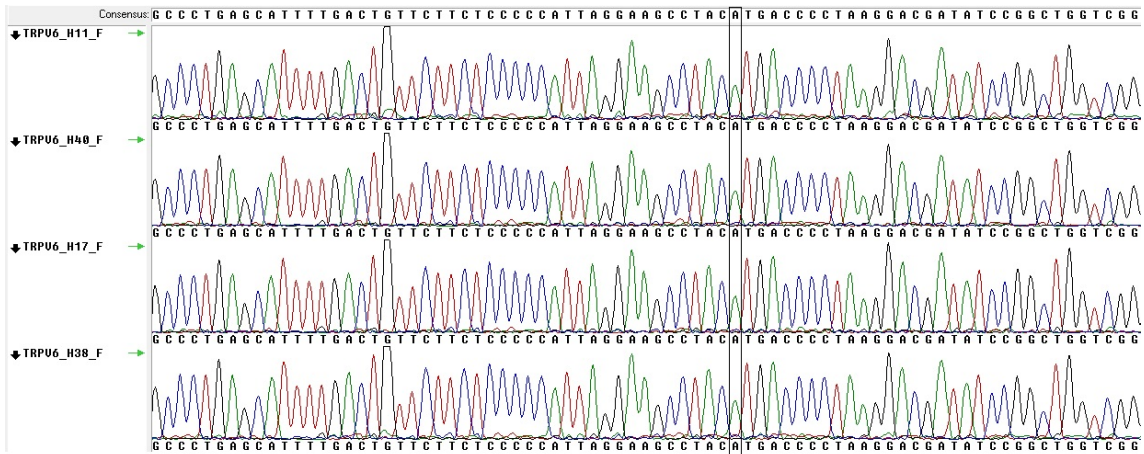
Şekil 4-25 : 12, 20, 23, 33 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram



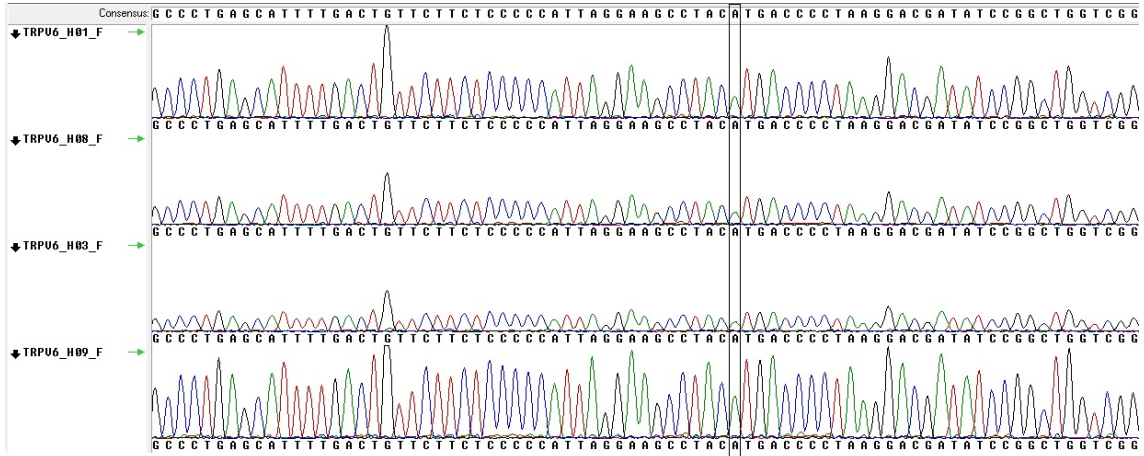
**Şekil 4-26 : 14, 16, 31, 39 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram**



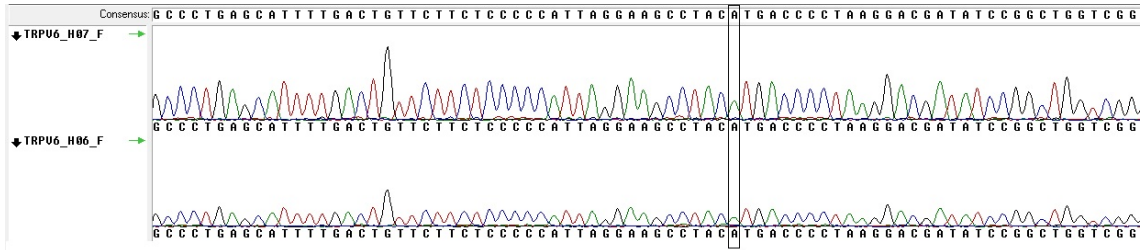
**Şekil 4-27 : 10, 22, 24, 36 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram**



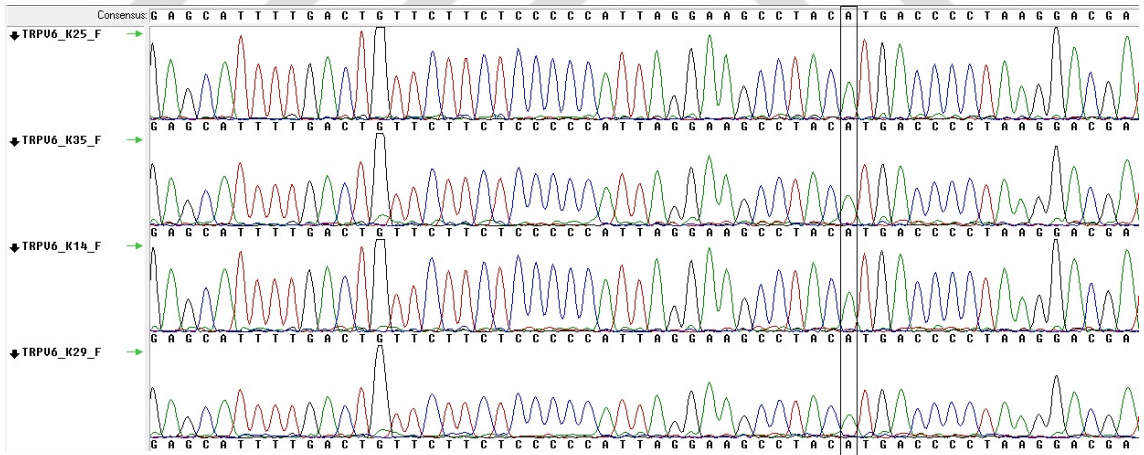
**Şekil 4-28 : 11, 17, 38, 40 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram**



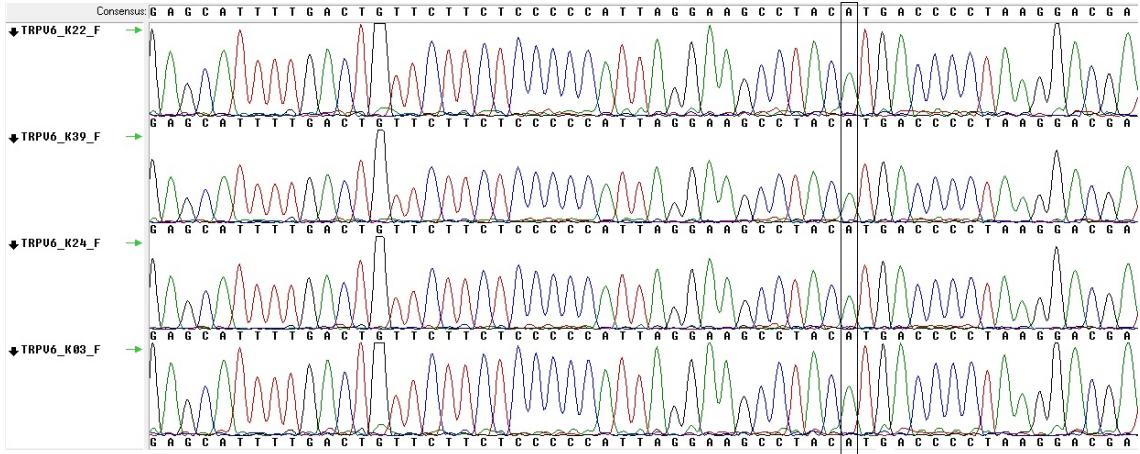
**Şekil 4-29 : 1, 3, 8, 9 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram**



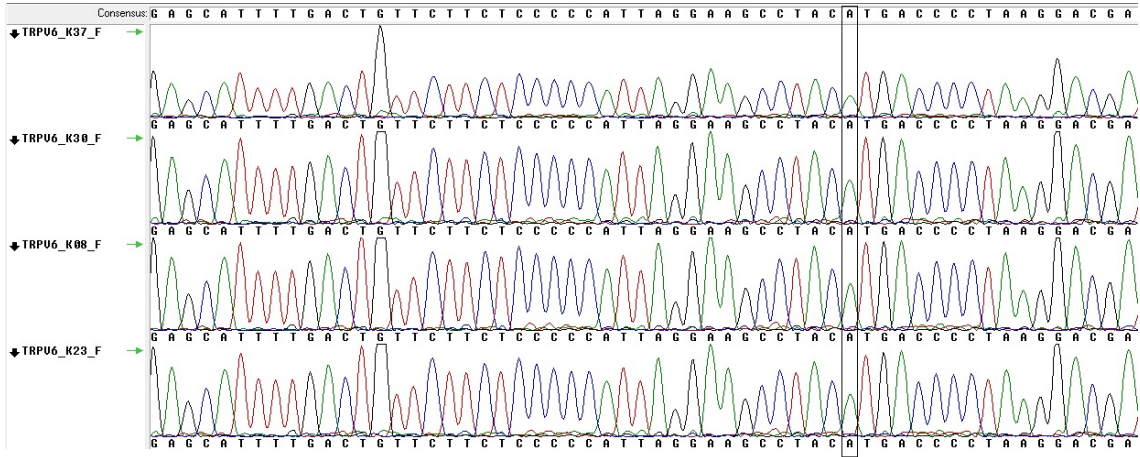
**Şekil 4-30 : 7, 6 Numaralı Hasta Örneklerine Ait Kromatogram**



