



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

KOLOREKTAL KANSERLERDE SİRKÜLE LNCRNA'LARIN
PROGNOZA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

SERAP ARSLAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. OĞUZ ÇİLİNGİR

İkinci DANIŞMAN
PROF. DR. MURAT DİNÇER

Eskişehir
2021



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

**KOLOREKTAL KANSERLERDE SİRKÜLE LNCRNA'LARIN
PROGNOZA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

SERAP ARSLAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. OĞUZ ÇİLİNGİR

İkinci DANIŞMAN

PROF. DR. MURAT DİNÇER

Eskişehir

2021

ÖZET

KOLOREKTAL KANSERLERDE SİRKÜLE LNCRNA'LARIN PROGNOZA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, ARHGAP5- AS1, LOC152578, SNHG16, ZNRFB3-IT1, CCAT1, CRNDE ve XLOC_000303 sirküle lncRNA genlerinin kolorektal kanserde non-invaziv bir biyobelirteç olarak kullanılma olasılıklarını tartışmaktır. Bir diğer amacı ise ileri evre olgularında aday sirküle lncRNA'lar ile KRAS, NRAS ve BRAF genlerindeki sık gözlenen somatik varyantlar arasındaki ilişkinin incelenmesidir.

Kapsam: Çalışmada 50 evre III/IV ve 15 evre I/II olmak üzere 65 KRK hastası ile kontrol grubunu oluşturan 31 bireyin plazma örneği incelenmiştir. Ayrıca ileri evre grubundaki 50 hastanın FFPE doku örneklerinde KRAS, NRAS ve BRAF somatik varyantları ve CEA ve CA 19-9 tümör belirteçleri incelenmiştir.

Yöntem: Total RNA izolasyonu ve cDNA eldesinden sonra, 7 aday sirküle lncRNA geninin (ARHGAP5-AS1, LOC152578, SNHG16, ZNRFB3-IT1, CCAT1, CRNDE ve XLOC_000303) ekspresyon analizi yapılmıştır. Referans gen olarak β -actin kullanılmıştır. Ayrıca ileri evre grubunda FFPE örneğinden DNA eldesi yapılarak Real-Time PCR yöntemi ile KRAS, NRAS ve BRAF somatik varyantları incelenmiştir.

Bulgular: Çalışmaya kolorektal kanser tanısıyla tedavi gören 65 hasta ve 31 kontrol dâhil edilmiştir. Hastaların % 61,53'ü kolon % 38,46'sı rektum kanseri tanısı almış ve olguların % 93,8'i adenokarsinom olarak tespit edilmiştir. Hastaların %6,15'i evre I, %16,92'si evre II, %9,23'ü evre III ve %67,69'u evre IV olarak tanı almıştır. Elde edilen verilerin analizi IBM SPSS 21 paket programı ile yapılmış olup, $p < 0,05$ olan durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

Hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, ZNRFB3-IT1($p=0,012$; AUC:0,660), CCAT1 ($p=0,007$; AUC:0,672), CRNDE ($p=0,002$; AUC:0,700), XLOC_000303 ($p=0,001$; AUC:0,706) sirküle lncRNA genleri arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. Evrelere göre ise sadece XLOC_000303'de anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,001$).

Ayrıca, XLOC_000303'ün metastaz oluşumuna karşı koruyucu bir faktör ($p=0,045$, HR:0,90, 1,111 kat) olduğu bulunmuştur.

İleri evre olgularda en sık KRAS somatik varyantları (%34) gözlenmiştir. KRAS geninde sık gözlenen somatik varyantlar ile CRNDE geni ($p=0,031$) arasında anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

ARHGAP5-AS1 geni ile CA 19-9 tümör belirtecinin tanı ($p=0,014$) ve prognozdeki ($p=0,036$) serum seviyeleri arasında anlamlı farklılık saptanmıştır.

Klinik parametreler değerlendirildiğinde, CRNDE ile tümör farklılaşması ($p=0,023$), primer tümör yerleşim yeri ($p=0,009$) ve tümör boyutu ($p=0,010$) arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. CCAT1 ($p=0,021$) ve SNHG16 ($p=0,023$) ile tümör boyutu arasında ve metastaz oluşumu ile XLOC_000303 ($p=0,016$) arasında ilişki olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Bulgularımız, ZNRF3-IT1,CCAT1, CRNDE ve XLOC_000303 circIncRNA genlerinin kolorektal kanser prognozunda potansiyel bir non invaziv biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda XLOC_000303 ekspresyon artışı metastaz oluşumuna karşı koruyucu bir faktör olabilir. Ayrıca bu veriler, sirküle lncRNA'ların KRAS somatik varyantları üzerine etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanı sıra verilerimizin CEA ve CA 19-9 ile aday sirküle lncRNA'lar arasında ilişki olabileceğini göstermesi açısından önemli olduğunu düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: KRK, sirküle lncRNA, Real-Time PCR, ARHGAP5-AS1, CCAT1, CRNDE, LOC152578, XLOC_000303, SNHG16 ZNRF3-IT1, CEA, CA 19-9, KRAS, NRAS ve BRAF

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFECT OF CIRCULATING LNCRNAs ON PROGNOSIS IN COLORECTAL CANCERS

Objective: The aim of this study is to discuss the possibilities of using the ARHGAP5-AS1, LOC152578, SNHG16, ZNRFB3-IT1, CCAT1, CRNDE, and XLOC_000303 circulating lncRNA genes as a non-invasive biomarker in colorectal cancer. Another aim is to examine the relationship between candidate circulating lncRNA and frequently observed somatic variants in KRAS, NRAS, and BRAF genes in advanced stage cases.

Content: In this study, plasma samples of 65 CRC patients (50 stages III / IV and 15 stages I / II) and plasma samples 31 individuals in the control group were examined. In addition, KRAS, NRAS, and BRAF somatic variants were investigated in FFPE tissue samples of 50 patients in the advanced stage group and CEA and CA 19-9 tumor markers in their serum were studied.

Methods: After total RNA isolation and cDNA were obtained, expression analysis was performed in terms of 7 candidate circulating lncRNA genes (ARHGAP5-AS1, LOC152578, SNHG16, ZNRFB3-IT1, CCAT1, CRNDE, and XLOC_000303). β -actin was used as the housekeeping gene. In addition, somatic variants of KRAS, NRAS, and BRAF were examined by Real-Time PCR method by obtaining DNA from FFPE tissue samples in the advanced stage group.

Results: Sixty-five patients treated with the diagnosis of colorectal cancer and thirty-one controls were included in this study. 61.53% of the patients were diagnosed with colon cancer, 38.46% with rectal cancer, and 93.8% of the patients were diagnosed as adenocarcinoma. Of the patients, 6.15% were diagnosed as stage I, 16.92% as stage II, 9.23% as stage III and 67.69% as stage IV. The analysis of the obtained data was made with the IBM SPSS 21 package program, and the cases with $p < 0.05$ were considered significant.

Comparing the patient and control groups, ZNRFB3-IT1 ($p=0.012$, AUC:0.660), CCAT1 ($p=0.007$, AUC:0.672), CRNDE ($p=0.002$, AUC:0.700), XLOC_000303 ($p=0.001$, AUC: 0.706) circulating lncRNA genes between were detected a statistically significant difference. According to the stages, a significant difference

was found only in XLOC_000303 lncRNA ($p = 0.001$). Moreover, XLOC_000303 was found to be a protective factor against metastasis formation ($p=0.045$, HR:0.90, 1.111 fold).

The most common KRAS somatic variants (34%) were observed in the advanced cases. A significant difference was found between the frequently observed somatic variants in the KRAS gene and the lncRNA CRNDE gene ($p = 0.031$) in this study.

A significant difference was found between the serum values of the CA 19-9 tumor marker of the lncRNA ARHGAP5-AS1 gene in diagnosis ($p= 0.014$) and prognosis ($p= 0.036$).

When clinical parameters were evaluated, there was a relationship between the CRNDE and tumor differentiation ($p=0.023$), primary tumor location ($p=0.009$) and tumor size ($p=0.010$). A correlation was found between the CCAT1 ($p=0.021$) and the SNHG16 ($p=0.023$) and tumor size and between metastasis formation and the XLOC_000303 ($p=0.016$).

Conclusions: Our findings suggest that ZNRF3-IT1, CCAT1, CRNDE, and XLOC_000303 circulating lncRNA genes can be used as a potential non-invasive biomarker in colorectal cancer prognosis. Also, increased expression of XLOC_000303 may be a protective factor against metastasis formation. In addition, these data suggest that circulating lncRNAs may act on KRAS somatic variants. Besides, we think that our data is important in terms of showing that there may be a relationship between CEA and CA 19-9 and candidate circulating lncRNAs.

Keywords: KRK, circulating lncRNA, Real-Time PCR, ARHGAP5-AS1, CCAT1, CRNDE, LOC152578, XLOC_000303, SNHG16, ZNRF3-IT1, CEA, CA 19-9, KRAS, NRAS, and BRAF

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	ii
SUMMARY.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLO DİZİNİ.....	x
ŞEKİL DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Kolon ve Rektum Anatomisi.....	3
2.2.Kolon Histolojisi.....	4
2.3.Epidemiyoloji.....	4
2.4.Etiyoloji.....	5
2.4.1.Yaş.....	5
2.4.2.Cinsiyet.....	6
2.4.3.Irk ve etnik köken.....	6
2.4.4.Kolonik adenomatöz polip öyküsü.....	7
2.4.5.Yaşam tarzı.....	7
2.4.6.Diğer faktörler.....	8
2.4.7.Kalıtsal faktörler.....	8
2.5.Histopatoloji.....	9
2.6.Kolorektal Kanserin Lokalizasyonu.....	11
2.7.Sporadik Kolorektal Kanserlerin Moleküler Patogenezi.....	12

2.7.1.Kromozomal instabilite yolağı (CIN).....	14
2.7.2.Mikrosatellit instabilitesi (MSI).....	17
2.7.3.CpG adası metilasyon fenotipi (CIMP).....	19
2.8.Kolorektal Kanselerde Tanı ve Evreleme.....	20
2.9.Kolorektal Kanserde CEA ve CA 19-9 Tümör Belirteçleri.....	23
2.10.KRK’de Long Non-coding RNA’ların Önemi.....	24
2.10.1.ARHGAP5- Antisense 1 (<i>ARHGAP5- AS1</i>)	29
2.10.2. <i>LOC152578 (LINC01618)</i>	29
2.10.3.Small nucleolar RNA host gene 16 (<i>SNHG16</i>)	29
2.10.4.ZNRF3 intronic transcript 1 (<i>ZNRF3-IT1</i>)	30
2.10.5.Kolon kanseri ilişkili transkript-1 (<i>CCAT1</i>)	31
2.10.6.Diferansiyel olarak eksprese edilen kolorektal neoplazi(<i>CRNDE</i>)	31
2.10.7. <i>XLOC_000303 (LINC01507)</i>	32
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	33
3.1.Plazma Eldesi.....	33
3.2.RNA izolasyonu.....	34
3.3.cDNA Sentezi.....	35
3.3.1.Total RNA örneklerinden genomik DNA'nın uzaklaştırılması.....	35
3.3.2.First Strand cDNA sentezi..	36
3.3.3.First Strand cDNA ürünlerinin kontrol reaksiyonları.....	37
3.4.Ekspresyon Analizi.....	39
3.5.FFPE Dokulardan <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> ve <i>BRAF</i> Somatik Varyant Analizi.....	41
3.5.1.FFPE dokudan DNA izolasyonu.....	41
3.5.2.FFPE Dokulardan <i>KRAS</i> ve <i>NRAS</i> Somatik Varyant Analizi	42

3.5.3.KRAS ve NRAS somatik varyant analizinde kullanılan testin analitik prensibi.....	44
3.5.4.FFPE dokulardan BRAF somatik varyant analizi.....	45
3.5.5.BRAF somatik varyant analizinde kullanılan testin analitik prensibi	47
3.6.Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	48
4.BULGULAR.....	50
4.1.İstatistiksel Analiz.....	50
4.2.KRK’li Hastalarda, Aday Genlerin Plazma Ekspresyon Seviyesi ve KRAS, NRAS ve BRAF Mutantlığı Arasındaki İlişki.....	53
4.3.KRK’li Hastalarda Aday circLncRNA Genlerindeki Ekspresyon SeviyesininDeğerlendirilmesi.....	55
4.4.Ekspresyon Seviyesinin ROC ve AUC Analizleri.....	58
4.5.KRK’li Hastaların CEA ve CA 19-9 Tümör Belirteçlerinin Serum Seviyesinin Değerlendirilmesi.....	62
5.TARTIŞMA.....	64
5.1.ARHGAP5-AS1 LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi.....	64
5.2.LOC152578 LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi.....	66
5.3.SNHG16 LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi.....	66
5.4.ZNRF3-IT1 LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi.....	68
5.5.CCAT1 LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi.....	69
5.6.CRNDE LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi.....	72
5.7.XLOC_000303 LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi.....	74
5.8.KRAS, NRAS ve BRAF Somatik Varyantlarının Aday Genler İle İlişkisi.....	76
5.9.KRK'de Aday Genlerin CEA ve CA 19-9 Tümör Belirteçleri ile İlişkisi.....	76

6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
--------------------------	----