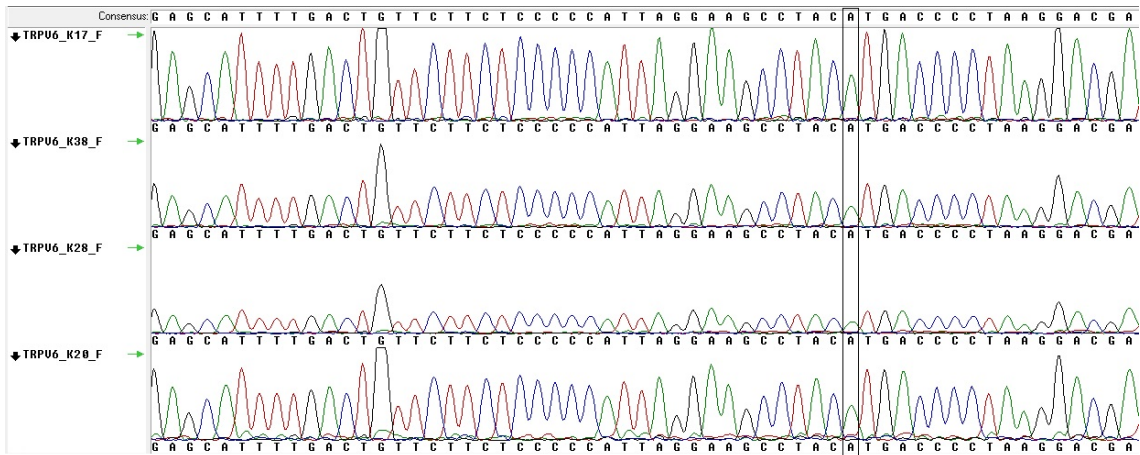
**Şekil 4-31 : 14, 25, 29, 35 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**



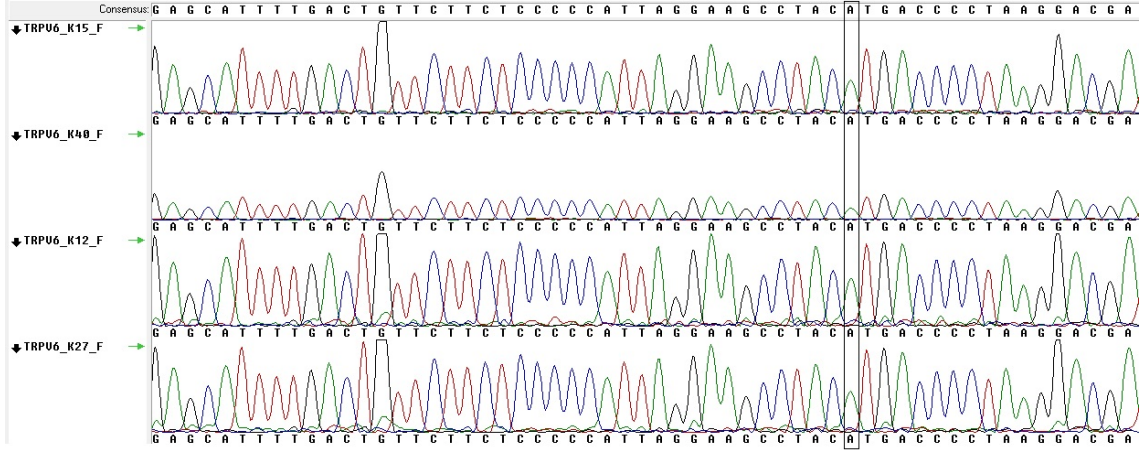
Şekil 4-32 : 3, 22, 24, 39 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram



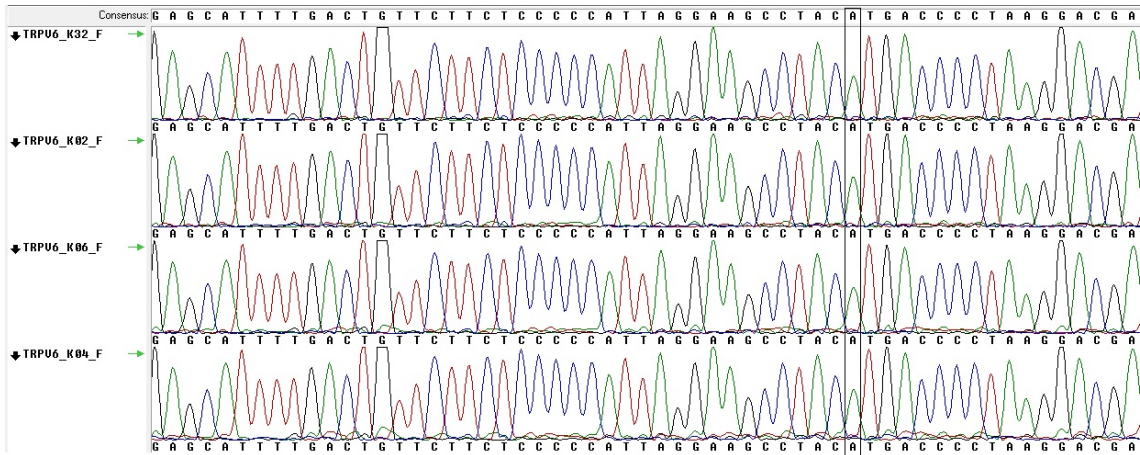
Şekil 4-33 : 8, 23, 30, 37 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram



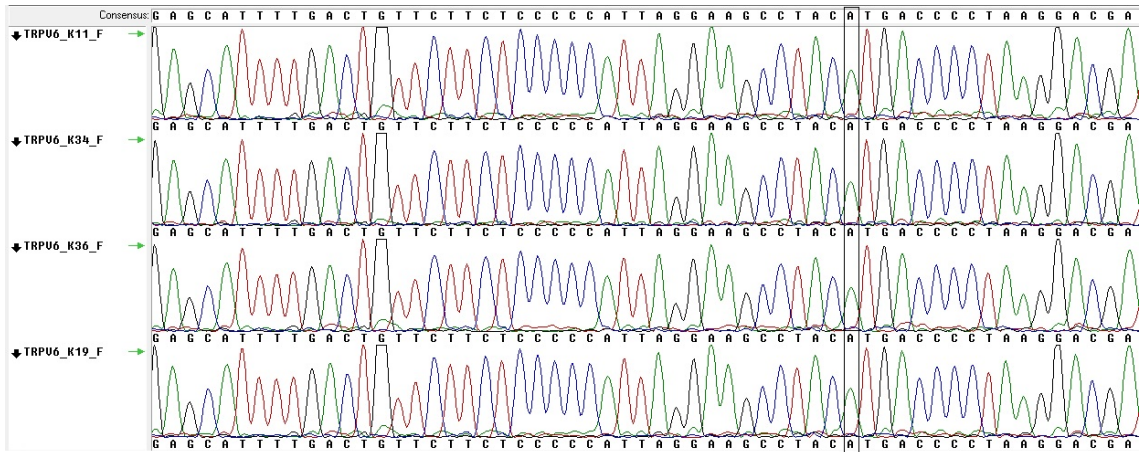
Şekil 4-34 : 17, 20, 28, 38 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram



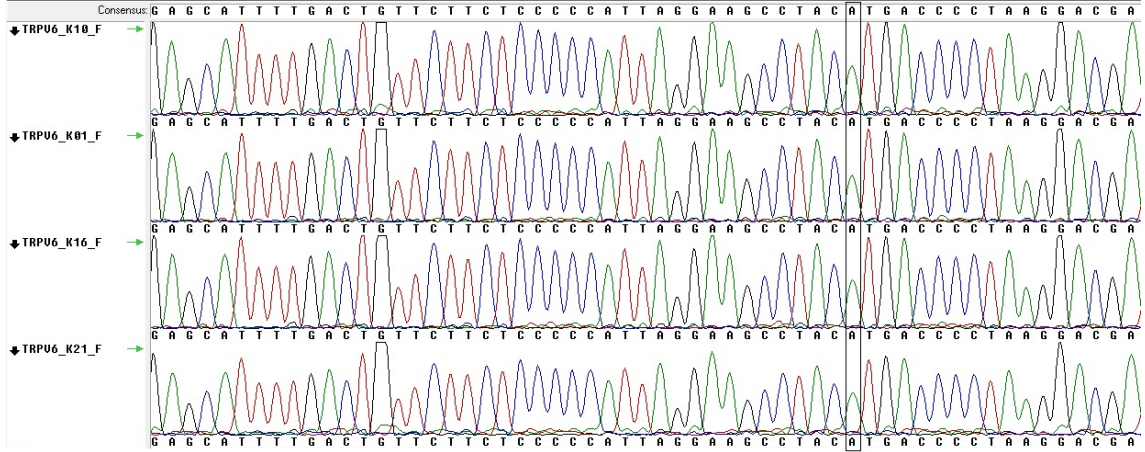
**Şekil 4-35 : 12, 15, 27, 40 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**