KAYNAKLAR DİZİNİ.....	81
-----------------------	----



TABLO DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1.Kolon ve rektum tümörlerinin histolojik sınıflaması.....	10
Tablo 2.2.KRK’de TNM sınıflaması.....	22
Tablo 3.1.Total RNA örneklerinden genomik DNA’nın uzaklaştırılması.....	36
Tablo 3.2.First strand cDNA sentezi aşama 1 kurulum bileşenleri.....	36
Tablo 3.3.First strand cDNA sentezi aşama 2 kurulum bileşenleri.....	37
Tablo 3.4.First strand cDNA sentezi kontrol reaksiyonu kurulum bileşenleri.....	38
Tablo 3.5.PCR amplifikasyon ürünün kontrol edilmesi.....	39
Tablo 3.6.PCR amplifikasyon kontrol PCR kurulum şartları.....	39
Tablo 3.7.Kullanılan primer dizileri.....	40
Tablo 3.8.Real-Time PCR reaksiyon kurulum bileşenleri.....	41
Tablo 3.9.Real-Time PCR kurulum şartları.....	41
Tablo 3.10.KRAS ve NRAS geni RT-PCR reaksiyon kimyasal bileşenleri.....	43
Tablo 3.11.KRAS ve NRAS geni RT- PCR kurulumu.....	43
Tablo 3.12.KRAS ve NRAS somatik varyantların lokalizasyonları.....	44
Tablo 3.13.KRAS ve NRAS geni RT-PCR sonuçlarının analizi.....	45
Tablo 3.14.BRAF geni RT-PCR reaksiyon kimyasal bileşenleri.....	46
Tablo 3.15.BRAF geni RT-PCR kurulumu.....	46
Tablo 3.16.BRAF genindeki somatik varyantların lokalizasyonları.....	46
Tablo 3.17.BRAF geni RT-PCR sonuçlarının analizi.....	47
Tablo 4.1.Kolorektal kanserli hastalar ve kontrol grubunun klinik karakteristikleri..	51

Tablo 4.2.Olgu grubunda yer alan KRK hastalarının, primer tümör yerleşim yeri ile aday lncRNA'ların ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması.....	52
Tablo 4.3.Olgu grubunda yer alan KRK hastalarının, neo adjuvan tedavi durumları ile aday lncRNA'ların ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması	53
Tablo 4.4.KRAS, NRAS ve BRAF genlerinde sık gözlenen somatik varyantlar.....	54
Tablo 4.5.KRAS, NRAS ve BRAF somatik varyant varlığı ile ilgili circLncRNA'lar arasındaki ilişki.....	54
Tablo 4.6.KRK'li hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması.....	55
Tablo 4.7.KRK'li hasta grubunun evreler arasındaki ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması.....	57
Tablo 4.8.KRK'li hasta grubunun metastaz durumuna göre evreler arasındaki aday genlerin risk oluşturma olasılığı.....	58
Tablo 4.9.KRK hasta ve kontrol grubunda incelenen circLncRNA genlerinin ROC ve AUC değerleri.....	58
Tablo 4.10.CEA ve CA 19-9 tümör belirtecinin tanı ve prognozdaki serum seviyesi ile 7 aday genin ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki.....	63

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1.Kolon ve rektum anatomisi.....	3
Şekil 2.2.KRK’de tümörün yerleşim yerine göre dağılımı.....	12
Şekil 2.3.KRK progresyonu ile sıklıkla ilişkilendirilen genetik değişiklikler....	14
Şekil 2.4.Kanonik <i>Wnt/β-katenin</i> yolağı.....	16
Şekil 2.5.KRK evreleri.....	21
Şekil 2.6.Kolorektal kanserin CMS sınıflandırması.....	23
Şekil 2.7.LncRNA’ların sınıflandırılması.....	26
Şekil 2.8.LncRNA’ların biyogenezi ve fonksiyonu.....	27
Şekil 2.9.KRK’de lncRNA’ların düzenleyici mekanizmaları.....	28
Şekil 4.1.KRK hasta grubu ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyesi...56	
Şekil 4.2.İncelenen genlerin ROC analizleri.....	59
Şekil 4.3.İncelenen genlerin AUC analizleri.....	60
Şekil 4.4.Metastaz tanı durumuna göre sağ kalım analizi	61
Şekil 4.5.Toplam sağ kalım analizi.....	61
Şekil 4.6.KRK’li hastalarda progresyonsuz sağ kalım analizi.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Ct	: Döngü Eşiği
kDa	: Kilo Dalton
ml	: Mililitre
ng	: Nano gram
µl	: Mikrolitre
U/ µl	: Ünite/Mikrolitre

Kısaltmalar

AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
AKD	: Amerikan Kanser Derneği
APC	: Adenomatöz Polipoz Koli
ARHGAP5-AS1	: ARHGAP5- Antisense 1
BRAF	: v-raf fare sarkoma viral onkogen homolog B1
CA 19-9	: Serum Karbonhidrat Antijen
CCAT1	: Kolon Kanseri İlişkili Transkript 1
cDNA	: Komplementer DNA
CEA	: Karsinoma Embriyonik Antijen
CIMP	: CpG Adası Metilatör Fenotipi
CIN	: Kromozomal İnstabilite
circIncRNA	: Sirküler uzun kodlamayan RNA
CRCSC	: Uluslararası Kolorektal Kanser Alt Tip Belirleme Konsorsiyumu
CRNDE	: Diferansiyel Olarak İfade Edilen Kolorektal Neoplazi
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilendiamintetra asetik asit
FAM	: Floreskein Amidit (6-Karboksifluoreskein)

FAP	: Ailesel Adenomatöz Polipozis
GAPDH	: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
HPNKK	: Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser
KRAS	: Kirsten Rat Sarkoma virüs
KRK	: Kolorektal Kanser
LINC01507	: Uzun intergenik protein kodlamayan RNA 1507
LINC01618	: Uzun intergenik protein kodlamayan RNA 1618
lncRNA	: Uzun kodlamayan RNA
LOH	: Heterozigote kaybı
MAPK	: Mitojen ile Aktifleştirilen Protein Kinaz
miRNA	: Mikro RNA
MMR	: Yanlış eşleşme tamiri
MSI	: Mikrosatellit İnstabilitesi
ncRNA	: Kodlamayan RNA
PIK3CA	: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa
RT-PCR	: Real-Time PCR
SNHG16	: Küçük nükleolar RNA konak geni 16
TNM	: Tümör Nod Metastaz
UICC	: Uluslararası Kanserle Savaş Örgütü
VIC	: 2'-kloro-7'-fenil-1,4-dikloro-6-karboksifluoreskein
ZNRF3-IT1	: ZNRF3 intronik transkript

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK) en yaygın görülen kanser tiplerindendir. Aynı zamanda kanser nedeni ölümlerin başında yer almaktadır (Aykan vd., 2015; J. Shi vd., 2015). Global Kanser (GLOBOCAN) veri tabanına göre; dünya çapında tüm kanserli yeni olgularda %10 (1,9 milyon) insidans oranı ile en sık görülen 3. kanser tipidir. Tüm kanserden ölümlerde ise %9,4 (935.000) ölüm oranı ile 2. sıradadır (derived from GLOBOCAN, 2018). Erkeklerde görülme oranı kadınlardan daha fazladır. Gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre 3-4 kat daha yüksek insidans oranı göstermektedir (Abedini vd., 2019). KRK vakalarının %90'ı 50 yaş üzerindedir. Bu oran yaşla birlikte artış göstermekte olup 60-79 yaş aralığında yoğunlaşmaktadır (Edwards vd., 2010; Gültekin ve Boztaş, 2014). Hastaların yaklaşık %40'ı erken evrede %60'ı ileri evrede tanı almaktadır (Granados-Romero vd., 2017). İleri evrelerde tespit edilen hastaların %25'i tanı sırasında, %50'si ise takip sırasında gelişen metastazlar nedeniyle kaybedilmektedir (Kemeny, Niedzwiecki, Shurgot ve Oderman, 1989; Granados-Romero vd., 2017).

KRK, gelişimine çevresel ve genetik faktörlerin eşlik ettiği multifaktöriyel bir hastalıktır. Vakaların %60-65'i sporadik, %25'inde aile öyküsü, %5'inde ise genetik yatkınlık söz konusudur (Kuipers vd., 2015).

KRK gelişiminde etkili genetik faktörlerin moleküler mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik son yıllarda oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, miRNA ve lncRNA gibi sirküle lncRNA'ların karsinomlarda tümör oluşumu, invazyon ve metastazın ilerlemesinde rol oynadığını göstermiştir (Chandra Gupta ve Nandan Tripathi, 2017). Ayrıca çok sayıda kanıt, bazı sirküle lncRNA'ların insan vücut sıvısında kararlı bir şekilde var olabileceğini desteklemektedir. Tüm bu veriler ışığında, sirküle lncRNA'ların kanserin teşhisi ve prognozu için umut verici bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini göstermektedir (J. Li, Ni, Zhou ve Ye, 2018). Kolorektal kanser ile ilgili yapılan çalışmalarda, ekspresyon seviyeleri farklılık gösteren sirküle lncRNA'lar tanımlanmış ve tümör gelişiminde etkili olduklarına dair önemli bulgular elde edilmiştir (J. Shi vd., 2015). Bu değişken ekspresyon seviyeleri sirküle lncRNA'ların, hastalığın prognozunda ve sağ kalımında yeni bir biyobelirteç olarak kullanılma olasılığını ortaya çıkarmıştır (Abedini vd., 2019; Ferracin, Lupini, Mangolini ve Negrini, 2016).

Kolorektal kanserde hastalığın izleminde CEA ve CA 19-9 monoklonal antikorları yaygın olarak kullanılmaktadır. Mevcut kılavuz önerilerine göre KRK'lerin tüm evrelerinde, CEA ve CA 19-9 bireysel prognozda, hastalık tekrarının tespiti ve tedavi sırasında izleme açısından önemli tümör belirteçlerindendir (Chiorean vd., 2020). Yaptığımız çalışmada KRK'li olguların serum örneklerinde ilgili antikorların seviyeleri ve aday sirküle lncRNA'lar ile ilişkisi de prognostik açıdan değerlendirilmiştir.

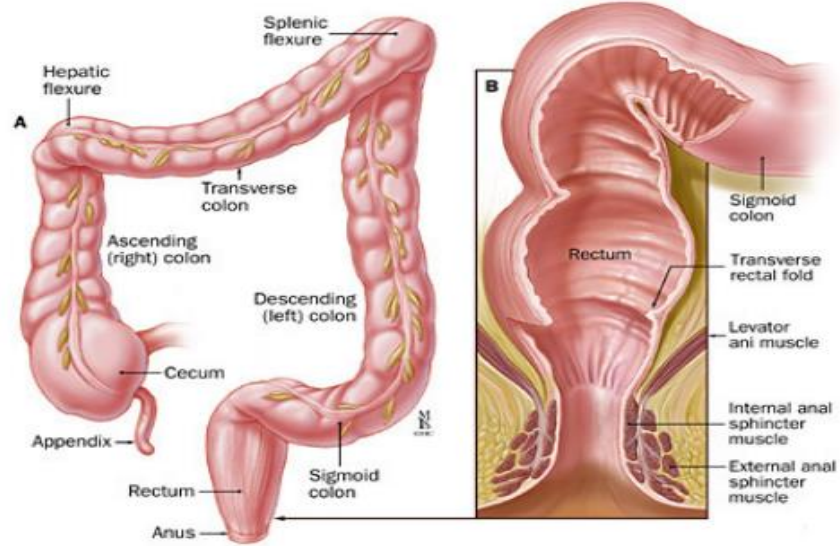
Mevcut tez çalışmasında, KRK'de etkili olabilecek sirküle lncRNA'ları belirlemek amacıyla çeşitli lncRNA in silico veri tabanları (LNCipedia version 5.2 ve NONCODE v5, LncRNADisease v2.0 gibi) ve literatürde yapılan ilgili çalışmalar taranmış ve aday sirküle lncRNA genleri saptanmıştır (Dong Lab, 2021; University, 2021). Bu sirküle lncRNA genleri; *ARHGAP5-AS1*, *LOC152578*, *SNHG16*, *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE* ve *XLOC_000303* olarak belirlenmiştir. Belirlenen aday sirküle lncRNA genlerinin KRK'de non-invaziv bir biyobelirteç olarak kullanılma olasılıkları ve bu sirküle lncRNA'ların hasta ve kontrol grubunu ayırt etme gücü tartışılmıştır. Bu kapsamda temelde 4 farklı soruya cevap aranmıştır. 1) KRK olguları ile sağlıklı kontroller arasında belirlenen aday sirküle lncRNA'lar arasında ekspresyon profili açısından anlamlı bir farklılık var mıdır? 2) KRK olgularında erken evreden ileri evreye geçişte aday sirküle lncRNA'ların rolü nedir? Erken evre ve ileri evre olguları arasında ekspresyon profili açısından anlamlı bir farklılık var mıdır? 3) KRK ileri evre olgularının tümör dokularında sık gözlenen *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* genlerindeki somatik varyantlar ile aday sirküle lncRNA ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki var mıdır? 4) KRK ileri evre olgularında yaygın olarak kullanılan non-invaziv tümör belirteçlerinden CEA ve CA 19-9 ile aday sirküle lncRNA ekspresyon seviyesi arasında bir ilişki var mıdır?

Çalışmada 50 ileri (evre III/IV) ve 15 erken evre (evre I/II) olmak üzere 65 KRK hastasının plazma örneği ile kontrol grubunu oluşturan 31 bireyin plazma örneği incelenmiştir. Her bir örnekten total RNA izolasyonu yapılarak, cDNA eldesinden sonra Real-Time PCR yöntemi kullanılarak belirlenen 7 aday circulating lncRNA'nın ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Olgu ve kontrol grubu bireylerinde, aday circulating lncRNA'lar ekspresyon seviyesi açısından analiz edilmiş olup, erken evreden ileri evreye geçişte non-invaziv bir biyobelirteç olarak kullanılma olasılıkları değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon ve Rektum Anatomisi

Gastrointestinal sistemin ileoçekal valv ile rektum arasındaki kalan kısmına kolon adı verilir. Kolon başlıca çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon bölümlerinden oluşur. Karaciğer, dalak, mide, ince bağırsaklar, böbrekler ve mesane gibi pek çok organ ile komşudur. Kolonun bölümlerinden çekum, kolonun en geniş ve en ince kas tabakasına sahip kısmıdır. Çıkan kolon, çekumdan başlayarak karaciğer sağ lobunun alt yüzeyine kadar uzanır. Transvers kolon, kolonun en uzun kısmıdır. İnen kolon ise kolonun en dar lümen ve kalın kas tabasına sahip kısmıdır. Kolonun son kısmı olan sigmoid kolon, inen kolonun pelvise doğru kıvrılarak rektumda sonlanması ile oluşan ve peritonla kaplı kolonun en dar bölümüdür. Kolonun obstrüksiyona en az yatkın bölgesi çekum, en yatkın bölgesi ise sigmoid kolon segmentidir. Kalın bağırsağın son kısmı olan rektum, anüs ile sonlanır. Erkeklerde; prostat ve mesane, kadınlarda ise uterus ve vagina'nın arkasında yer alır (Brunicardi ve Schwartz, 2005). Kolon ve rektum anatomisi şekil 2.1'de gösterilmektedir (Levine ve Haggitt, 1989).



Şekil 2.1 Kolon ve rektum anatomisi. A) Kolon anatomik olarak 4 bölümden oluşur. 1) Çıkan kolon (Sağ kolon) 2) Transvers kolon 3) İnen kolon (Sol kolon) 4) Sigmoid kolon B) Rektum ise transverse rektal kıvrım, levator ani kası, iç anal sfinkter kası ve dış anal sfinkter kasından oluşmaktadır (Levine ve Haggitt, 1989).

2.2. Kolon Histolojisi

Kolon histolojik olarak mukoza, submukoza, muskularis propria ve seroza tabakalarından oluşur. Mukoza tabakası çok sayıda goblet hücresi ve az sayıda entroendokrin hücre içerir. Submukoza tabakası damar yapıları açısından zengin bir tabakadır. Seroza tabakası ise kolonun dış yüzeyini oluşturur. Kolonun çekum, transvers kolon ve sigmoid kolon kısmını tamamen örter (Levine ve Haggitt, 1989).

2.3. Epidemiyoloji

Kolorektal kanser (KRK) en yaygın görülen kanser tiplerindendir. Kanser nedenli ölümlerin başında yer almaktadır (Aykan vd., 2015; J. Shi vd., 2015). Global Kanser (GLOBOCAN) veri tabanına göre; dünya çapında tüm kanserli yeni olgularda %10 (1,9 milyon) insidans oranı ile en sık görülen 3. kanser tipidir. Tüm kanserden ölümlerde ise %9,4 (935.000) ölüm oranı ile 2. sıradadır (derived from GLOBOCAN, 2018) (Şekil.2.2). Her yıl yaklaşık 1 milyon kişinin yeni tanı aldığı bildirilmiştir (Zhai vd., 2016). Gastrointestinal sistem içinde en yaygın malign kanser türüdür (Granados-Romero vd., 2017). Erkeklerde görülme oranı kadınlardan daha fazladır. Gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre 3-4 kat daha yüksek insidans oranı göstermektedir (Abedini vd., 2019). Gelişmekte olan ülkelerde gelecekte, dünya çapında KRK insidansının 2035 yılında 2-5 milyon yeni vakaya yükseleceği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte son on yıldaki verilere bakıldığında, tanı testleri, sigmoidoskopi ve kolonoskopi gibi tarama programlarındaki artış nedeniyle gelişmiş ülkelerdeki insidans ve mortalite oranları azalma eğilimi göstermektedir. Buna karşılık, 50 yaşın altında KRK ile başvuran hastalarda, özellikle rektal kanser ve sol taraflı kolon kanserinde endişe verici bir artış gözlenmiştir (Dekker, Tanis, Vleugels, Kasi ve Wallace, 2019). Kolon kanseri için, Güney Avrupa, Avustralya/Yeni Zelanda Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika, rektal kanser için ise Doğu Avrupa, Avustralya/Yeni Zelanda, Kuzey Avrupa ve Doğu Asya en yüksek insidansa sahip bölgelerdir. En düşük insidans oranları ise Afrika ve Güney-Orta Asya'da gözlenmektedir. Her 100.00 kişi başına en yüksek KRK insidansına sahip ülke, erkeklerde Macaristan (70,6) ve kadınlarda Norveç'tir (29,3). KRK mortalite oranı her 100.000 kişide erkeklerde (31,2) ve kadınlarda (14,8) ile en yüksek ülke Macaristan'dır (Rawla, Sunkara ve Barsouk, 2019a).

Hastaların yaklaşık %40'ı erken evrede, %60'ı ileri evrede tanı almaktadır (Bakanlığı, 2014; Granados-Romero vd., 2017). İleri evrelerde tespit edilen hastaların %25'i tanı sırasında, %50'si ise takip sırasında gelişen metastazlar nedeniyle kaybedilmektedir (AYDIN vd., 2015; Kemeny vd., 1989). Amerika Kanseri Derneğinin (AKD) 2020 tahminlerine göre 147,950 kişinin KRK yeni tanı alması ve 53,200 kişinin ölmesi beklenmektedir. Bu yeni tanılarının %70,7'sinin kolonu %29,29'nun rektal kanseri oluşturması ön görülmektedir (Siegel, Jakubowski, Fedewa, Davis ve Azad, 2020).

AKD'nin istatistiklerine göre, kolon kanseri 5 yıllık sağ kalım oranı %63 olarak bildirilmiştir. Bununla birlikte özellikle hastalığın evresine bağlı olarak bu oran bireylere göre değişkenlik gösterebilmektedir. Kanseri lokalize bir aşamada teşhis edilirse, hayatta kalma oranı %90 olarak bildirilmiş olup, bu olguların %39'u erken tanı alır. Kanseri çevredeki dokulara, organlara veya bölgesel lenf düğümlerine metastaz yaptığında, 5 yıllık sağ kalım oranı %71 iken uzak bölge metastazı varsa bu oran %14'e kadar düşmektedir (Provenzale vd., 2020; Siegel vd., 2020; Benson, Al B. vd., 2021).

Rektal kanserlerde 5 yıllık sağ kalım oranı %67 olarak belirtilmiştir. Kanseri lokalize bir aşamada teşhis edilirse, hayatta kalma oranı %89 olarak bildirilmektedir. Kanseri çevredeki dokulara, organlara veya bölgesel lenf düğümlerine yayılmışsa, 5 yıllık sağ kalım oranı %71, vücudun uzak bölgelerine yayılmışsa %15 olarak bildirilmiştir (Provenzale vd., 2020; Siegel vd., 2020; Benson, Al B. vd., 2021).

2.4. Etiyoloji

KRK, gelişimine çevresel ve genetik faktörlerin eşlik ettiği multifaktöriyel bir hastalıktır. Vakaların %60-65'i sporadik, %25'inde aile öyküsü, %5'inde ise genetik yatkınlık söz konusudur. Ailesel geçişli vakaların %1'ini familial adenomatöz polipozis (FAP) ve %4'ünü hereditör nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCK) oluşturmaktadır (Kuipers vd., 2015).

2.4.1. Yaş

Sporadik KRK insidansında yaş en önemli risk faktörüdür. KRK vakalarının %90'ı 50 yaş üzerindedir. Bu oran yaşla birlikte artış göstermekte olup 60-79 yaş aralığında yoğunlaşmaktadır (Bakanlığı, 2014; Edwards vd., 2010; Gültekin ve Boztaş, 2014). Bu artış özellikle gelişmekte olan ülkelerde daha belirgindir. Daha

genç yaştaki bireylerde de hastalık ortaya çıkabilmektedir. Sporadik KKK riski 60-79 yaş arasındaki bireylerde 50 yaş altı bireylere göre elli kat daha fazladır (Thélin ve Sikka, 2015). Yaş risk faktörü olarak kadınlarda ve erkeklerde eşit derecede önemlidir. Rektal kanserli hastaların %75'i ile kolon kanserli hastaların %85'inin yaşı tanı anında 60 yaş ve üzeridir (Kuipers vd., 2015). Kolon kanserinde hastaların ortalama tanı alma yaşı erkeklerde 68 iken kadınlarda 72 olarak bildirilmiştir. Rektal kanserde ise tanı alma yaşının her iki cinsiyette ortalama 63 olduğu belirtilmektedir (Howlader vd., 2013).

Vakaların çoğunluğu 50 yaş üzeri olmasına rağmen, gelecekte tanı alan olguların %12'sinin ve ölümlerin %7'sinin 50 yaş altında olacağı tahmin edilmektedir. Literatür verilerine bakıldığında ortalama tanı yaşı giderek düşmektedir. Örneğin; Amerika'da 2000'li yılların başında ortalama tanı yaşı 72 iken 2015-2016 yıllarında ortalama tanı yaşı 66 olarak belirlenmiştir (Siegel vd., 2020).

2.4.2. Cinsiyet

Dünya çapında her iki cinsiyette görülme oranı 19,7/100.000 ve erkeklerde 23,6/100.000 kadınlarda ise 16,3/100.000'dür (Rawla, Sunkara, ve Barsouk, 2019b). Türkiye'de ise bu oranlar, erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla 17,1/100.000 ve 11,7/100.000 insidans oranı göstermektedir (S. Eser vd., 2010; S. Y. Eser, 2007). KKK insidansı erkeklerde kadınlara göre %25 daha yüksektir (Jemal, Siegel, Xu ve Ward, 2010).

KKK insidans ve mortalite oranları erkeklerde kadınlardan sırasıyla 1,4 (%30) ve 1,5 (%40) kat daha fazladır. Bu farklılığın sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte erkeklerde sigara kullanım oranının fazla olması ve cinsiyet hormonlarının etkileri gibi risk faktörlerine maruziyetten kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Murphy vd., 2011).

2.4.3. Irk ve etnik köken

AKD verilerine göre, KKK insidans ve mortalite oranlarının ırk ve etnik kökene göre farklılık gösterdiği ve bu oranların Hispanik olmayan siyahlarda ve Kızılderililer/Alaska Yerlilerinde en yüksek, Asyalı Amerikalılar/Pasifik Adalarında ise en düşük olduğu belirtilmiştir. Gelişmiş ülkelere giden göçmenlerin yaşam tarzı değişikliklerine bağlı olarak zamanla insidans oranları yaşadıkları bölge ve ülkenin

oranları ile aynı seviyeye ulaştığı belirtilmiştir. Bu durum KRK gelişiminde coğrafik ve etnik farklılıkların etkili olduğunu göstermektedir (Siegel vd., 2020).

2.4.4. Kolonik adenomatöz polip öyküsü

Sporadik KRK gelişiminde en önemli etkenlerden biri de kolon ve rektumda oluşan poliplerdir. Literatürdeki son verilere göre sporadik KRK'lerin %95'i adenomlardan gelişmektedir. Aile öyküsü pozitif olan vakalar KRK'lerin %10-20'sini oluşturmaktadır. Bu tür vakalarda en az bir ailesi üyesi tipik KRK'den etkilenmiştir. Özellikle 50 yaş üzeri kişilerde, birinci derece yakın aile bireylerinde tümör veya polip öyküsü olanlarda risk 2-3 kat daha fazladır. İki veya daha fazla akrabada KRK öyküsü varsa ve bu aile üyeleri 50 yaşın altında hastalıktan etkilendiğinde bu risk daha da artar (Butterworth, Higgins ve Pharoah, 2006).

Kolorektal karsinomlar genellikle displazik adenomatöz poliplerden köken alır. Poliplerin çoğunluğu sağ kolon yerleşimlidir. Adenomlar erkeklerde kadınlara göre daha sık gözlenir. Adenomlar sıklıkla <50 yaş hastalarda sol kolon yerleşimli iken, >65 yaş hastalarda sağ kolon yerleşimlidir. Adenomlar sapsız, sapsız ve yassı olmak üzere 3 makroskopik yapıya ayrılır ve yapısal olarak da tübüler (%75), tubulovillöz (%15) veya villöz (%10) şeklinde gruplandırılır (Fenoglio-Preiser vd., 1999; Kumar, Abbas, Fausto ve Aster, 2014). Adenomatöz poliplerin histolojik yapısı, büyüklüğü ve sayısına bağlı olarak KRK riskine etkisi farklılık göstermektedir. Özellikle villöz veya tubulovillöz histolojiye sahip, yüksek dereceli displazi ve birden fazla büyük adenomatöz polip (>1-2 cm) bulunduran bireylerde KRK riskinin arttığı bildirilmiştir (Schoenfeld vd., 2005). Çapı >2cm poliplerin maligniteye dönüşme oranı yaklaşık %50'dir (Levin vd., 2008).

2.4.5. Yaşam tarzı

Çevresel risk faktörlerin başında, kırmızı etten zengin beslenme, aşırı alkol tüketimi, sigara kullanımı ve vücut kitle indeksinin yüksek olması sonucu ortaya çıkan obezite, düşük kalsiyum alımı, çok düşük meyve-sebze ve tam tahıllı lif alımı gibi yaşam tarzı ve alışkanlıklar gelmektedir. Lifin kolon pH'sını değiştirdiği ve karsinogenez oluşumunu engelleme kabiliyeti olduğu düşünülmektedir. Batı tipi beslenme alışkanlıkları, yüksek yağ oranı içerir. Bunun sonucunda yağ hepatik kolesterolü ve safra asidi sentezini artırarak kolonda sterollerin artmasına neden olur. Bu steroller daha sonra ikincil safra asitlerine, kolesterol metabolitlerine ve

potansiyel olarak toksik metabolik bileşiklere dönüştürülür. Bu steroller ve safra asidi metabolitleri kolon mukozasına zarar vererek displaziye yol açabilecek proliferatif aktiviteyi artırır (Feldman, Friedman ve Brandt, 2020).

Bağırsak hareketliliğinde azalma, insülin direncinde artma, metabolik hızın daha düşük olması ve dolaşımdaki östrojenlerin artması gibi etkenler KKK riskinde rol oynayan mekanizmalar arasındadır. (Feldman vd., 2020).