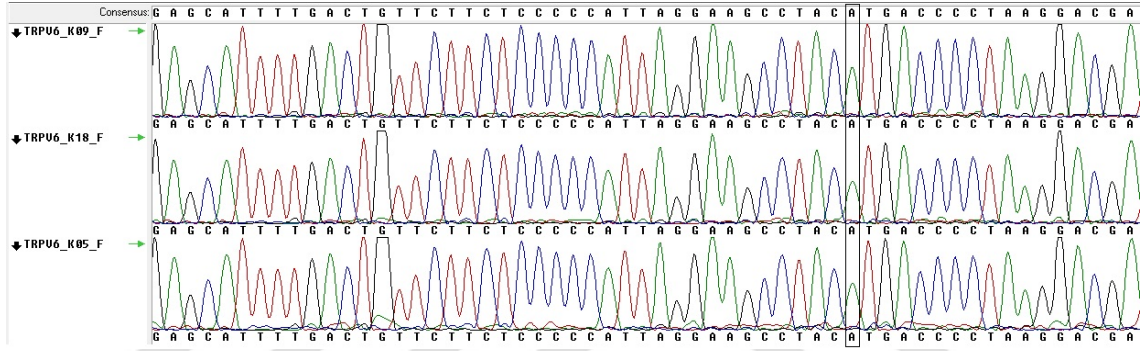
**Şekil 4-36 : 2, 4, 6, 32 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**



**Şekil 4-37 : 11, 19, 34, 36 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**



**Şekil 4-38 : 1, 10, 16, 21 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**



**Şekil 4-39 : 5, 9, 18 Numaralı Kontrol Örneklerine Ait Kromatogram**

#### 4.5. TRPV Genotiplerinin Hasta ve Kontrol Gruplarında Karşılaştırılması

KRK hastalarında TRPV5 rs4252372 gen polimorfizmine ait genotip dağılımları Tablo 4-2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4-2 : KRK Hastalarında TRPV5 rs4252372 ve TRPV6 rs4987667 Gen Polimorfizmlerine Ait Genotip Dağılımları**

|                        | <b>Kolorektal Kanserli Hastalar<br/>n(%)</b> | <b>Kontroller<br/>n(%)</b> |
|------------------------|--|----------------------------|
| <b>TRPV5 rs4252372</b> |  |                            |
| CC                     | 30(91,0)                                     | 37(100)                    |
| CT                     | 3(9,0)                                       | 0                          |
| <b>TRPV6 rs4987667</b> |  |                            |
| AA                     | 30(91,0)                                     | 37(100)                    |
| AG                     | 3(9,0)                                       | 0                          |

TRPV5 rs4252372 (C287T A8V) ve TRPV6 rs4987667 (M378V) gen polimorfizmi sonuçlarına bakıldığında, genotip dağılımı açısından kontrol grubu ve kolorektal kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. Hasta grubunda TRPV5 rs4252372 ve TRPV6 rs4987667 genotiplerinin klinikopatolojik parametrelere göre dağılımı Tablo 4-3'te verilmiştir.

**Tablo 4-3 : Hasta Grubunda TRPV5 rs4252372 ve TRPV6 rs4987667 Genotiplerinin Klinikopatolojik Parametrelere Göre Dağılımı**

|                                | TRPV5 rs4252372 |         | TRPV6 rs4987667 |         |
|--------------------------------|-----------------|---------|-----------------|---------|
|                                | CC n(%)         | CT n(%) | AA n(%)         | AG n(%) |
| <b>Cinsiyet</b>                |                 |         |                 |         |
| <b>Kadın</b>                   | 11(36,7)        | 2(66,7) | 11(36,7)        | 2(66,7) |
| <b>Erkek</b>                   | 19(63,3)        | 1(33,3) | 19(63,3)        | 1(33,3) |
| <b>Evre</b>                    |                 |         |                 |         |
| <b>Erken evre</b>              | 12(40,0)        | 0       | 12(40,0)        | 0       |
| <b>Geç evre</b>                | 18(60,0)        | 3(100)  | 18(60,0)        | 3(100)  |
| <b>Metastaz</b>                |                 |         |                 |         |
| <b>Var</b>                     | 20(66,7)        | 3(100)  | 21(70,0)        | 3(100)  |
| <b>Yok</b>                     | 10(33,3)        | 0       | 9(30,0)         | 0       |
| <b>Anjiyolenfatik İnvazyon</b> |                 |         |                 |         |
| <b>Var</b>                     | 12(40,0)        | 3(100)  | 13(40,0)        | 3(100)  |
| <b>Yok</b>                     | 18(60,0)        | 0       | 17(60,0)        | 0       |
| <b>Perinöral İnvazyon</b>      |                 |         |                 |         |
| <b>Var</b>                     | 9(30)           | 3(100)  | 10(30)          | 3(100)  |
| <b>Yok</b>                     | 21(70)          | 0       | 20(70)          | 0       |
| <b>Tümör Yerleşim</b>          |                 |         |                 |         |
| <b>Sağ Kolon</b>               | 6(20,0)         | 0       | 6(20,0)         | 0       |
| <b>Sol Kolon</b>               | 2(6,7)          | 0       | 2(6,7)          | 0       |
| <b>Transvers</b>               | 3(10,0)         | 0       | 2(6,7)          | 1(33,3) |
| <b>Rektum</b>                  | 15(50)          | 1(33,3) | 15(50)          | 1(33,3) |
| <b>Sigmoid</b>                 | 4(13,3)         | 2(66,7) | 5(16,7)         | 1(33,3) |

TRPV5 rs4252372 için hasta grubunda metastaz, tümör yerleşim yeri, kadın cinsiyet, hastalık evresi, anjiyolenfatik invazyon ve perinöral invazyon arasında ilişki bulunmuştur. T alleli bulundurmanın metastaz ile doğrudan ilişkili olduğu görülmüştür. Mutasyon görülen hasta gruplarında tümör yerleşim yeri rektuma oranla sigmoidde 2 kat daha fazla görülmüştür. Kadın cinsiyette mutasyon görülme oranının erkek cinsiyete göre 2 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Geç evre KKK'da T alleli bulundurmanın riskli olabileceği düşünülmektedir.

TRPV6 rs4987667 için hasta grubunda metastaz, kadın cinsiyet, hastalık evresi anjiyolenfatik invazyon ve perinöral invazyon arasında ilişki bulunmuştur. G alleli bulundurmanın metastaz, anjiyolenfatik invazyon ve perinöral invazyon ile doğrudan ilişkili olduğu görülmüştür. Kadın cinsiyette mutasyon görülme oranının erkek cinsiyete göre 2 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Geç evre KKK'da G alleli bulundurmanın riskli olabileceği düşünülmektedir.

## 5. TARTIŞMA

İnsan tümörögenezi, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların birikimi ile ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır (114). Kolorektal kanser patogenezi, iyi huylu polip olarak başlayan ve ardından adenoma-karsinomaya doğru ilerleyen çok aşamalı bir süreçtir (115).

Genetik polimorfizm çalışmaları, kanser riski ya da progresyonu ile ilişkilidir. Hastalığın teşhis ve tedavi sürecinde öncü olabilecek anti-kanser ilaçların toksisitesi ve tedavideki etkinliği gibi pek çok önemli konuda aydınlatıcı bilgiler sunmaktadır (116).

Kalsiyum dengesindeki değişimler; hücre farklılaşmasının uyarılmasına, bölünmenin artmasına ve apoptoz gibi önemli mekanizmaların etkilenmesine neden olmaktadır. Voltaj bağımlı  $Ca^{2+}$  kanalları ve depolanmış kalsiyum miktarına duyarlı  $Ca^{2+}$  kanallarının kanserle olan ilişkisi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kalsiyum kanalları; pek çok dokuda ısı, kimyasal ve mekanik cevapları da içeren birçok fizyolojik olayda kritik görevler alırken kanser gelişim ve progresyonunda anahtar rol oynamaktadır (117).

TRP kanalları; kanser hücrelerinin proliferasyon, farklılaşma, invazyon ve tümör vaskülarizasyonu gibi biyolojik süreçlerine katıldığı ve birçok tümör tipinde bulunduğu gösterilmiştir (118). Bu bilgiler ışığında; çalışmamızda, TRP kalsiyum kanalları genotip çalışması tercih edilmiştir.

Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen 33 kolorektal kanserli bireydeki polimorfik değişimler ile kolorektal kanser arasındaki ilişkinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Yapılan çalışmaların birikimlerinden çıkan sonuç, kolorektal kanserden sorumlu olabilecek gen ya da genlerin tanımlanıp hasta öyküleriyle birlikte değerlendirilmemiş olmasıdır. Buna benzer çalışmalar neticesinde önerilen hipotez, çok sayıda genetik lokusun kolorektal kanser oluşumunda ya da ilerleyişinde etkili olabileceğidir.

Restrüksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) çalışmalarında hatalı sonuç verme ihtimali yüksek olması nedeniyle altın standart olan Sanger Döngü Dizileme Yöntemi (130) tercih edildi.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda; TRP proteinlerini içeren birçok değişikliğin, TRP genlerindeki mutasyonlarla ilgili olmadığı gösterilmiştir. Mutasyon içermeyen, normal TRP proteinlerinin artan ya da azalan ekspresyonları, daha çok kanserin evresine bağlıdır. Özellikle TRPC, TRPM ve TRPV'nin kanser gelişimi, büyümesi ve tümörogeneziyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (131). Buna paralel olarak bizim çalışmamızda da TRPV5 rs4252372 genotipi ile metastaz, tümör yerleşim yeri, kadın cinsiyet ve hastalık evresi arasında bağlantı tespit edilmiştir.

Literatür detaylı olarak incelendiğinde; KRK hastalarında TRPV6, TRPV1 ve TRPM8 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin yoğunluklu olarak araştırıldığı görülmektedir (132-135). Farklı bir bakış açısı olarak çalışmamızda; kolorektal kanser ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz TRPV5 ve TRPV6 genlerinin genotip incelemesi yapılmış ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

Van Abel ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda,  $17\beta$ -estradiol'ün  $Ca^{2+}$  seviyesiyle birlikte renal TRPV5 mRNA ve protein sentezini arttırdığını göstermişlerdir. Ancak renal kanserlerle TRPV5 arasında önemli ölçüde bir ilişki saptayamamışlardır (136). Bunun aksine çalışmamızda; geç evre kolorektal kanser ile TRPV5 varyasyonunun ilişkisi olabileceği saptanmıştır.

İnsan Jurkat T lösemi hücre hattında ve K562 eritrolösemi hücre hattında yapılan çalışmalarda ise endojen TRPV5 mRNA ekspresyonlarını göstermişlerdir. K562 hücre hattında TRPV5 ile TRPV6 kalsiyum kanalları, birbirleriyle etkileşerek fonksiyonel homotetramerik yapı oluşturmaktadır. TRPV5 ile TRPV6 kalsiyum kanallarının ekspresyonunun 1,25-dihidroxyvitamin D3 ile kontrol edildiği de dikkate alındığında lösemi hücre farklılaşmasının 1,25-dihidroksivitamin D3'e bağımlı bir yolakla bu kanallar tarafından düzenlendiği öngörülmüştür (137, 138). Bunun paralelinde bu çalışmada; TRPV5 ve TRPV6 kalsiyum kanal protein genlerinin varyantları birlikte araştırılmıştır.

Renal hiperkalsiüri örneklerle yapılan bir çalışmada; elektrofizyolojik analizler sonucunda TRPV5 A8V mutanlığı bulunan örneklerle normal TRPV5 genotipine sahip örnekler kıyaslandığında, aralarında kayda değer bir farklılık olmadığı görülmüştür (139, 140). Ancak biz TRPV5 A8V mutanlığı bulunan kolorektal kanser örnekleri ile normal TRPV5 genotipine sahip örnekleri kıyasladığımızda, T alleli bulundurmanın geç evre hastalıkta ve hastalığın mekanizmasında riskli olabileceği belirledik.

Son yıllardaki çalışmalar TRPV6'nın prostat hücrelerinde yüksek oranda kalsiyum-seçici olduğu ve  $[Ca^{2+}]_i$  ile düzenlendiği gösterilmiştir (138). Biz de buna benzer bir ilişkinin olup olmadığını kolorektal kanser hastalarında göstermeyi amaçladık.

TRPV6 aracılığıyla  $Ca^{2+}$  girişi, yalnızca hücrelerin yüksek çoğalma oranı için koruma mekanizması olmamakla birlikte hücre sağkalımını arttırmakta ve apoptoz direncini tetiklemektedir (119). Buna benzer şekilde çalışmamıza katılan kolorektal kanser hastalarında TRPV6'da ortaya çıkan mutasyon ile hastalıkta geç evrenin ilişkili olabileceği tespit edildi.

Yapılan bazı çalışmalarda prostat (120) ve kolon kanserlerinde TRPV6'nın mRNA ve protein seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir (121). Bu ekspresyon çalışmalarına ek olarak tespit etmiş olduğumuz mutasyon kolorektal kanser hastalarında daha sık görülmektedir.

TRPV6 ekspresyonu meme adenokarsinom dokularının immünohistolojik analizleri sonucu normal dokulara kıyasla belirgin bir artış göstermiştir. Yapılan çalışmalarda; TRPV6 ile  $Ca^{2+}$  girişinin,  $Ca^{2+}$  bağımlı hücre proliferasyon oranını arttırdığı ve buna bağlı olarak tümör hücre proliferasyonu ile doğrudan ilişkili olabildiği bildirilmiştir (122). Bir başka çalışmada, TRPV6'nın normal gastrik epitelyum hücrelerine oranla gastrik kanser hücrelerinde daha yüksek eksprese olduğu gösterilmiştir (123). Bugüne kadar, TRPV6 vasıtasıyla kalsiyum girişinin  $Ca^{2+}$  bağımlı hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğu gösterildiği için çalışmamızda kolorektal kanser prognozu ile TRPV6 genetik varyantı arasında ilişki olup olmadığı araştırıldı.

TRP iyon kanalları ailesi hücre transsellüler taşıma sürecinde oran kısıtlayıcı faktör olarak görev alır ve intestinal lümeninden  $Mg^{2+}$  ile  $Ca^{2+}$  emilimini kolaylaştırır.  $Ca^{2+}$  intestinal emilimi TRPV6 tarafından düzenlenmektedir. Deney hayvanlarıyla yapılan son çalışmalarda TRPV6'nın öncelikli olarak duodenum, çekum ve kolonda TRPV6'nın ise yalnızca çekum ve kolonda eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak da  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  emilimi gastrointestinal sistemin herhangi bir bölgesinden yapılabilir (124). Bu ekspresyon çalışmalarında alınan sonuçlara paralel olarak; çalışmamızda yer alan hastaların mutasyon oranı yüksek ve bu mutasyona sahip hastaların rektum yerleşimli tümörü olduğu tespit edildi.

Bir diğerk çalışmada, TRPV6 geninde Asp541Ala mutasyonu taşıyan ve kalsiyum-kısıtlı diyet uygulanan genç farelerin duedonumlarındaki Ca<sup>2+</sup> taşınması ile normal diyete tabi ve mutasyon taşımayan fareler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (125). Ancak Woundenberg-Vrenken ve ark. tarafından yapılan çalışmada kalsiyum-kısıtlı diyet uygulanan mutant genç farelerde intestinal kalsiyum emiliminin düşük olduğu gösterilmiştir (126).

Sonuç olarak;

TRPV5 rs4252372 genotip dağılımı ve allel dağılımı açısından kontrol grubu ve KRK hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Ancak kolorektal kanser hastalarında CT genotipi bulunma oranı %7,7, CC genotipi bulunma oranı %92,3, TT genotipi bulunma oranı %0 iken kontrol grubunda CC genotipi bulunma oranı %100 olarak gözlenmiş ve farklılık tespit edilmiştir.

TRPV5 rs4252372 gen polimorfizminde kolorektal kanser hastalarında T allel bulunma oranı %7,7 iken kontrol grubunda %0 tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak T alleli bulundurma kolorektal kanser için risk olarak görülmektedir.

TRPV5 rs4252372 gen polimorfizminde CT genotipine sahip hasta grubunda metastaz görülme oranının %100 olduğu tespit edilmiştir. Bundan yola çıkarak denebilir ki; mutant genotipe sahip olma hastalığın yayılımında etkilidir.

TRPV5 rs4252372 gen polimorfizminde CT genotipine sahip olan hasta grubunun %66,7'si kadın, %33,3'ü ise erkektir. Buna göre, kadın cinsiyetin bir risk faktörü olduğu söylenebilir.

TRPV5 rs4252372 gen polimorfizminde CT genotipine sahip olan hastaların %100'ünün geç evrede olduğu tespit edilmiştir. Metastaz sonuçlarına paralel olarak mutant genotipe sahip olma hastalığın ilerleyişinde önemli bir etkendir.

Aynı gen polimorfizminde CT genotipine sahip hastaların tümör yerleşimlerine bakıldığında, hastalığın %66,7 oranla sigmoid, %33,3 oranla rektum yerleşimli olduğu görülmektedir.

TRPV6 rs4987667 genotip-allel dağılımı açısından kontrol grubu ve kolorektal kanser hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. KRK hastaları kontrol grubuna göre daha yüksek oranda G alleleline sahiptir. Buna bağlı olarak, G allelinin hastalık için risk taşıdığı söylenebilir.

TRPV6 rs4987667 gen polimorfizminde AG genotipine sahip olan hastaların çoğunun geç evrede olduğu tespit edilmiştir. Metastaz sonuçlarına paralel olarak mutant genotipe sahip olma hastalığın ilerleyişinde önemli bir etkidir.

Çalışmamız kolorektal kanserde TRPV5 rs4252372 ve TRPV6 rs4987667 varyantlarının bir arada analiz edilip değerlendirildiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Daha önce TRPV5 rs4252372 ve TRPV6 rs4987667 varyantlarıyla yapılan çalışmalar daha çok PZR-RFLP ve ekspresyon düzeyi analizine dayalı yapılmıştı. Bizim çalışmamızda her iki varyantın Sanger Döngü Dizileme Yöntemi'yle belirlenmiş olması açısından literatüre katkı sağlamaktadır. Ayrıca Türk popülasyonunda genotip frekans ve hastalık klinikopatoloji verilerinin ortaya konduğu ilk çalışmadır.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre kalsiyum kanal proteinlerinden olan TRPV5 ve TRPV6 varyantlarının, kolorektal kanser ilerlemesi ve yayılmasında potansiyel rolü olabileceği desteklenmektedir. Ancak daha kesin bir kaniya varılabilmesi için, daha geniş kapsamlı araştırmaların, daha çok hastanın çalışmaya dahil edilmesiyle yapılması gerekmektedir. Sunduğumuz verilerin gelecekte bu amaçla yapılacak çalışmalara ışık tutabileceği kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. Libutti SK, Saltz LB, Rustgi AK, Teper JE. Cancer of Colon. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Eds. Principles and Practice of Oncology, 7th Ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005:1060-1109.
2. Ries LAG, Wingo PA, Miller DS. The Annual Report to the Nation on the status of Cancer, 1973-1997, with a special section on Colorectal Cancer. Cancer, 2000; 88-2398.
3. Cooper H S., Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. 5. Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004;1543- 1595.
4. Anne B B, Clive A. Colorectal cancer. Clinical review. BMJ, 2007; 335: 715-8.
5. Ajay Dhaka, Veena Viswanath, and Ardem Patapoutian. TRP ion channels and temperature sensation. Annual Review of Neuroscience Vol. 29: 135-161.
6. Sylwester Chyb, Padinjat Raghu & Roger C. Hardie. Polyunsaturated fatty acids activate the Drosophila light-sensitive channels TRP and TRPL. Nature 397, 255-259 doi:10.1038/16703;1998.
7. Martin J. Gunthorpe, Christopher D. Benham, Andrew Randall, John B. Davis. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. Volume 23, Issue 4, p183–191, 1 April 2002
8. David E. Clapham, Craig Montell, Guenter Schultz, and David Julius. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Transient Receptor Potential Channels. Pharmacological Reviews December 2003 vol. 55 no. 4591-596.
9. Ekmekçi A, Konaç E., ve Önen H.İ. Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. Marmara Medical Journal (2008)21(3);282-295.
10. TÜİK, Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2014.
11. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.

12. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(2): 157-62.
13. Balmain A. Cancer genetics: From Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer*. 2003; 1(1): 77-82.
14. Goncalves R. ve ark. New concepts in breast cancer genomics and genetics. *Breast Cancer Research* 2014; 16:460.
15. Macleod K. Tumour suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*. 2000; 10(1): 81-93.
16. Nowell PC. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12(4): 261-6.
17. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004; 10(8): 789-99.
18. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(6): 425-36.
19. Apeessos A, Papadopoulou E, Belogiani I, Baratsis S, Triantafillidis JK, Kosmidis P, Karydas E, Briasoulis E, Pisiotis C, Papazisis K, Nasioulas G. Inherited cancer predisposition in Greece. *Anticancer Res*. 2008; 28 (2B): 1341-1347.
20. Diego M Marzese , Dave SB Hoon. Emerging technologies for studying DNA methylation for the molecular diagnosis of cancer. 2015. Vol. 15, Iss. 5,.
21. Luiz Ronaldo Alberti, Diego Paim Carvalho Garcia, Debora Lucciola Coelho, David Correa Alves De Lima, Andy Petroianu. How to improve colon cancer screening rates. *World J Gastrointest Oncol* 2015 December 15; 7(12): 484-491
22. Bernard Levin, MD; David A. Lieberman, MD; Beth McFarland, MD; Robert A. Smith, PhD; Durado Brooks, MD, MPH; Kimberly S. Andrews; Chiranjeev Dash, MD, MPH; Francis M. Giardiello, MD; Seth Glick, MD; Theodore R. Levin, MD; Perry Pickhardt, MD; Douglas K. Rex, MD; Alan Thorson, MD; Sidney J. Winawer, MD; for the American Cancer Society Colorectal Cancer Advisory Group, the US Multi-Society Task Force, and the American College of Radiology Colon Cancer Committee. Screening and Surveillance for the Early

Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin* 2008;58:130–160

23. Elmer E. van Eeghen, Sandra D. Bakker, Aart van Bochove, Ruud J. L. F. Loffeld. Impact of age and comorbidity on survival in colorectal cancer. *Gastrointest Oncol* 2015;6(6):605-612.
24. Jackson-Thompson J, Ahmed F, German RR, Lai SM, Friedman C. Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998-2001. *Cancer*. 2006;107:1103-11.
25. Figen D. Kolorektal karsinomda sınıflama ve prognostik faktörler. *Türk Patoloji Derneği Mezuniyet sonrası Eğitim Toplantısı Gastrointestinal Sistem Patolojisi Günleri, İstanbul, 2005: 47-56.*
26. [kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/1710-2012-turkiye-kanser-istatistikleri.html](http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/1710-2012-turkiye-kanser-istatistikleri.html)
27. Ströhle A, Maike W, Hahn A. Nutrition and colorectal cancer. *Med Monatsschr Pharm*, 2007; 30 : 25- 32.
28. Fenoglio-Preiser C M, Noffsinger A E, Stemmermann G N, Lantz P E, Listrom M B, Rilke F O. Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. In: *Gastrointestinal pathology an atlas and text*. 2. Edition, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999; 909-1068.
29. Rosai J. Gastrointestinal tract. In: *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, Volume 1., 9. Edition, Mosby, 2004: 776-855.
30. Thomas E R, Ira J K. Colorectal cancer: Risk factors and recommendations for early detection. *American Family Physician*, 1999 : 1-12.
31. Hagggar Fatima A. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors *Clin Colon Rectal Surg*, 2009. 22(4),191-7.
32. Triantafillidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of 59

- carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res.* 2009 Jul;29(7):2727-37.
33. Farin Amersi, M.D. *Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Services Clinics In Colon And Rectal Surgery.* 2005.
34. Tsanou E. The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res.* 2008 Nov-Dec;28(6A):3815-26.
35. Winawer SJ, Sherlock P. Best practice and research clinical gastroenterology Colorectal cancer screening, 2007; 21, 6: 1031.
36. Gönen Ö, Okan A. Kolon ve ince barsak tümörleri. İlçin G, Biberöglü K, Süleymanlar G, Ünal S, editörler. *Temel İç Hastalıkları. Güneş Kitabevi.* 2005 s. 1601-1608.
37. Kaymakoğlu S., Büyüköztürk K, Atamer T, Dilmener M, Erzenin F, Kaysı A, Ökten A, editörler. *Kolorektal polipler. İç Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri* 2007. Cilt-1 s.833-884.
38. Dolar E. Kolorektal tümörler. Dolar E, editör. *İç Hastalıkları. Nobel&Güneş Yayınları.* 2005 s. 400-408.
39. Yurdakul İ. Sindirim sisteminin selim tümörleri. Yazıcı H, Hamuryudan V, Sonsuz A, editörler. *Cerrahpaşa İç Hastalıkları. Medikal Yayıncılık.* 2007 s. 843-847.
40. World Cancer Research Found and American Institute for Cancer Research, Food Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective, Washington, DC, USA, 2007.
41. Desai TK, Barkel D. () Syndromic colon cancer: lynch syndrome and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterol Clin North Am,* 2008; 37: 47-72.
42. Mayer JR. Gastrointestinal tract cancer. In: Eugene B, Anthony S F, Dennis L K, Hauser S L, Longo D L, Jameson J L, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 2005 p. 523-533.
43. Johnson, C.M., Wei, C., Ensor, J.E., Smolenski, D.J., Amos, C.I., Levin, B. ve ark. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control,* 2013, 24: 1207-1222.