Düzenli sigara ve aşırı alkol tüketimi KKK'de daha yüksek bir riskle ilişkilendirilmiştir. Hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalara göre hem tütün hem de alkolde bulunan kanserojen metabolitlerin, tümör büyümesini desteklediği yönünde veriler bulunmuştur (Pöschl ve Seitz, 2004). Sigara içimi KKK ölümlerinin %12'sinden sorumlu iken, alkol tüketimi erken başlangıçlı KKK ile özellikle de distal kolonda tümörler ile ilişkilendirilmiştir (Botteri, Iodice, Raimondi, Maisonneuve ve Lowenfels, 2008; Hagggar ve Boushey, 2009; Zisman, Nickolov, Brand, Gorchow ve Roy, 2006). Yapılan çalışmalarda aktif sigara içenlerde rektal kanser gelişme riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Hagggar ve Boushey, 2009).

2.4.6. Diğer faktörler

İnflamasyon kökenli hastalıklarda displazi gelişme olasılığı oldukça yüksektir. Bu displazilerin malign forma dönüşme eğilimleri olduğundan bu tip hastalık öyküsü olan bireylerde kanser riski söz konusudur. Ülseratif colit (%3,7) ve Chron (%2,5) gibi gastrointestinal sistem hastalığı ve tip 2 diyabeti olan bireylerde risk artmaktadır (Hagggar ve Boushey, 2009).

2.4.7. Kalıtsal faktörler

Kalıtsal polipozis sendromu taşıyan bireylerde KKK riski çok yüksektir. Bunlar arasında; FAP ve HPNKK gibi kalıtsal geçiş gösteren hastalıklar yer alır. Bu kalıtsal hastalıklar erken yaşta ve daha şiddetli ortaya çıkmalarıyla karakterizedirler. HPNKK'nın tüm KKK'lerin yaklaşık %1-6'sını oluşturduğu düşünülmektedir. Yaşam boyu KKK gelişme riski %70-80 kadar yüksektir. Bunun yanı sıra endometriyal kanser olmak üzere diğer kanser türlerinin gelişme riski de oldukça yüksektir. HPNKK'nın en belirgin özelliği yüzden fazla polip varlığı ve bu poliplerin genellikle sağ (proksimal) kolonda yerleşik olmasıdır. HPNKK'nın altında yatan moleküler mekanizma ise *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* ve *PMS2* gibi DNA yanlış eşleşme tamir genlerindeki (MMR) mutasyonlar sebebiyle Mikrosatellit kararsızlığı (MSI)

oluşumudur (Kuipers vd., 2015). FAP ve varyantları, tüm KRK vakalarının %1'inden daha azını oluşturur. FAP'ın temelindeki moleküler mekanizmayı, Wnt sinyal yolunun aktivitesini kontrol eden adenomatöz polipoz koli (APC) genindeki varyantlar oluşturur. FAP'lı olguların çoğunda genç yaşta çok fazla sayıda polip (kolorektal adenom) oluşumu ve ardından KRK gelişimi söz konusudur. KRK oluşumuna eşlik eden diğer kalıtsal sendromlar ise Gardner sendromu (yüksek riskli), Turcot sendromu (yüksek riskli) ve Peutz-Jeghers sendromudur (düşük-orta risk) (Feldman vd., 2020).

2.5. Histopatoloji

Bağırsak duvarı 3 tabakadan oluşur. Bunlar; mukoza, submukoza ve muskularis propria'dır. Kolon ve rektumdaki kanser genellikle mukozadaki epitel hücrelerinden kaynaklanır ve düzensiz hücreli bir polip (adenom) olarak başlar. Hücreler kontrolsüz çoğalma, damarlanma, invazyon ve migrasyon özelliklerini elde ettiklerinde artık çevre dokulara yayılmaya başlar ve böylece malignite gelişir (Fleming, Ravula, Tatishchev ve Wang, 2012).

Histopatolojik olarak KRK olgularının %90'ından fazlası, kolorektal mukozanın epitel hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinomlardır. Bunun yanında lenfoma, karsinoid ve sarkoma tümör türleri de kolonda karsinogeneze sebep olabilmektedir. Diğer nadir kolorektal karsinom türleri arasında nöroendokrin, skuamöz hücreli, adenoskuamöz, iğsi hücreli ve farklılaşmamış karsinomlar bulunur. Adenokarsinom, histolojik tümör derecelendirmesinin temeli olan glandüler oluşum ile karakterizedir. İyi diferansiye adenokarsinomda tümörün %95'inden fazlası glandüler oluşum gösterirken, orta derecede diferansiye adenokarsinomda tümörün %50-95'inde glandüler oluşum gözlenir. Kötü diferansiye adenokarsinomda glandüler oluşum oranı %50'den azdır. Adenokarsinomların %20'si "iyi diferansiye", %60'ı "orta diferansiye" ve %15-20'si "az diferansiye adenokarsinom" olarak sınıflandırılır. Kolorektal adenokarsinomların %70'i orta diferansiye (Grade II), %10'u iyi diferansiye (Grade I) ve %20'si de kötü diferansiye (Grade III) olarak tanı almaktadır (Fleming vd., 2012). Kolon ve rektum kanserinin Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre histolojik sınıflandırması tablo 2.1'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir (Odze, Cree ve Klimstra, 2019).

Tablo 2.1 Kolon ve rektum tümörlerinin histolojik sınıflaması Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) NOS: not otherwise specified; PP: pancreatic polypeptide; PYY: peptide YY (Odze, Cree ve Klimstra, 2019).

Benign epitel tümörler ve prekürsörler	Malignant epitelyal tümörler
Tırtıklı displazi, düşük dereceli	Adenokarsinoma NOS
Tırtıklı displazi, yüksek dereceli -Hiperplastik polip, mikrovessiküler tip -Hiperplastik polip, goblet hücre	-Adenoma-benzeri adenokarsinom -Mikropapiller adenokarsinom -Müsinöz adenokarsinom -Kötü bağlanan karsinom -Taşlı yüzük hücreli karsinom -Medüller adenokarsinom -Adenoküamöz karsinom -Karsinoma, farklılaşmamış, NOS -Sarkomatoid bileşenli karsinom
Adenomatöz polip, düşük dereceli displazi	
Adenomatöz polip, yüksek dereceli displazi -Tübüler adenoma, düşük dereceli -Tübüler adenoma, yüksek dereceli -Villöz adenoma, düşük dereceli -Villöz adenoma, yüksek dereceli -Tübülovillöz adenoma, düşük dereceli -Tübülovillöz adenoma, yüksek dereceli -Gelişmiş adenoma	Nöroendokrin tümör NOS -Nöroendokrin tümör, grade 1 -Nöroendokrin tümör, grade 2 -Nöroendokrin tümör, grade 3 -L hücre tümör -Glukagon-benzeri peptid- üreten tümör -PP/PYY- üreten tümör -Enterokromaffin hücre karsinoid -Serotonin üreten karsinoid
Glandüler intraepitelyal neoplazi, düşük dereceli	Nöroendokrin karsinoma NOS -Büyük hücreli nöroendokrin karsinom -Küçük hücreli nöroendokrin karsinom
Glandüler intraepitelyal neoplazi, yüksek dereceli	Karışık nöroendokrin-nöroendokrin olmayan neoplazma (MiNEN)

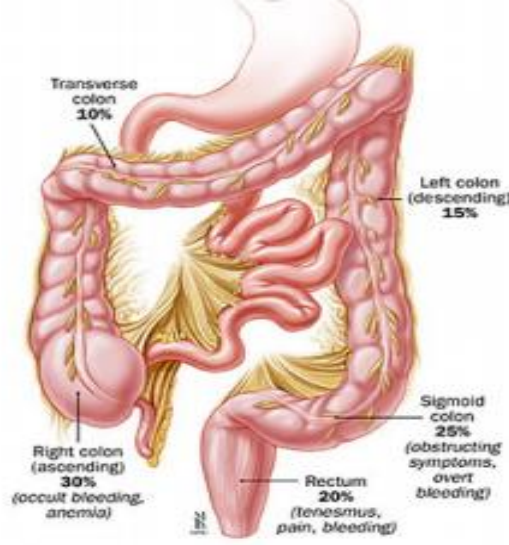
DSÖ'nün son sınıflandırmasında KRK'ların histolojik varyantları, müsinöz, taşlı yüzük hücreli, medüller, mikropapiller, tırtıklı kriproform komedo tip,

adenoskuamöz, iğsi hücreli ve farklılaşmamış olarak gruplandırılmıştır. Müsinöz karsinom, yaklaşık %10 oranı ile KRK'de en yaygın görülen ikinci karsinom tipidir. Bu tip genellikle sağ kolonda yerleşim gösterdiği ve MSI ve *BRAF*, *KRAS* ve *PIK3CA* genlerinde mutasyonların yüksek oranda gözlemlendiği bildirilmiştir. Taşlı yüzük hücreli karsinom KRK'in nadir histolojik alt tiplerinden biridir (%1,1). Genellikle daha genç hastalarda ve sağ kolonda sık gözlenmektedir. Müsin açısından zengin taş hücreli karsinomlar, vakaların %40'ına kadar MSI ile ilişkilidir ve müsin açısından fakir türlere göre daha iyi bir genel sağ kalım sergiler. Lenf nodları, peritoneal yüzey ve overlerde metastaz yapma eğilimi gösterir (Sagaert, Vanstapel ve Verbeek, 2018). Medüler tip nadir gözlenir, çoğunlukla kadınlarda, proksimal kolonda yerleşiktir. Olguların %60'ından fazlasında MSI ve yaklaşık %85'inde *BRAF* varyantları gözlenmektedir. Mikropapiller adenokarsinomda, lenf nodu metastaz riski yüksektir ve sıklıkla lenfatik ve vasküler invazyon gibi kötü prognostik faktörlerle birlikte görülür (Kim vd., 2020).

2.6. Kolorektal Kanserin Lokalizasyonu

KRK'lerin yaklaşık %45-60'ı rektosigmoidal kolonda, %15-30 çıkan kolon ve çekumda, %5-10 transvers kolonda ve %10-15 inen kolonda yerleşim gösterir (Şekil 2.2). Ancak son yıllarda gaitada gizli kan, kolonoskopi ve sigmoidoskopi gibi tanı ve tarama testlerinin yaygınlaşması ve toplumsal farkındalık sonucu karsinomların yerleşim yerinde kaymalar söz konusu özellikle de proksimale doğru kayma gözlenmektedir. KRK insidansının az olduğu bölge ve ülkelerde karsinomlar çekum ve çıkan kolonda daha fazla gelişirken, insidansın yüksek olduğu yerlerde rektosigmoid bölgede daha sık olduğu gözlenmektedir. Sağ kolon yerleşimli karsinomların büyük çoğunluğu kadınlarda gözlenirken yaşla birlikte artma eğilimi gösterir ve tanı anındaki ortalama yaş sol kolon yerleşimlilere göre daha yüksektir. Sağ kolon tümörleri daha çok yüksek dereceli histolojiye sahip olma ve ileri evrede olma eğilimi gösterebilirler ve tüm kolon karsinomlarının %33-63,4'ünü oluştururlar. KRK'nin birincil konumuna bağlı olarak metastatik yayılma farklılık gösterir. Sağ kolon kanseri daha sık peritona metastaz yaparken, sol kolon kanserinin daha büyük bir kısmı karaciğere ve akciğere metastaz yapar (Stintzing, Tejpar, Gibbs, Thiebach ve Lenz, 2017). Özellikle >70 yaş her iki cinsiyette de proksimal yerleşimli kolon kanserleri gözlenir (Bruckner, Pitrelli ve Merrick, 2000; Libutti,

Saltz, Willett ve Levine, 2015). Aynı zamanda olguların %3-6'sında birden fazla odaklı karsinomlar da görülebilmektedir (Rosai, 2004).



Şekil 2.2 KRK'de tümörün yerleşim yerine göre dağılımı gösterilmektedir (Johns Hopkins Medicine, 2013).

2.7. Sporadik Kolorektal Kanserlerin Moleküler Patogenezi

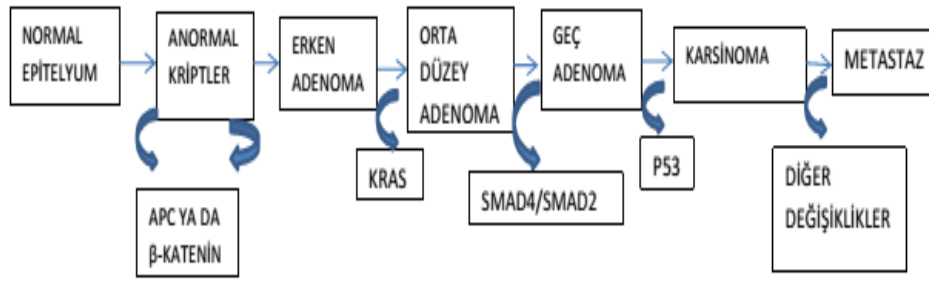
Kolorektal kanser, farklı fenotiplere yol açan, farklı moleküler mekanizmalara sahip heterojen bir hastalıktır. Kolorektal karsinomalar, sporadik, kalıtsal ve ailesel geçişli olabilir. Genetik ve epigenetik değişiklikler, hücrel metabolizma, proliferasyon, farklılaşma, sağ kalım ve apoptozla ilgili sinyal yollarına etki eder. Kolorektal karsinogenezin moleküler temelini anlaması, KRK'nin hem prognozu hem de tedavisi açısından önemlidir. Hastalık evresinin daha iyi değerlendirilmesi ve tümörlerin patolojik ve moleküler özelliklerine göre tedavinin bireyselleştirilmesinin hastalığın seyrinde etkili sonuçlar doğurabileceği öne sürülmektedir (Al-Sohaily, Biankin, Leong, Kohonen-Corish ve Warusavitarne, 2012; Mármol, Sánchez-de-Diego, Pradilla Dieste, Cerrada ve Rodriguez Yoldi, 2017).