44. Ertürk, S. Kolorektal kanserler: Epidemiyoloji, etiyolojide rol oynayan etkenler, tarama ve kemoprevensiyon. Baykan, A., Zorluoğlu, A., Geçim, E. ve Terzi, C. (Ed.). Kolon ve Rektum Kanserleri. Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği, Seçli Ofset Matbaacılık ve Ambalaj Sanayi Ltd. Şti., İstanbul, 2010;15-30.
45. Wilkes, G. M., Yarbro, C. H., Wujcik, D., Gobel, B.H. Colon, Rectal, and Anal Cancers. Cancer Nursing Principles and Practice, Seventh Edition, Jones and Bartlett Publishers, LLC., Sudbury, Massachusetts, 2011, 1205-1257.
46. Kılıçkap, S., Aksoy, S. ve Çelik, İ. Kanserde Birincil Korunma. Dahili Tıp Bilimleri Dergisi, 2006, 13(2): 57-71.
47. Baykan A, Zorluoğlu A, Geçim E, Terzi C, (Ed). Kolon ve Rektum Kanserleri. 1. Baskı. Türk Kolon ve Rektum Hastalıkları Derneği, Seçil Ofset Matbaacılık ve Ambalaj Sanayi Ltd Şti, İstanbul, 2010:39-69.
48. Kanser Daire Başkanlığı (KDB). Kolorektal Kanser Taramaları. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 2013. Erişim 30.08.2014, <http://kanser.gov.tr/Dosya/Bilgi-Dokumanlari/raporlar/kolorektal.pdf>.
49. Landis SH, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics .CA Cancer J Clin 1999;49:8-31.
50. American Cancer Society (ACS). (2014). Colorectal Cancer Facts and Figures 2014-2016. American Cancer Society, Inc. Atlanta, Erişim 30.08.2014, <http://www.cancer.org/acs/groups/content/documents/document/acspc-042280.pdf>
51. Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. (Çeviri Editörü, Yıldırım M) Anatomi. 2. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi. 2007; p: 266-284.
52. Fujita T. Colorectal cancer. Lancet, 2010; 376(9738): 331.
53. Lü B, Xu J, Lai M, Zhang H, Chen J. A transcriptome anatomy of human colorectal cancers. BMC Cancer, 2006; 23: 6-40.
54. AKKIZ H. Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer Türkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics 2009;2(3):5-12.

55. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (Çev: Bayru N, Dalay N, Özgüç M, Öztürk M, Sakızlı M). Hücrenin Moleküler Biyolojisi. 4. Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi, 2008; p: 1313-1362.
56. Josep J. General Aspects of Colorectal Cancer ISRN Oncology doi:10.5402/2012/139268.
57. Starr TK, Allaei R, Silverstein KA, Staggs RA, Sarver AL, Bergemann TL, Gupta M, O'Sullivan MG, Matise I, Dupuy AJ, Collier LS, Powers S, Oberg AL, Asmann YW, Thibodeau SN, Tessarollo L, Copeland NG, Jenkins NA, Cormier RT, Largaespada DA. A transposon-based genetic screen in mice identifies genes altered in colorectal cancer. 2009, Science, 323: 1747-50.
58. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. A Molecular pathways in colorectal cancer, Journal of Gastroenterology and Hepatology 2012, 27(9) 1423–1431.
59. Centelles JJ. General Aspects of Colorectal Cancer ISRN Oncology doi:10.5402/2012/139268.
60. Cruz-Bustillo Clarens D. Molecular genetics of colorectal cancer, 2004, 96(1):48-59.
61. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. Histopathology. 2007; 50: 113-30.
62. J. Perea, M. Lomas and M. Hidalgo. Molecular basis of colorectal cancer: Towards an individualized management? REV ESP ENFERM DIG (Madrid). Vol. 103. N.º 1, pp. 29-35, 2011.
63. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. Cancer Metastasis Rev 2004; 23: 11-27.
64. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. J Mol Diagn 2006; 8: 412-19.
65. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. Gastroenterology. 2010; 138: 2059-72 -67.

66. Lanza G, Matteuzzi M, Gafa R, et al. Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *Int J Cancer*. 1998; 79: 390-5.
67. Wang W, Wang G-Q, Sun X-W, et al. Prognostic values of chromosome 18q microsatellite alterations in stage II colonic carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2010; 16: 6026-34.
68. Kang GH. Four molecular subtypes of colorectal cancer and their precursor lesions. *Arch Pathol Lab Med*. 2011, 135(6):698-703.
69. Axel Walther, Elaine Johnstone, Charles Swanton, Rachel Midgley, Ian Tomlinson & David Kerr. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer* 9, 489-499 (July 2009).
70. Tannaz Armaghany, Jon D. Wilson, Quyen Chu, Glenn Mills. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res* 5:19–27.(2012).
71. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature*.1998;15; 395(6703): 645-648.
72. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4(7): 517-529.
73. Petersen OH, Petersen CC, Kasai H. Calcium and hormone action. *Annu Rev Physiol*.1994; 56: 297-319.
74. Bernd Nilius, Grzegorz Owsianik. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology*, 2011, Volume 12, Number 3, Page 1.
75. Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K, Birnbaumer L. Modulation of Ca<sup>2+</sup> entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca<sup>2+</sup> entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 21; 96(26): 14955-14960.
76. C Montell, GM Rubin. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 1989; 2(4):1313-1323.

77. Joost G. J. Hoenderop, René J. M. Bindels. Calcitropic and Magnesiotropic TRP Channels. *Physiology* Published 11 February 2008 Vol. 23 no. 1, 32-40 DOI: 10.1152/physiol.00039.2007.
78. C Montell, L Birnbaumer, V Flockerzi. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*. 2002; 108(5):595-598.
79. W. Liedtke., C.K., Functionality of the TRPV subfamily of TRP ion channels: add mechano-TRP and osmo-TRP to the lexicon! Review. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005. 62 (2005): p. 2985-3001.
80. Maarten Gees, B.C., and Bernd Nilius,, The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. 2: p. a003962.
81. Marc Freichel, Julia Almering and Volodymyr Tsvilovskyy. The role of TRP proteins in mast cells. *Front. Immunol.*, 12 June 2012 | <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00150>.
82. M. Bödding, V. Flockerzi, *J. Biol. Chem.* 279 (35) (2004) 36546.
83. B. Hille, Sinaur, 2001 (3rd edition).
84. Hoenderop JG, Vennekens R, Muller D, Prenen J, Droogmans G, Bindels RJ & Nilius B Function and expression of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol* 537, 747–761 (2001).
85. den Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B & Bindels RJ (2003). The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium* 33, 497–507.
86. Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B & Bindels RJ. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 22, 2003; 776–785.
87. Nijenhuis T, Hoenderop JG, van der Kemp AW, Bindels RJ. Localization and regulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV6 in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2731-2740.
88. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2005; 371:295–306.

89. Joost G. J. Hoenderop, Bernd Nilius, René J. M. Bindels. Calcium Absorption Across Epithelia. DOI: 10.1152/physrev.00003.2004 Published 1 January 2005.
90. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
91. Schonherr R. Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *The Journal of membrane biology* 2005; 205: 175-184.
92. Prevarskaya N, Flourakis M, Bidaux G, Thebault S, Skryma R. Differential role of TRP channels in prostate cancer. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35.Pt 1: 133-5.
93. K.Kunzelmann, J. *Membr. Biol.* 205 (3) (2005) 159.
94. R. Schönherr, J. *Membr. Biol.* 205 (3) (2005) 175.
95. L.A. Pardo, C. Contreras-Jurado, M. Zientkowska, F. Alves, W. Stühmer, J. *Membr. Biol.* 205 (3) (2005) 115.
96. M. Conti, *J. Exp. Ther. Oncol.* 4 (2) (2004) 161.
97. C. Weber, F. Mello deQueiroz, B.R. Downie, A. Suckow, W. Stühmer, L.A. Pardo, *J. Biol. Chem.* 281 (19) (2006) 13030.
98. S. Patt, K. Preussat, C. Beetz, R. Kraft, M. Schrey, R. Kalff, K. Schonherr, S.H. Heinemann, *Neurosci. Lett.* 368 (3) (2004) 249.
99. Latour, D.F. Louw, A.M. Beedle, J. Hamid, G.R. Sutherland, G.W. Zamponi, *Glia* 48 (2) (2004) 112.
100. M. Bödding, *Cell Calcium* 30 (2) (2001) 141.
101. Lang F, Hoffmann EK. 2012 Role of ion transport in control of apoptotic cell death. *Compr. Physiol.* 2m 2037-2061.
102. Turner KL, Sontheimer H. 2014 Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> channels and their role in primary brain tumour biology. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20130095. (doi:10.1098/rstb.2013.0095).
103. Becchetti A. 2011 Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301, C255–C265. (doi:10.1152/ajpcell.00047.2011).