Kolorektal karsinogenez ile farklı gen mutasyonları ilişkilendirilmiştir. Bu genlerden özellikle *APC*, *KRAS* ve *TP53*'ün, KRK'de oldukça büyük bir oranda değişikliğe uğradığı bulunmuştur (Smith vd., 2002). Kolorektal kanser, normal mukozanın adenoma ve ardından karsinomaya dönüşmesine yol açan bir dizi olayla gelişir. Genomik kararsızlık, bu dönüşüm sürecinin ayrılmaz bir parçasıdır. Fearon ve Vogelstein 1990 yılında, normal kolon dokularından KRK'nin aşamalı oluşumunu

açıklamak için genetik bir model tanımlamışlardır. Bu modelde KRK oluşumu için 3 önemli özellik söz konusudur. Birincisi KRK, hücre çoğalmasını veya DNA hasarlarının onarımını düzenlemede önemli işlevlere sahip genlerdeki değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkar, ikincisi birden fazla gende mutasyon oluşumu gerekli, üçüncüsü ise tümörün biyolojik davranışının belirlenmesinden genetik değişikliklerin sırası ve birikimi sorumludur. Kolorektal kanser oluşumundaki bu aşamalı süreç "Adenom-Karsinom Sekansı" olarak tanımlanmıştır (Fearon ve Vogelstein, 1990). Kolorektal kanser oluşumu şekil 2.3'de gösterilmektedir. Bu kavram normal epitel dokudan displastik epitel dokuya sonrasında da çoklu klonal adenomötöz poliplerde genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu karsinomaya kadar giden aşamalı bir süreci ifade eder. Bu süreç yaklaşık 10-15 yıllık bir zamanda aşamalı olarak gerçekleşir (Hisamuddin ve Yang, 2006). Bugüne kadar, üç farklı moleküler yolak tanımlanmıştır. Bunlar Kromozomal Kararsızlık (CIN) yolağı, Mikrosatellit Kararsızlık (MSI) yolağı ve CpG Adası Metilatör Fenotipi (CIMP) yolağıdır. Bazı tümörler birden fazla yolağın özelliklerini sergileyebilir (Goel vd., 2003; Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y vd., 2016).

Karsinogenez süreci öncelikle adenokarsinom poliplerde APC geninde mutasyon oluşumu ile başlar. APC mutasyonları β -katenin molekülünün nukleusa geçişini sağlayarak tümörögenез ve invazyonda etkili genlerin ifade edilmesine sebep olur. Sonrasında KRAS ve PI3K'deki değişimler ise MAPK yolağının aktive ederek hücre proliferasyonuna sebep olur. En son olarak TP53 geninde fonksiyon kaybı mutasyonları gelişir ve bu durum hücrenin kontrolsüz büyümesi ile sonuçlanır. Bu aşamalı karsinogenez uzun yıllar sonra KRK ortaya çıkmasına neden olur (Mármol, Sánchez-de-Diego, Pradilla Dieste, Cerrada ve Rodriguez Yoldi, 2017).

Sporadik KRK'lerin %80'inde APC geninde genetik bir değişim söz konusudur. Bu değişim CIN'e sebep olur ve erken adenom evresi gelişir. Sonrasında hücreler geç adenom evresine geçiş gösterir. Bu evrede APC mutant adeno poliplerde KRAS mutant varyantları ortaya çıkar. Klonal hücrelerde son aşama olarak displazi evresinde oluşan APC/KRAS mutasyonuna ek olarak TP53 ve DCC geninde değişimler ortaya çıkar (Ewing, Hurley, Josephides ve Millar, 2014).



Şekil 2.3 KRK progresyonu ile sıklıkla ilişkilendirilen genetik değişiklikler gösterilmektedir (Hisamuddin ve Yang, 2006).

2.7.1. Kromozomal instabilite yolağı (CIN)

Kromozomal kararsızlık, KRK'deki genomik dengesizliğin en yaygın nedenidir. Sporadik KRK'nin %85'inde bu mekanizma gözlenir. Kromozomal kararsızlık, kromozom kopya sayısındaki yapısal değişiklikler sonucu ortaya çıkar. Kolorektal karsinogenez sürecinde etkili genleri barındıran bütün kromozomların veya kromozomal bölgelerin kazanımı veya kaybı ile karakterizedir. Bu mekanizma, kromozom segregasyonu, telomer disfonksiyonu ve DNA hasarına yanıtta ortaya çıkan değişiklikler sonucu hücresel fonksiyonlarda görevli APC, KRAS, TP53 ve PI3K gibi kritik genleri etkiler. Bunun sonucunda da kromozom sayısında (anöploidi) bir dengesizlik, kromozomal genomik amplifikasyonlar ve yüksek bir heterozigotluk kaybı (LOH) frekansı ortaya çıkar (Pino ve Chung, 2010; Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y vd., 2016).

Kromozomal instabilite yolağında etkili olan, 7., 8q, 13q, 20. ve X kromozomlarında geniş (bir kromozal kolun yarısından fazla) amplifikasyonlar ve 1., 4., 5., 8p, 14q, 15q, 17p, 18., 20p ve 22q. kromozomlarda geniş delesyonlar tanımlanmıştır. Ek olarak, VEGF, MYC, MET, LYN, PTEN gibi önemli kanser genlerini içeren bölgelerde kazançlar veya kayıplar bildirilmiştir. Ayrıca 1., 5., 8., 17. ve 18. kromozomlarda yüksek allel kaybı sıklığı gözlenebilmektedir (%46-78). Bunlar arasında tüm kromozom kaybı, kromozom 18 için daha sık görülürken, diğer kromozomlar ağırlıklı olarak kısmi kayıptan etkilenir. Bu karyotipik anormalliklerle birleştiğinde, onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonların birikimi söz konusudur. En yaygın tek gen değişiklikler, APC ve KRAS genlerindeki varyantlardır (J.-Y. Wang vd., 2006).

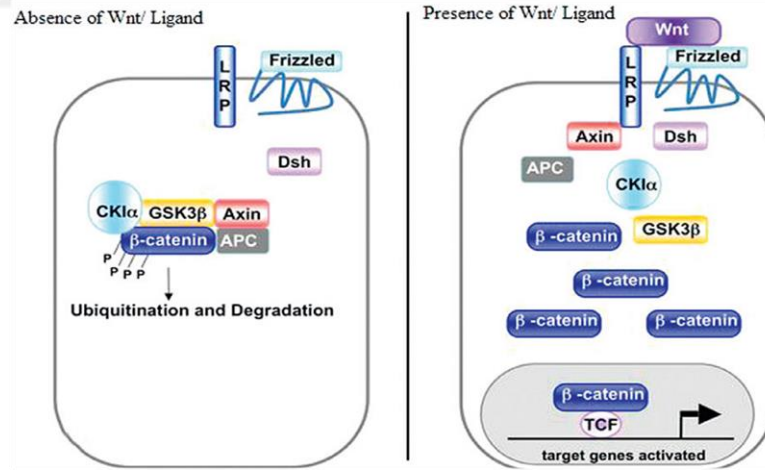
KRAS protoonkogeni KRK ve adenomların %30-60'ında değişime uğramıştır. Aktive edilmiş, *KRAS*'in, *BCL-2*, *H2AFZ*, *RAP1B* *TBX19*, *E2F4* ve *MMP1* dâhil olmak üzere down regüle hedef genlerin aktivasyonu yoluyla adenomdan karsinomaya geçişte önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmektedir. Sinyal transdüksiyonunda yer alan 21 kDa'lık bir membran bağlı protein olan *KRAS*, hücre dışı sinyallere yanıt olarak aktive edilir. Değişime uğramış protein, GTP'yi GDP'ye hidrolize eden bozulmuş GTPaz aktivitesi nedeniyle sürekli aktif formda kalır. Aktive edici varyantların %90'dan fazlası, *KRAS* geni ekzon 2'in 12. ve 13. kodonlarında bulunur. Kodon 12'deki varyantlar, kodon 13'teki varyantlardan daha onkogenik bir fenotip gösterir. Kodon 13 varyantlarının, adenom-karsinom geçişinde daha fazla rol oynadığı düşünülmektedir. Kodon 12 varyantları ise KRK tümör hücrelerinin lokal invazyon ve metastaza uğramasına yol açar. *RAS* aktivasyonu, hücrel büyüme, farklılaşmayı, sağ kalımı, apoptozu, hücre iskeleti organizasyonunu, hücre hareketliliğini, proliferasyonu gibi çoklu hücrel yolları etkiler (Brink vd., 2003; Malki A vd., 2021).

Sporadik KRK'in %20-50'sinde 5q kromozomunun allelik kaybı bildirilmiştir. Kromozom 5'in uzun kolunda iki önemli gen bulunur; bunlar *APC* ve *MCC* genleridir. Somatik *APC* varyantları, KRK'nin %60-80'inde ve ayrıca kolorektal öncü lezyonların (adenomlar) çoğunluğunda görülmekte olup, bu da *APC*'de ortaya çıkan varyantların KRK tümörögenез sürecinde erken bir olay olduğunu desteklemektedir. *APC* geni, kanonik *WNT/β-katenin* yolağında yer alan, iğsi yapıdaki mikrotübüllerin düzenlenmesinde görevli bir tümör baskılayıcı gendir. Bu yolağta; *APC* proteini, *β-katenin*, aksin ve glikojen sentaz kinaz 3 (*GSK3*) ile birlikte yıkıcı kompleksi oluşturur. Bu kompleksin yıkımı yolağın aktif hale gelmesine sebep olur. *APC* geni bir tümör baskılayıcı gen olduğundan, fonksiyon kaybı için Knudson'un iki vuruşlu hipotezine uygun olarak, her iki allelin de kaybı gereklidir (Kolligs, Bommer ve Göke, 2002). Fonksiyonel olmayan güdük bir proteine yol açan varyantlar, hücrede *β-katenin* birikimine ve kolorektal tümör oluşumunu tetikleyen bir dizi genin düzensiz ekspresyonuna neden olur (Ewing vd., 2014; Malki A vd., 2021).

MCC geni 5q21'de bulunur. DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsü durdurulmasına neden olan bir hücre döngüsü düzenleyici proteindir. Genellikle KRK'de *MCC* geninin promotör bölgesi hipermetilasyon yoluyla susturulur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, *MCC*'nin *APC*'den bağımsız olarak *WNT/β-katenin*

sinyal transdüksiyonunu da inhibe edebileceği ileri sürülmüştür (Fukuyama vd., 2008; Malki A vd.,2021).

WNT yolağı, bağırsak epitel yenilenmesini desteklemede merkezi bir rol oynar. *APC*, β -*katenin*'e bağlanır ve onun bozunmasını indükler, böylece bir negatif β -*katenin* düzenleyicisi olarak işlev görür. *APC* fonksiyonunun kaybı (mutasyon, LOH veya promotör metilasyonu yoluyla) sitoplazmik β -*katenin* birikimine yol açarak nükleer translokasyona ve β -*katenin*'in *TCF/LEF* transkripsiyon faktörüne bağlanmasına yol açar. *WNT* hedef genleri, hücre döngüsü ilerlemesinin düzenleyicileri (*C-MYC* ve *SIKLİN D1*), hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve apoptoz dâhil olmak üzere birçok hücreyel işlevi etkiler. Bu nedenle, *WNT* sinyali yolunun, KKR'nin hem başlatılması hem de ilerlemesi için önemli olduğu gösterilmiştir. *APC* fonksiyon kaybı, *WNT* aktivasyonu için tek etken değildir; β -*katenin*'i bozunmaya dirençli hale getiren β -*katenin* varyantları (Tüm KKR'lerin %5'inden daha azında bulunur), *AXIN1* ve *AXIN2*'deki varyantlar (β -*katenin* degradasyonu için önemlidir) veya *TCF-4* transkripsiyon faktöründe aktive edici mutasyonlar gibi alternatif mekanizmalar da söz konusudur (Behrens, 2005; Malki A vd.,2021). *WNT*/ β -*katenin* sinyal yolağının mekanizması şekil 2.4'de gösterilmiştir.,



Şekil 2.4 Kanonik *WNT*/ β -*katenin* yolağı. *WNT*'lerin *Frizzled* reseptörlere bağlanması, iskele proteinleri aksin / iletkene dayalı bir yıkım kompleksinin işlevini bloke eden Disheveled (*DSH*) 'yi etkinleştirir. *WNT*'lerin yokluğunda, aksin/iletken kompleksleri, *GSK3β* tarafından β -*katenin* fosforilasyonunu destekler. Fosforillenmiş β -*katenin*, çoklu ubiquitinle işaretlenir ve ardından proteozomlarda yıkılır. *WNT*'ler varlığında veya *APC* mutasyonlarından sonra, β -*katenin*'in fosforilasyonu ve degradasyonu bloke edilir, bu da β -*katenin*'in nükleer transferine izin verir. *TCF*/ β -*katenin* kompleksleri DNA'ya bağlanır ve *WNT* hedef genlerini aktive eder (Al-Sohaily vd., 2012).

Kromozom 8p'nin allelik kaybı, KRK'nin %50'sinden fazlasında görülür. 8p21'de lokusunda KRK'de etkili olabilecek tümör baskılayıcı genlerin varlığını düşündüren ortak bir delesyon bölgesi tanımlanmıştır. Kromozom 8p'nin kaybı, ileri evre hastalık ve artmış metastatik potansiyel ile ilişkilendirilmiştir; özellikle 8p21-22 lokusu, tümör ilerlemesi için önemli bir bölgeyi ve bir metastatik duyarlılık lokusunu temsil eder. Bu lokusun kaybı, metastaz potansiyelini artırır (Chughtai vd., 1999; Mourra vd., 2008; Malki A vd.,2021).