104. Djamgoz MB, Onkal R. Persistent current blockers of voltage-gated sodium channels: a clinical opportunity for controlling metastatic disease. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.*, 2013; 8, 66–84.
105. Fiorio Pla A, Munaron L. Functional properties of ion channels and transporters in tumour vascularization. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2014; 369,20130103. (doi:10.1098/rstb.2013.0103).
106. Panyi G, Beeton C, Felipe A. Ion channels and anti-cancer immunity. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2014; 369, 20130106. (doi:10.1098/ rstb.2013.0106).
107. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G ve Erlich H (). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986; 51 Pt 1: 263-273.
108. Schochetman G, Ou CY ve Jones WK. Polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 1988; 158: 1154-1157.
109. Sambrook J ve DW. R. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor labrotory. New York, 1989.
110. Sambrook J, Fritsch EF ve Maniatis T. *Moleculer cloning; a laboratory manual 3 rd*, Sambrook, J ve ark. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New york, 2001; 150-172.
111. Eberhard P. *Genetik Atlası*. Lüleci G., SM, Alper Ö. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2000; 53- 56.
112. William SK ve Michael RC. *Concepts of Genetics*. Öner, C. Palme Yayıncılık, Ankara, 2002; 744-745.
113. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000b; 1(1): 11-21.
114. Zhao ZG., Wang DQ., Hu DF., Li YS., Liu SH. Decreased FOXF1 promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis, invasion, and stemness and is associated with poor clinical outcome. *Onco Targets Ther*. 2016 Mar 23;9:1743-52. doi: 10.2147/OTT.S95002.
115. Jonathan Landy, Emma Ronde, Nick English, Sue K Clark, Ailsa L Hart, Stella C Knight, Paul J Ciclitira, Hafid Omar Al-Hassi. Tight junctions in

- inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* Mar 21, 2016; 22(11): 3117-3126
116. Xichao Dai, Xizhi Zhang, Buhai Wang, Chaomin Wang, Jingting Jiang, Changping Wu. Association Between Polymorphism rs678653 in Human Cyclin D1 Gene (CCND1) and Susceptibility to Cancer: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit* 2016; 22:863-874.DOI: 10.12659/MSM.895237.
117. Christof Stoerger and Veit Flockerzi. The transient receptor potential cation channel subfamily V member 6 (TRPV6): Genetics, biochemical properties, and functions of exceptional calcium channel proteins. *Biochem. Cell Biol.* 92: 441–448 (2014) dx.doi.org/10.1139/bcb-2014-0063
118. Maylis Raphaëla, V'yacheslav Lehen'kyia, Matthieu Vandenberghe, Benjamin Becka, Sergiy Khalimonchyka, Fabien Vanden Abeelea, Leonardo Farsettia, Emmanuelle Germaina, Alexandre Bokhobzaa, Adriana Mihalacheb, Pierre Gossetb, Christoph Romaninc, Philippe Clézardind, Roman Skrymaa, and Natalia Prevarskayaa. TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orail-mediated mechanism and controls cancer cell survival. *PNAS* | Published online August 29, 2014).
119. Teng Wang, Zhen Chen, Yifei Zhu, Qiongxi Pan, Yanjun Liu, Xiaowei Qi, Linfang Jin, Jian Jin, Xin Ma, Dong Hua. Inhibition of Transient Receptor Potential Channel 5 Reverses 5-Fluorouracil Resistance in Human Colorectal Cancer Cells. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 290, No. 1, pp. 448–456, 2015
120. Fixemer, T., Wissenbach, U., Flockerzi, V., and Bonkhoff, H. (2003) Expression of the Ca<sup>2+</sup>-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* 22, 7858–7861
121. Peleg S, Sellin JH, Wang Y, Freeman MR, Umar S. Suppression of aberrant transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010 Sep;299(3):G593-601. doi: 10.1152/ajpgi.00193.2010. Epub 2010 May 27.

122. Bolanz KA, Kovacs GG, Landowski CP, Hediger MA (2009) Tamoxifen inhibits TRPV6 activity via estrogen receptor-independent pathways in TRPV6-expressing MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7:2000–2010
123. Chow J, Norng M, Zhang J, Chai J (2007) TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells – Mechanisms behind a possible new “hot” cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* 1773:565–576
124. Anke L, Lameris, Pasi I, Nevalainen, Daphne Reijnen, Ellen Simons, Jelle Eygensteyn, X Leo Monnens, René J. M. Bindels, and Joost G. J. Hoenderop. Segmental transport of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> along the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 308: G206–G216, 2015. First published December 4, 2014; doi:10.1152/ajpgi.00093.2014..
125. Christof Stoerger and Veit Flockerzi. The transient receptor potential cation channel subfamily V member 6 (TRPV6): Genetics, biochemical properties, and functions of exceptional calcium channel proteins. *Biochem. Cell Biol.* 92: 441–448 (2014) dx.doi.org/10.1139/bcb-2014-0063
126. Woudenberg-Vrenken, T.E., Lameris, A.L., Weissgerber, P., Olausson, J., Flockerzi, V., Bindels, R.J., et al. 2012. Functional TRPV6 channels are crucial for transepithelial Ca<sup>2+</sup> absorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303(7): G879–G885. doi:10.1152/ajpgi.00089.2012. PMID:22878123.
127. Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R., and Prevarskaya, N. () TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca<sup>2+</sup>/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*, 2007; 26, 7380–7385
128. Jiang, H. N., Zeng, B., Zhang, Y., Daskoulidou, N., Fan, H., Qu, J. M., and Xu, S. Z. () Involvement of TRPC channels in lung cancer cell differentiation and the correlation analysis in human non-small cell lung cancer. *PLoS One*, 2013; 8, e67637
129. Fiorio Pla, A., Avanzato, D., Munaron, L., and Ambudkar, I. S. () Ion channels and transporters in cancer. 6. Vascularizing the tumor: TRP channels as molecular targets. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2012; 302, C9–C15
130. Vincent AT, Derome N, Boyle B, Culley AI, Charette SJ. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your

- Money. *J Microbiol Methods*. 2016 Mar 16. pii: S0167-7012(16)30031-8. doi: 10.1016/j.mimet.2016.02.016.
131. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772: 937–46.
  132. Peng JB, Zhuang L, Berger UV, et al. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 729–34.
  133. Peng JB, Chen XZ, Berger UV, et al. Human calcium transport protein CaT1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 326–32.
  134. Domotor A, Peidl Z, Vincze A, et al. Immunohistochemical distribution of vanilloid receptor, calcitonin-gene related peptide and substance P in gastrointestinal mucosa of patients with different gastrointestinal disorders. *Inflammopharmacology* 2005; 13: 161–77.
  135. Tsavaler L, Shapero MH, Morkowski S, et al. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential.
  136. van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, van Leeuwen JP, Bindels RJ. Regulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2003; 285:G78–G85
  137. Irnaten M, Blanchard-Gutton N, Praetorius J, Harvey BJ (2009) Rapid effects of 17beta-estradiol on TRPV5 epithelial Ca<sup>2+</sup> channels in rat renal cells. *Steroids* 74: 642–649 92. Vasil'eva IO, Neguliaev IuA, Marakhova II, Semenova SB. TRPV5 and TRPV6 calcium channels in human T cells. *Tsitologiya*, 2008; 50:953–957
  138. Semenova SB, Vassilieva IO, Fomina AF, Runov AL, Negulyaev YA. Endogenous expression of TRPV5 and TRPV6 calcium channels in human leukemia K562 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2009; 296:1098–1104
  139. Schindl R, Kahr H, Graz I, Groschner K, Romanin C. Store depletion-activated CaT1 currents in rat basophilic leukemia mast cells are inhibited by 2-aminoethoxydiphenyl borate. Evidence for a regulatory component that controls

activation of both CaT1 and CRAC (Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel) channels. *J Biol Chem*, 2002; 277: 26950–26958.

140. Renkema KY, Lee K, Topala CN, Goossens M, Houillier P, Bindels RJ, Hoenderop JG. TRPV5 gene polymorphisms in renal hypercalciuria. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Jun;24(6):1919-24. doi: 10.1093/ndt/gfn735.



**HAM VERİLER**

## FORMLAR

### BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

Çalışmanın Adı: “**KOLOREKTAL KANSER OLGULARINDA TRPV5, TRPV6 GENETİK VARYASYONLARININ İNCELENMESİ**”

- Çalışmaya kolorektal kanseri tanısı konulmuş 33 hasta ve 37 sağlıklı birey katılacaktır.
- Gönüllüden 10 cc EDTA’lı kan örneği alınacaktır.
- Alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılacaktır.
- Elde edilen DNA örneklerinde hastalığınızın oluşmasında rol oynayabileceği düşünülen TRPV5 ve TRPV6 gen polimorfizmlerinin incelenmesi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) teknikleri kullanılacaktır. Polimorfizm çalışmaları, direkt hastalık sonucunu belirtmemekte olup, kişiye söz konusu hastalığa yatkınlıkla ilişkili genetik yapıya sahip olup olmadığını göstermektedir.
- Elde edilen DNA bu çalışma dışında başka bir işlem için kullanılmayacaktır.
- Diğer bir çalışmada gönüllü DNA’sının kullanılması gerektiğinde kendisinden izin alınacaktır.
- Gönüllünün uygulama sırasında herhangi bir rahatsızlıkla ve riskle karşılaşması söz konusu değildir.
- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırmacı ve destekleyiciye aittir. Gönüllü arzusu üzerine mali ve hukuki yükümlülük olmaksızın çalışmadan ayrılabilir.
- Kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır.
- Bu işlemler için sizden hiçbir ücret talep edilmeyecektir.
- Bu çalışma için size herhangi bir ücret ödenmeyecektir.
- Çalışmaya katılmak zorunluluğunuz bulunmamaktadır.
- Gönüllünün çalışmaya katılmayı reddetmesi onun gelecekteki takip ve tedavisi üzerine olumsuz etkisi bulunmayacaktır.
- Bu çalışmada gönüllünün hiçbir hukuki ve mali sorumluluğu bulunmayıp tüm sorumluluk araştırmacı ve destekleyiciye aittir.
- Gönüllünün çalışmaya katılım süreci sadece doku örneğinin alınması ile

sınırlıdır.