KRK'nin %75'inde 17p kaybı bildirilmiş, ancak adenomlarda rapor edilmemiştir, bu da tümör baskılayıcı gen *TP53*'ü içeren bu segmentin kaybının KRK tümör oluşumu sürecinde geç bir olay olduğunu düşündürmektedir. KRK'de, 17p'nin allelik kaybı, genellikle ikinci alleldeki *TP53*'teki mutasyonlarla ilişkilidir ve bunun adenomun karsinomaya geçişine aracılık edebileceği öngörülmektedir. *TP53*, hücre siklusu kontrol noktasında, apoptoz, yaşlanma, otofaji ve hücre metabolizmasında rol oynayan bir dizi geni aktive eden, tümör baskılayıcı aktiviteye sahip bir transkripsiyon faktörüdür. Ek olarak, genomik stabilitenin korunması için önemli olan bir dizi transkripsiyondan bağımsız hücresel aktiviteye sahiptir. *TP53*, mutajenler, onkojenik uyarı, hipoksi ve telomer erozyonu ile DNA hasarı dâhil farklı hücresel streslere yanıt olarak hücre adaptasyonu kolaylaştırır (Green ve Kroemer, 2009; Malki A vd.,2021).

Kromozom 18'in uzun kolu, *DCC*, *SMAD2* ve *SMAD4* dâhil olmak üzere birçok aday tümör baskılayıcı gen içerir. KRK'nin %50-70'inde 18q'da LOH gözlenir ve KRK evre II ve III'de kötü prognoz bir göstergesidir. *DCC*, hücre adezyonu ve göçünün düzenlenmesinde rol oynamakla birlikte ek olarak *DCC*, ligandının (netrin-1) yokluğunda apoptozu indükler. Smad proteinleri, *TGF-β* sinyal yolağında yer alan transkripsiyon faktörleridir. *SMAD4* protein ekspresyonunun kaybı, kötü prognoz ve ileri evre KRK ile ilişkilidir. Smad proteinleri, *C-MYC*, *CBFA1*, *FLRF* gibi hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler. *SMAD4* ayrıca potansiyel bir metastatik modülatör olan kladin-1'i *TGF*'ye bağlı bir şekilde down regüle eder (Lanza vd., 1998; Wei Wang vd., 2010).

2.7.2. Mikrosatellit instabilitesi (MSI)

Mikrosatellitler, tüm genom üzerine yayılan ve tekrarlayan özelliklerinden dolayı replikasyon sırasında hatalara yatkın olan kısa tekrar nükleotid dizileridir.

DNA yanlış eşleşme onarım (MMR) sistemi, DNA replikasyonu sırasında meydana gelen yanlış baz çifti eşleşmelerini tanır ve onarır. Mikrosatellitlerin kararsızlığı, MMR sisteminin bu hataları düzeltememesinin bir yansımasıdır. Mikrosatellit kararsızlığı sergileyen tümörler, normal bir karyotip sergiler. Mikrosatellit kararsızlığının sebep olduğu tümörögenез mekanizması, somatik mutasyon veya anormal metilasyon yoluyla MMR'den sorumlu genlerin inaktivasyonunu içerir. MMR gen fonksiyonundaki kayıp sonucunda nükleotid tekrarları içinde iplik kaymasının onarılamaması, mikrosatellitlerin boyutunu değiştirir. Bu mikrosatellitler bir genin ekzonik bölgesi içinde yer alıyorsa, genin fonksiyonunda veya ekspresyonunda değişikliğe yol açabileceğinden önemlidir. Sporadik olguların yaklaşık %15'inin MMR genlerindeki varyantlardan kaynaklı olduğu ve yaş, kadın cinsiyeti ve bu tümörlerin proksimal dağılımı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Jass, 2004; Malki A vd.,2021).

MSI 1993 yılında keşfedildikten sonra, HNPCC ile bağlantısı ve ardından MMR genlerinin klonlanması, MSI'nin kolorektal karsinogenezde alternatif bir yol olarak tanımlanmasına yol açmıştır. MMR genlerindeki germline mutasyon HNPCC ile sonuçlanır. MMR genlerinin somatik mutasyonu veya hipermetilasyonu ise sporadik KKK'ye neden olur. Tanımlanan MMR sistemi genleri arasında *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *MLH3*, *MSH3*, *PMS1* ve *EXO1* bulunur. Sporadik MSI-yüksek KKK fenotipi, genellikle *MLH1*'in hipermetilasyon yoluyla susturulmasından kaynaklanır (Al-Sohaily vd., 2012; Malki A vd.,2021).

Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü 1997'de "Uluslararası Mikrosatellit İstabilite Çalıştayı" düzenlemiş ve bu çalıştayda, MSI'nın tanımlanması için 5 mikrosatellit lokusundan oluşan bir panel önerilmiştir. Panel, iki mononükleotid tekrarından (BAT25 ve BAT26) ve üç dinükleotid tekrarından (D5S346, D2S123 ve D17S250) oluşur. MSI-yüksek, en az iki belirtecin kararsızlığı ile tanımlanır, MSI-düşük tek bir belirteçteki kararsızlıkla tanımlanır ve tümörler, görünürde bir kararsızlık olmadığında Mikrosatellit stabilitesi (MSS) olarak adlandırılır. Seçilmiş tetranükleotid tekrarlarında (EMAST) yükselen mikrosatellit değişiklikleri, tüm KKK'lerin yaklaşık %60'ında görülen başka bir MSI formudur. MSI-düşük ve EMAST'ın, dinükleotid ve tetranükleotid kararsızlığıyla sonuçlanan *MSH3*'ün aşağı yönlü regülasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. MSI düşük tümörler, MSS

tümörleri ile karşılaştırıldığında daha kötü hasta sağ kalımı ile ilişkilidir (Kohonen-Corish vd., 2005; Nojadeh, J. N., Behrouz Sharif, S. ve Sakhinia, E., 2018).

MSI-yüksek moleküler özelliklere sahip sporadik KRK, farklı bir fenotipe sahiptir. İleri yaştaki kadınlarda daha yaygındır ve ağırlıklı olarak sağ kolonda bulunurlar. Patolojik özellikler arasında artmış lenfositik infiltrasyon (Crohn hastalığı benzeri reaksiyon), müsinöz histoloji ve zayıf farklılaşma bulunur. MSI yüksek tümörlerin olumsuz patolojik özelliklerine rağmen, genel sağ kalımda iyileşme ile ilişkilidir (Jass, 2004; Nojadeh, J. N., Behrouz Sharif, S. ve Sakhinia, E., 2018)).

Mikrosatellit instabilitesi-yüksek tümörler, daha az LOH gösterme eğiliminde olup *K-RAS* ve *TP53*'te daha az varyanta sahiptirler. *BRAF* V600E varyantları, sıklıkla sporadik MSI-yüksek KRK'de görülür. *TGFβRII* genindeki fonksiyon kaybı ve MSI ise KRK'nin %90'ında gözlenmiştir. *TGFβ-II* sinyal iletimi, hücrel çoğalmayı inhibe eder ve bu nedenle gen işlevindeki değişiklikler, MSI karsinogenezinde olası mekanizmalardan biridir (Al-Sohaily vd., 2012).

2.7.3. CpG adası metilasyon fenotipi (CIMP)

Epigenetik değişiklikler, genin DNA dizisini değiştirmeden gen ekspresyonundaki veya işlevindeki değişiklikleri ifade eder. İnsanlarda epigenetik değişikliklere genellikle DNA metilasyonu veya histon modifikasyonları neden olur. DNA metilasyonu genellikle 5'-CG-3' (CpG) dinükleotidinde meydana gelir. Gen promotör bölgesinin metilasyonu genin susturulmasıyla sonuçlanır, dolayısıyla tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı için alternatif bir mekanizma sağlar. Kolorektal karsinogenezde yer alan *APC*, *MCC*, *MLH1*, *MGMT* gibi genlerin, DNA hipermetilasyonu ile susturulduğu bildirilmiştir. Bu mekanizmaya verilebilecek klasik bir örnek, sporadik MSI-yüksek KRK'de *MLH1*'in hipermetilasyon yoluyla susturulmasıdır. Sigara içme ve ileri yaş gibi çevresel faktörlerin artan metilasyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Toyota ve Issa, 1999; Wong, Hawkins ve Ward, 2007).

CIMP, birden fazla genin eş zamanlı hipermetilasyonunun varlığı anlamına gelir. CIMP yüksek KRK, sporadik KRK'nin %15-20'sini oluşturur ve farklı özelliklere sahiptir. Kadınlarda, yaşlı hastalarda ve proksimal yerleşimde daha yaygındır. Patolojik olarak, CIMP-yüksek tümörler genellikle kötü farklılaşmıştır, müsinöz veya taşlı halka histolojisi gösterir, mikrosatellit kararsızdır ve *BRAF* varyantı içerir (Weisenberger vd., 2006). Öncü lezyonlar genellikle sapsız tırtıklı

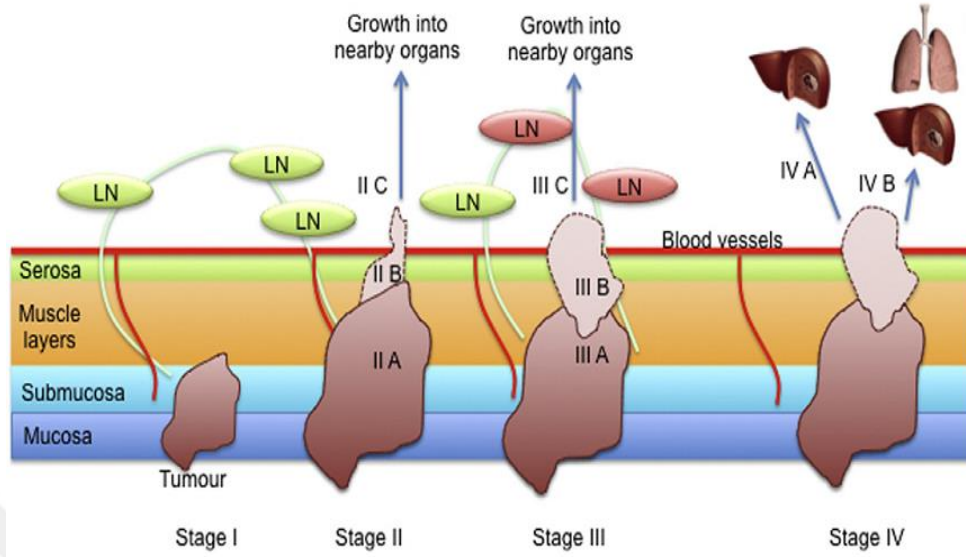
adenomlardır. Bunlar kolorektal poliplerin %9'unu oluşturur ve farklı özelliklere sahiptir, çekum ve yükselen kolonda yerleşim gösterir, *BRAF* varyantları ve yaygın DNA metilasyonu sergiler (Samowitz vd., 2006; Malki A vd.,2021).

2.8. Kolorektal Kanserlerde Tanı ve Evreleme

Kolorektal kanserin klinik belirtileri lezyonun konumuna bağlıdır. Kolorektal karsinomlu hastaların yaklaşık %30'u tıkanma veya perforasyon semptomları ile akut aşamada teşhis edilir. Kolon kanserli hastaların %20-25'inde ve rektal kanserli hastaların %18'inde ilk tanı anında metastaz mevcuttur. Karaciğer, KRK hastalarında en yaygın metastaz lokalizasyonunu temsil etmesine rağmen, bu hastaların %2,1'inde akciğer metastazları gözlenir. Akciğer metastazı görülme oranı, rektal kanserli hastalarda kolon kanserli hastalara göre yaklaşık 3 kat daha yüksektir (Kolschoten vd., 2012; Smothers vd., 2003).

Doğru bir tedavi stratejisi sağlamak için uygun teşhis ve evreleme önemlidir. Son yıllarda, tanı teknikleri ve cerrahideki gelişmeler, adjuvan ve aynı zamanda palyatif tedavilerin optimizasyonu nedeniyle KRK ölüm oranı %20'den fazla azalmıştır. Histopatolojik inceleme için biyopsi ile birlikte çekuma kadar tam bir kolonoskopi, yüksek tanısal performansı nedeniyle kolorektal lezyonları teşhis etmek için altın standart olarak kabul edilir. Bu prosedür, tümör lokalizasyonuna ve muhtemel poliplerin endoskopik eksizyonuna izin verir, böylece eşzamanlı olarak tanısal ve terapötik imkân sağlar. En sık kullanılan evreleme sistemi "Amerikan Ortak Kanser Komitesi" (AJCC) ve "Uluslararası Kanser Birliği" (UICC)'nin kılavuzlarının önerdiği tümör, nod, metastaz (TNM) ve Dukes evreleme sistemidir. Özellikle, TNM ve UICC'ye göre sınıflandırma, değerli prognostik bilgiler sunar ve tedavi kararlarına rehberlik eder. Evreleme sistemi ile hastalığın metastaz derecesini saptayarak tedavi ve prognoz stratejilerini belirlemek amaçlanır. Kolorektal kanserler Dukes evreleme sisteminde; evreler A, B, C ve D şeklinde sınıflandırılır. Bu sınıflandırmada hastalığın metastaz yapısı yapılmadığı ve metastazın yayılım bölgesine göre derecelendirme yapılır. Ancak lenf nodu tutulumu yayılımı ile ilgili değerlendirme yapılmaması bu evrelemenin dezavantajıdır. Kolorektal karsinomlar TNM sistemine göre, lokal invazyon derinliğine (T evresi), lenf nodu tutulumuna (N evre) ve uzak metastaz varlığına (M evresi) göre sınıflandırılır (Tablo 2.2). TNM

sisteminde metastatik lenf nodu sayısı önemlidir. Bu sayının artması prognozu kötü yönde etkilemektedir (Şekil 2.5) (kumar Pandurangan vd., 2018).



Şekil 2.5 KRK Evreleri. Evre I: Kanser kolon duvarının mukozasından kas tabakasına yayılımı, Lenf düğümü (LN) tutulumu yoktur. Evre II: Kanser kolon duvarının kas tabakasından serozaya (IIA) yayılımı, ve serozaya yoluyla yakın organlara (IIB ve IIC) yayılımı ve Lenf düğümü (LN) tutulumu yoktur. Evre III: Kanser kolon duvarının mukozasından submukozaya ve kas tabakasına yayılmış olabilir. Bir ile üç yakın lenf düğümüne veya lenf düğümlerine (IIIA) yakın dokulara, serozaya yoluyla yakın organlara yayılmamış olabilir (IIIB). Evre IV: Kanser kolon veya rektum duvarından büyümüş olabilir veya olmayabilir ve kan ve lenf düğümleri yoluyla vücudun bir (IVA) veya daha fazla (IVB) bölümüne örneğin karaciğer veya akciğer yayılmış olabilir (Bustin ve Murphy, 2013; kumar Pandurangan vd., 2018).

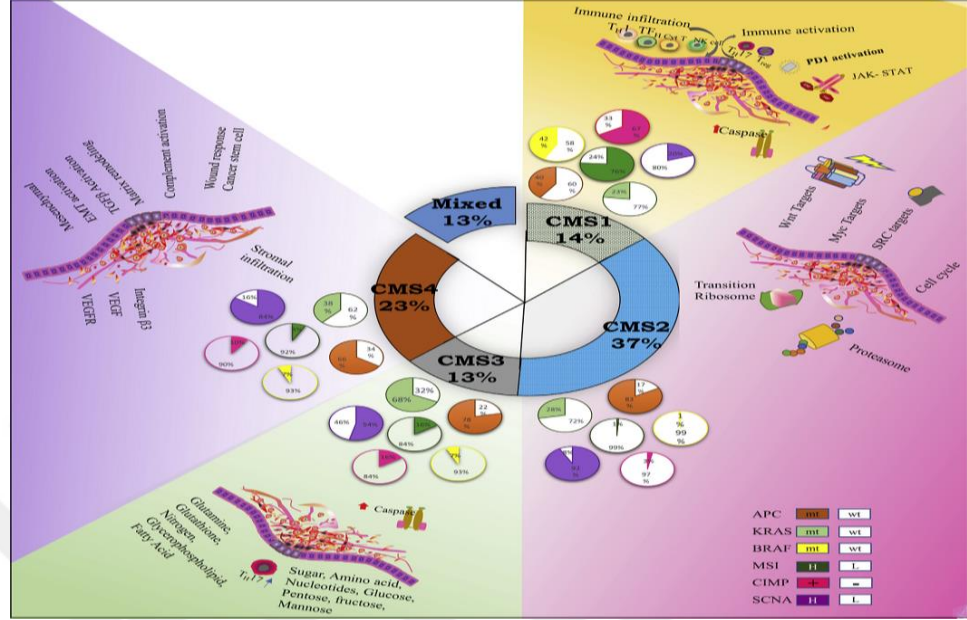
Tablo 2.2 KRK’de TNM sınıflaması AJCC 2017 (8.Baskı)

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

Tis: Karsinoma in situ mevcut:intramukozal karsinoma (muskularis mukozası yoluyla uzaması olmayan lamina propria tutulumu)
Tx: Tümör, saptanamıyor
T0: Tümör, mevcut değil.
T1: Tümör, submukozayı işgal eder(muskularis mukozası yoluyla ancak muskularis propriaya değil)
T2: Tümör muskularis propriayı işgal eder
T3: Tümör muskularis propriadan perikolorektal dokulara yayılır
T4: Tümör,visseral periton yoluyla komşu organ veya yapıya istila eder veya yapışır
T4a: Tümör tümör visseral periton yoluyla istila eder (bağırsağın tümör yoluyla büyük çapta delinmesi ve visseral periton yüzeyine inflamasyon alanlarından tümörün sürekli istila edilmesi dahil)
T4b: Tümör doğrudan komşu organları veya yapıları işgal eder veya bunlara yapışır
N:Bölgesel lenf nodları
NX:Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez
N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1: 1-3 lenf nodları pozitif(Lenf düğümlerinde tümör ölçümü ≥2mm) veya herhangi bir sayıda tümör birikintisi mevcuttur ve tüm tanımlanabilir lenf düğümleri negatiftir
N1a: 1 bölgesel lenf nodu pozitif.
N1b: 2 veya 3 bölgesel lenf nodu pozitif.
N1c: Bölgesel lenf bezi tutulumu izlenmiyor; ancak subserosa, mezenter veya peritonealize olmayan perikolik veya perirektal / mezorektal dokularda tümör birikintileri var
N2: 4 ya da daha fazla bölgesel lenf nodu pozitif
N2a: 4, 5 veya 6 bölgesel lenf bezinde tümöral tutulum mevcut.
N2b: 7 veya daha fazla sayıdaki bölgesel lenf bezinde, tümöral tutulum mevcut.
M: Uzak metastaz
M0: Uzak metastaz yok.
M1a: 1 ya da daha fazla uzak organda metastaz mevcut. Periton tutulumu olmadan
M1b: 2 ya da daha fazla uzak organ tutulumu mevcut ,Periton tutulumu olmadan
M1c: Peritoneal yüzeye metastaz tek başına veya başka bir bölge veya organ metastazı ile tanımlanır

Son yıllarda Uluslararası Kolorektal Kanser Alt Tip Belirleme Konsorsiyumu, (CRCSC) tarafından gen ekspresyon verileri temelinde KRK moleküler alt tiplerinin varlığını değerlendirmek için büyük ölçekli bir çalışma grubu oluşturulmuştur. Bu birlik KRK’de moleküler alt grupları (CMS) belirlemişlerdir. Buna göre; KRK’yı 4 farklı alt grupta sırasıyla CMS1, CMS2, CMS3 ve CMS4 şeklinde sınıflandırmışlardır. CMS1’in (MSI %14) bağışıklık genlerinin upregülasyonu, sıklıkla *BRAF* geni varyantları ve MSI-yüksek ile ilişkili olduğu, CMS2’de (kanonikal % 37) *APC*, *TP53* *RAS* ve *EGFR* genlerindeki mutant varyantlarının sık olduğu ve *WNT* ve *MYC* sinyal aktivasyonu gözlemlendiği, CMS3’ün (metabolik %13), glutaminoliz ve lipidogeneze daha yüksek aktiviteye sahip metabolik düzensizlik ile tanımlandığı ve *KRAS* varyantları gözlemlendiği, CMS4’ün (mezenşimal %23) ise *TGF-β* sinyal yolağı aktivasyonu, stromal invazyon ve anjiyogenez ile tanımlandığı ve bu durumun kemoterapiye direnç ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca CMS1 sağ kolon yerleşimli, CMS2 sol kolon yerleşimli iken

CMS3 ve CMS4'ün spesifik bir anatomik yerleşim göstermediği ve sağ kalım bakımından CMS1 ve CMS2'nin iyi prognoz CMS4'ün ise kötü prognoz sergilediği bildirilmiştir (Şekil 2.6) (Guinney vd., 2015; Singh MP vd., 2021).



Şekil 2.6 Kolorektal kanserin CMS sınıflandırması. KRK'deki konsensus moleküler alt tiplerinin temel özellikleri. Her grup kendine özgü özellikleri ve klinik önemi ile detaylandırılmıştır. Günümüzde, KRK 4 ana sınıfa ve bir karma alt türe ayrılmıştır. CMS1 tümörü; daha yüksek bir MSI, hipermetilasyon ve hipermutasyon yüzdesi sergiler ve daha iyi hayatta kalma ile ilişkilidir. CMS2; tüm tümör alt tiplerinin yaklaşık %37'sini oluşturur. Bu tümörlerde, mikrosatellit stabil, aktive WNT ve MYC yolağına ve TP53 ve EGFR mutant varyantlarına sahiptir. CMS3 tümörleri, KRAS geninde yüksek mutasyon barındırır ve KRAS mutasyonu, gen ekspresyon seviyesinde oldukça heterojendir ve epitelial özelliklere sahiptir. CMS4; güçlü stromal infiltrasyon, up regüle edilmiş anjiyogenik özellikler ve hiperaktif TGF- β ile yüksek bir CpG metilasyon fenotipine sahiptir (Guinney vd., 2015; Singh MP vd., 2021).

2.9. Kolorektal Kanserde CEA ve CA 19-9 Tümör Belirteçleri

Gastrointestinal malign tümörlerde karsinoma embriyonik antijen (CEA) ve serum karbonhidrat antijen (CA 19-9) gibi tümör belirteçlerindeki yüksek serum seviyeleri hastalığın tanı ve prognozunda izlenen önemli parametrelerdendir. Kolorektal kanserlerde, CEA ve CA 19-9 non invaziv prognostik tümör belirteçleri yaygın olarak kullanılmaktadır (S.-Y. Zhang, Lin ve Zhang, 2015).

Bir onkofetal tümör belirteci olan CEA, 1965 yılında Gold ve Freedman tarafından keşfedilmiş olup, immünglobulin süper ailesinde yer alan bir

glikoproteindir. Hücre adezyonu ve apoptozda görevli, özellikle metastaz oluşumunda önemli etkenlerden biridir. KRK olgularının yaklaşık %60-85'inde bu antijenin serumdaki seviyesinde artış söz konusudur. Testin KRK için spesifikliğı %90 iken sensitivitesi %40-75 arasında değişmektedir. Ancak yalancı pozitiflik oranı yüksek olduğu için tarama testi olarak kullanılması önerilmemektedir. Bu belirteçte aynı zamanda sigara içenlerde, ülser kolit, karaciğer sirozu ve kronik bronşit vakalarında da önemli derecede artış olduğu gözlenmektedir (Stiksma, Grootendorst ve van der Linden, 2014). Histolojik olarak iyi diferansiye adenokarsinomlarda daha yüksek CEA serum konsantrasyonu eşlik eder. CEA serum konsantrasyon seviyesi tümörün boyutu ile ilişkili olup, boyutu küçük olan tümörlerde normal serum konsantrasyonu gözlenirken, daha büyük boyutlu tümörlere yüksek serum konsantrasyonu eşlik eder (Vukobrat-Bijedic vd., 2013).

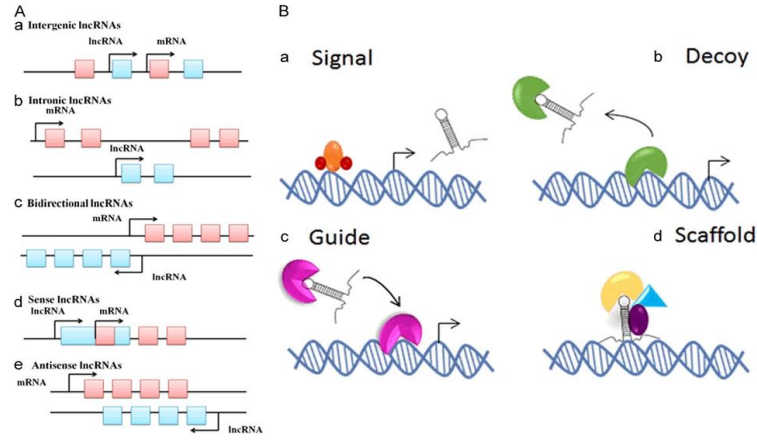
Kolorektal kanserde hastalığın izleminde kullanılan bir diğer monoklonal antikor Koprowski tarafından 1979 yılında keşfedilen CA19-9'dur. Bu antijen kanser hücrelerinin epitel hücrelere adezyonunu teşvik eder. İleri evre KRK olgularının %35-40'ında CA 19-9'nun ekspresyon artışı söz konusudur. Yapılan çalışmalar CA 19-9 ekspresyon artışı olan hastaların daha kötü bir sağ kalım sergilediğini bildirmişlerdir. Tarama testi olarak kullanılması önerilmemekte olup, sadece tedaviye yanıtın takibinde kullanılması önerilir. Mevcut kılavuz önerilerine göre KRK'lerin tüm evrelerinde, CEA ve CA 19-9 bireysel prognoz, hastalık tekrarının tespiti ve tedavi sırasında izleme açısından önemli tümör belirteçlerindendir (Chiorean vd., 2020).

2.10. KRK'de Long non-coding RNA'ların Önemi

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, toplam insan genomunun yaklaşık %90'dan fazlası translasyona uğramazken sadece %2'den daha az kısmı translasyona uğrar. Bu, genomun çoğunluğunun binlerce kodlamayan RNA (ncRNA) transkripsiyonu ürettiğini gösterir (Tang vd., 2019; Mattick ve Makunin, 2006). Dizileme teknolojisindeki gelişmelerle birlikte transkriptlerin yüksek doğrulukla dizilenmeleri sonucu, çok sayıda fonksiyonel ncRNA'nın özellikle kanserlerde proteinleri kodlamak yerine transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun veya RNA modifikasyonlarının regülasyonunda rol aldığı bildirilmiştir (Chi, Wang, Wang, Yu ve Yang, 2019; Bonasio ve Shiekhatter, 2014; Eddy, 2001). Kodlamayan RNA'lar

boyutlarına ve işlevlerine göre iki grupta sınıflandırılır; küçük kodlamayan RNA ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA) (Chi, Wang, Wang, Yu ve Yang, 2019).