- Çalışma kabul kriterlerin'e ve özelliklerine uyum sağlamadığınız takdirde çalışmadan çıkarılabileceğiniz durumlar oluşabilir. Bu nedenle çalışmadan araştırmacının isteği ile çıkarılabilirsiniz.
- Çalışma sonunda elde edilecek verilerle uluslararası çapta yayınlanabilecek, hastalığınıza açıklık getirecek bilgiler elde edilebilmesi mümkündür. Bu şekilde çalışma sonucunda ulaşılan önemli bir bilgi varsa tarafınıza bildirilecektir.
- Sayın Uzm.Dr. Metin Keskin tarafından İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim.
- Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.
- Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.
- Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.
- İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).
- Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Uzm.Dr. Metin Keskin'i arayabileceğimi biliyorum.
- Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer

katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

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



## GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

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

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı-soyadı, İmzası

Uzm.Dr Metin Keskin

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı, İmzası, Görevi

## HASTA TAKİP FORMU

**Protokol:**

**Tarih:**

**Hasta no:**

### KOLOREKTAL TÜMÖRÜ ARAŞTIRMA FORMU

|              |               |            |
|--------------|---------------|------------|
| Form No:     | Protokol No : | Tarih :    |
| Adı Soyadı : | Yaş :         | Cinsiyet : |
| Boy / Kilo : | Meslek :      | Kan Grubu: |
| Memleket:    | Yaşadığı yer: |            |

**Öyküsü:**

**Yakınmanın başlangıç zamanı:**

**Öz geçmişi:**

Doğum sayısı:

Sigara tüketimi (süre, miktar)/alkol tüketimi

İlaç kullanımı, Steroid kullanımı:

Transfüzyon varlığı:

Hastalık durumu:

İskemik kalp hastalığı

Diabet:

Malign hastalık

Diğer

HRT alıyormu? Alıyorsa süresi

Kemoterapi/radyoterapi alımı:

**Beslenme durumu:** Meyve tüketimi az orta bol

Sebze tüketimi az orta bol

Yağ tüketimi zeytinyağı bitkisel yağ(ayçiçek yağı vs.)

hayvansal yağ

**Öz geçmişinde meme ile ilgili yakınma / hastalık:**

Kist

Diğer

**Soy geçmişi:**

Kolon Ca

Diğer malign hastalıklar

Diabetes Mellitus

Kronik Karaciğer Hastalığı

**Ameliyat öncesi tanı :**

**Yapılan Ameliyat :**



**Tanı konulmasından sonra geçen süre**

**Yapılan Biyokimyasal analiz sonuçlarına ait verileri:**

**Tümörün diferansiasyonu ( İyi / orta / kötü )**

**Tümörün histopatolojik incelemesi sonrası ek veriler:**

**ETİK KURUL KARARI**

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

**Sayı : 1605** **Tarih : 23.10.2014**


**Konu : Prof.Dr.Ş.Ümit ZEYBEK**

**Sayın Prof.Dr.Ş.Ümit ZEYBEK  
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı**

**İlgi :DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalının 22/09/2014 gün ve 420 sayılı yazısı**

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Servet TUNOĞLU'nun yürüteceği 2014/1470 dosya numaralı "Kolorektal Kanseri Olgularında Trpv5 , Trpv6 Genetik Varyasyonlarının İncelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 26/09/2014 tarih ve 16 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

  
**Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN**  
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkanı

**Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu**

## İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI "Kolorektal Kanser Olgularında Trpv5 , Trpv6 Genetik Varyasyonlarının İncelenmesi"

| DEĞERLENDİRİLEN BELGELER       | Belge Adı   | Tarihi                   | Versiyon Numarası | Dili                            |                                    |                                    |
|--------------------------------|---|--------------------------|-------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|                                |   | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ      | 22/09/2014        |                                 | Türkçe <input type="checkbox"/>    | İngilizce <input type="checkbox"/> |
|                                | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU   | ■                        |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> | Diğer <input type="checkbox"/>     |
|                                | OLGU RAPOR FORMU  | ■                        |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> | Diğer <input type="checkbox"/>     |
|                                | ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ   | <input type="checkbox"/> |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> | Diğer <input type="checkbox"/>     |
| DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER | Belge Adı   | <input type="checkbox"/> | Açıklama          |                                 |                                    |                                    |
|                                | TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ  | <input type="checkbox"/> |                   |                                 |                                    |                                    |
|                                | SİGORTA   | <input type="checkbox"/> |                   |                                 |                                    |                                    |
|                                | ARAŞTIRMA BÜTÇESİ   | ■                        |                   |                                 |                                    |                                    |
|                                | BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU   | <input type="checkbox"/> |                   |                                 |                                    |                                    |
|                                | HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ  | <input type="checkbox"/> |                   |                                 |                                    |                                    |
|                                | İLAN  | <input type="checkbox"/> |                   |                                 |                                    |                                    |
|                                | YILLIK BİLDİRİM   | <input type="checkbox"/> |                   |                                 |                                    |                                    |
|                                | SONUÇ RAPORU  | <input type="checkbox"/> |                   |                                 |                                    |                                    |
|                                | GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ   | <input type="checkbox"/> |                   |                                 |                                    |                                    |
| KARAR BELGELERİ                | Karar No:16   | Tarih: 26/09/2014        |                   |                                 |                                    |                                    |
|                                | İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı görevli Prof.Dr.Ş.Ümit ZEYBEK'in sorumluluğunda ve Servet TUNOĞLU'nun yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. |                          |                   |                                 |                                    |                                    |

## İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

| ÇALIŞMA ESASI                   | 19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik |   |                            |                            |                            |            |      |                            |
|---------------------------------|--|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------|------|----------------------------|
| BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: | Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN  |   |                            |                            |                            |            |      |                            |
| Unvanı/Adı/Soyadı               | Uzmanlık Alanı   | Kurumu  | Cinsiyet                   |                            | Araştırma ile ilişki *     | Katılım ** | İmza |                            |
| Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN       | Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji  | İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)           | E ■                        | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H ■        | E ■  | H <input type="checkbox"/> |
| Prof. Dr. Berrin UMMAN          | Kardiyoloji  | İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı) | E <input type="checkbox"/> | K ■                        | E <input type="checkbox"/> | H ■        | E ■  | H <input type="checkbox"/> |
| Prof. Dr. Ahmet GÜL             | Romatoloji   | İstanbul Tıp Fakültesi                                | E ■                        | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H ■        | E ■  | H <input type="checkbox"/> |
| Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN         | Nöroloji   | İstanbul Tıp Fakültesi                                | E ■                        | K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> | H ■        | E ■  | H <input type="checkbox"/> |
| Dr. Sevdâ ÖZEL                  | Biyoistatistik   | İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik            | E <input type="checkbox"/> | K ■                        | E <input type="checkbox"/> | H ■        | E ■  | H <input type="checkbox"/> |

\* :Araştırma ile ilişki  
 \*\* :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığının iznine tabi değildir.

## İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

|                       |                  |  |
|-----------------------|------------------|--|
| ETİK KURULU BİLGİLERİ | ETİK KURULUN ADI | İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ<br>KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU                   |
|                       | AÇIK ADRESİ:     | İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET<br>KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL |
|                       | TELEFON          | 0 (212) 414 21 53  |
|                       | FAKS             | 0 (212) 414 21 53  |
|                       | E-POSTA          | itfetikkurul@istanbul.edu.tr.  |

|                               |   |   |   |   |  |
|-------------------------------|---|---|---|---|--|
| BAŞVURU BİLGİLERİ             | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                               | "Kolorektal Kanseri Olgularında Trpv5 , Trpv6 Genetik Varyasyonlarının İncelenmesi" |   |   |  |
|                               | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU                             | ---   |   |   |  |
|                               | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI   | Prof.Dr.Ş.Ümit ZEYBEK   |   |   |  |
|                               | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI   | Moleküler Tıp   |   |   |  |
|                               | KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ | İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı  |   |   |  |
|                               | DESTEKLEYİCİ  | İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi                                  |   |   |  |
|                               | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ                    | ---   |   |   |  |
|                               | ARAŞTIRMANIN FAZI                                   | FAZ 1   | <input type="checkbox"/>                      |   |  |
|                               |   | FAZ 2   | <input type="checkbox"/>                      |   |  |
|                               |   | FAZ 3   | <input type="checkbox"/>                      |   |  |
| FAZ 4                         |   | <input type="checkbox"/>  |   |   |  |
| ARAŞTIRMANIN TÜRÜ             | Yeni Bir Endikasyon                                 | <input type="checkbox"/>  |   |   |  |
|                               | Yüksek Doz Araştırması                              | <input type="checkbox"/>  |   |   |  |
|                               | Diğer ise belirtiniz :                              |   |   |   |  |
| ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER | TEK MERKEZ<br><input checked="" type="checkbox"/>   | ÇOK MERKEZLİ<br><input type="checkbox"/>  | ULUSAL<br><input checked="" type="checkbox"/> | ULUSLAR ARASI<br><input type="checkbox"/> |  |

**PATENT HAKKI İZİNİ**



**TELİF HAKKI İZİNİ**