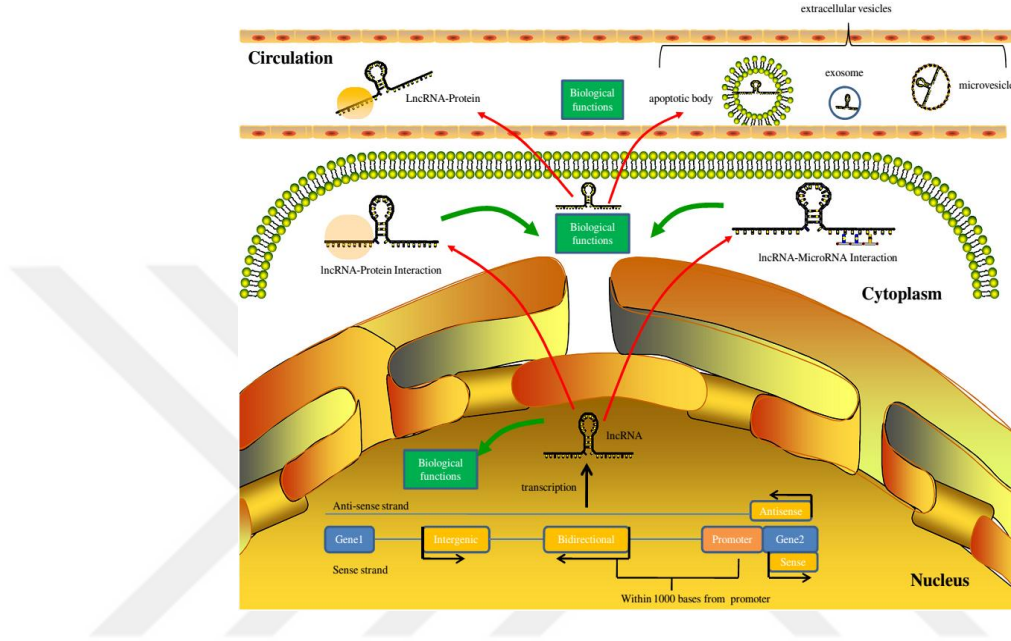
Uzun kodlamayan RNA'lar büyüklükleri 200 bp ile 100kbp arasında değişen, heterojen bir RNA grubunu temsil eder. Bu lncRNA'lar genomik lokalizasyonlarına, etki şekillerine ve işlevlerine göre, 5 alt grupta sınıflandırılır; sense, antisense, çift yönlü (bidirectional), intronik ve intergenik (Şekil 2.7.A). İntronik lncRNA'lar, protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde, intergenik lncRNA'lar iki protein kodlayan genin arasında, çift yönlü lncRNA'lar, karşı ipliğin bir kodlama transkriptinin yakınında lokalize olurken, sense lncRNA'lar, DNA'nın anlamlı zincirinde farklı protein kodlayan genlerin bir veya daha fazla intronu ve ekzonu ile örtüşür; antisense lncRNA'lar, DNA'nın antisense zincirinden kaynaklanır ve sense iplikçikteki protein kodlama dizilerine tamamlayıcı olabilir veya olmayabilir. Fonksiyonel olarak, lncRNA'lar sinyal verme (signaling), tuzak (decoy), kılavuz (guide) ve iskele (scaffold) lncRNA'lar olarak sınıflandırılır (Şekil 2.7.B). Sinyalizasyondaki lncRNA'lar, belirli sinyal yollarıyla ilişkilidir ve bunların ekspresyonu, sinyalleşme sürecindeki rollerine (doğrudan/dolaylı) bakılmaksızın aktif bir sinyal olayını gösterir. Tuzak lncRNA'lar, transkripsiyon faktörleri ve baskılayıcılar için moleküler havuzlar gibi davranır. Transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girer ve gen aktivasyonunu veya gen susturulmasını kolaylaştırarak hedef geni promotörlerine bağlanmaktan uzaklaştırırlar. Kılavuz lncRNA'lar, düzenleyici veya enzimatik olarak aktif protein komplekslerine bağlanır ve bunları aşağı akış sinyal olaylarını ve gen ekspresyonlarını düzenleyen spesifik hedef gen promotörlerine veya genomik lokuslara yönlendirir. İskele lncRNA'lar, çeşitli protein komplekslerinin bağlandığı ve gen ekspresyonunu ve kromozomal dinamikleri düzenleyen belirli genomik konuma veya hedef gen promotörüne yönlendirildiği merkezi bir platform görevi görür (Bhan, Soleimani ve Mandal, 2017; Weihong Sun, Ren, Li, Zhang ve Song, 2019).



Şekil 2.7 A) LncRNA'ların sınıflandırılması: a) intergenik lncRNA'lar b) İntronik lncRNA'lar c) Çift yönlü lncRNA'lar d) Sense ve antisense lncRNA'lar B) LncRNA'ların biyolojik rolleri: a) Sinyal molekül: Gen ekspresyonunu aktive eder. b) Tuzak molekül: Gen ekspresyonunu baskılar. c) Kılavuz molekül: Kromatin modifikasyonunu teşvik eder. d) İskele molekülü: Kromatin yapısına etki eder (Weihong Sun, Ren, Li, Zhang ve Song, 2019).

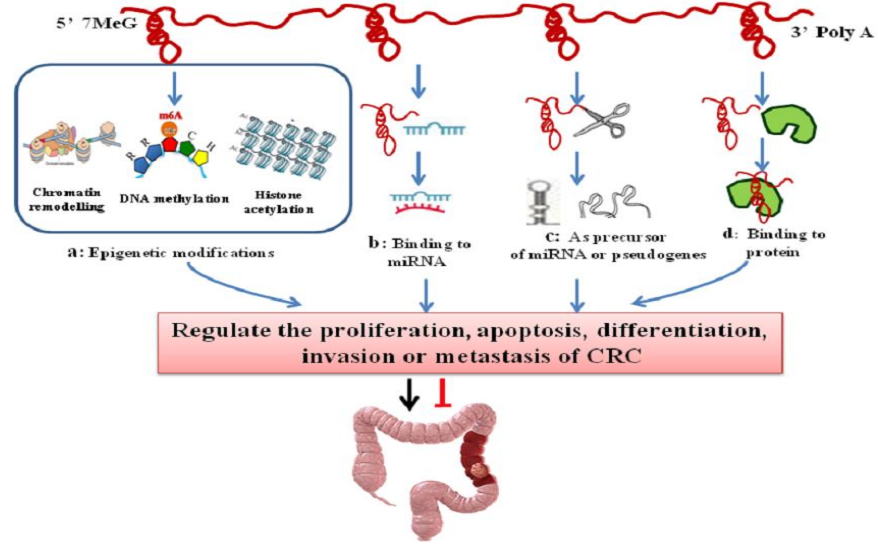
Yerleşim yeri olarak çoğunlukla nükleusta bulunmakla birlikte bazıları sitoplazmada yerleşim gösterebilir. Nükleusta, bu RNA'lar kromatinin yeniden şekillenmesine, transkripsiyon düzenlemesine ve RNA prosesine katılabilirken, sitoplazmada genellikle işlevlerini mRNA'lar ve proteinlerle etkileşimler yoluyla gösterirler (Şekil 2.8). Uzun kodlamayan RNA'lar hem tek zincirli hem de çift zincirli olabilirler. Bu RNA'ların çoğunluğu 5'cap başlığı taşırken, bazıları 3' poly A kuyruğuna sahiptir. Genellikle RNA Polimeraz II tarafından transkribe olmakla birlikte RNA Polimeraz III tarafından da transkribe olabilirler ve mRNA benzeri post-transkripsiyonel modifikasyonlara uğrayabilirler. Birçok lncRNA, mRNA'ya dönüşen transkriptler ile RNA Polimeraz II tarafından transkribe olmaları, splicinge uğramaları, 3'uçlarında poly A kuyruğu içermeleri, 5'uçlarında cap başlığı içermeleri gibi ortak özellikler taşır (Şekil 2.9). mRNA'ya göre daha az kararlıdır ve genellikle mRNA'lardan daha kısa olup ortalama uzunlukları 592 nt'dir. Özellikle Alu tekrarları başta olmak üzere kısa tekrar dizileri içerirler (Pecero, Salvador-Bofill ve Molina-Pinelo, 2019). LncRNA'lar, hücre döngüsü, apoptoz, histon modifikasyonları, kromozom imprinting ve hücre farklılaşması dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik işlemin düzenlenmesinde rol oynar (Chi, Wang, Wang, Yu ve Yang, 2019; K. C. Wang ve Chang, 2011). Yapılan çalışmalar, lncRNA'ların tümör baskılayıcı gen veya onkogen gibi davrandığını, transkripsiyonda, posttranskripsiyonda ve epigenetik düzeylerde metastatik transformasyona katkısını ortaya koymuştur. Transkripsiyonel

düzenlemede lncRNA'lar cis ya da trans olarak etki gösterebilirler ve gen ekspresyonunu aşağı ya da yukarı yönlü düzenleyebilir. Bu lncRNA genlerinin cis etkileri bulundukları kromozomla sınırlı iken, trans etkileri diğer kromozomlardaki genleri etkileyebilmektedir (Sun vd., 2018; Fatica ve Bozzoni, 2014). Daha çok dokuya özgü eksprese olan lncRNA'ların ekspresyon seviyesi tümörlü dokunun lokalizasyonu ve durumu ile yakın ilişkilidir (Cabili vd., 2011; Gibb vd., 2011).



Şekil 2.8 lncRNA'ların biyogenez ve fonksiyonu (Qi, Zhou ve Du, 2016).

Hücredeki lncRNA'ların rolü, birincil olarak nükleotid dizileri ve lncRNA'ların yapıları tarafından belirlenir. RNA molekülleri, büyük esnek yapıları nedeniyle hücrelerde çok yönlü moleküler işlevler gösterir. Protein gibi, RNA yapısı da üçlü konfigürasyon yapısına sahiptir; bunlar sırasıyla birincil, ikincil ve üçüncül yapılarıdır. Birincil yapı, RNA molekülü içindeki nükleik asitlerin dizisini ifade eder. İkincil yapı, Watson-Crick baz çiftlerini ve işlevsel lncRNA motiflerinin temel bileşenleri olduğu düşünülen eşleşmemiş bölgeleri içerir. Yaygın ikincil yapılar, dubleksleri, saç tokalarını, çıkıntıları, iç halkaları ve bağlantıları içerir ve bunlar çeşitli proteinler için bağlanma yerleri sağlayabilir. Protein kodlayan RNA'lar ve lncRNA'ların 3'UTR'si arasında yapısal özellikler ve sekans kompozisyonu açısından önemli benzerlikler gözlenir. lncRNA-protein etkileşimine ek olarak, lncRNA'lar potansiyel olarak küçük ligandlarla da etkileşime girer (Dahariya vd., 2019; C. H. Li ve Chen, 2013).



Şekil 2.9 KRK’de lncRNA’ların düzenleyici mekanizmaları. LncRNA’lar, KRK’nin proliferasyonunu, apoptozunu, farklılaşmasını, invazyonunu ve metastazını çeşitli yollarla düzenler: a) LncRNA’lar, kromatin modifikasyonu, DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunu indükler ve hedef genlerin epigenetik susturulmasına veya aktivasyonuna katkıda bulunur; b) LncRNA’lar miRNA’lara bağlanarak ve spesifik miRNA’ların hedef mRNA’larına bağlanmasını önleyerek gen ekspresyonunu düzenler, böylece hedef mRNA’ların ekspresyonunu düzenler; c) LncRNA’lar psödojen veya miRNA öncülleri olarak işlev görür; d) LncRNA’lar yapısal bileşenler olarak hizmet edebilir, protein aktivitesini modüle edebilir veya proteinlere bağlanarak protein lokalizasyonunu değiştirebilir (Xie vd., 2016).

KRK gelişiminde etkili genetik faktörlerin moleküler mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik son yıllarda oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular ncRNA’ların, KRK hastaları için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Chandra Gupta ve Nandan Tripathi, 2017). Sirküle long non coding RNA’lar bu anlamda KRK’li hastalarda biyobelirteç olmaya aday kodlamayan RNA’ların bir alt sınıfıdır. Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, miRNA ve lncRNA gibi circulating lncRNA’ların karsinomlarda tümör oluşumu, invazyon ve metastazın ilerlemesinde rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca, çok sayıda kanıt, bazı sirküle lncRNA’ların insan vücut sıvısında kararlı bir şekilde var olabileceğini desteklemektedir. Tüm bu veriler ışığında, circulating lncRNA’ların kanserin teşhisi ve prognozu için umut verici bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini göstermektedir (J. Li vd., 2018). Son yıllardaki çalışmalarda, KRK’de ekspresyon seviyeleri farklılık gösteren circulating lncRNA’lar tanımlanmış ve tümör gelişiminde etkili olduklarına dair önemli bulgular elde edilmiştir (J. Shi vd., 2015). Bu değişken ekspresyon seviyeleri circulating

lncRNA'ların, KRK'lerin prognozunda ve sağ kalımında yeni bir biyobelirteç olarak kullanılma olasılığını ortaya çıkarmıştır (Abedini vd., 2019; Ferracin vd., 2016).

Mevcut çalışmada incelenen aday sirküle lncRNA genleri aşağıdaki bölümde anlatılmaktadır.

2.10.1. ARHGAP5- Antisense 1 (Rho GTPase activating protein 5 antisense RNA 1) (ARHGAP5- AS1)

14q12'de lokalize 4396 bp uzunluğunda ve 6106 kDa moleküler ağırlığında ve 56 amino asitlik antisense sınıfında yeni tanımlanmış bir lncRNA'dır. Aynı zamanda *C14orf128* olarak da bilinir. Bu lncRNA geninin, 1 ekzon ve 1281 bp uzunluğunda bir transkriptten oluştuğu bildirilmiştir. Zhu ve ark.'nın çalışmasında *ARHGAP5-AS1*'in mide kanseri hücrelerinde ilaca direnci teşvik eden yeni bir kemoresistant olarak tanımlanmıştır. Aynı çalışmada bu lncRNA geninin kemoterapiye dirençli gastrik kanser hücrelerinde upregüle olduğu ve yüksek ekspresyon seviyelerinin kötü prognozla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (L. Zhu vd., 2019). Wang ve ark., metastatik meme kanseri hücre hattında *ARHGAP5-AS1* geninin ekspresyonu aşağı yönlü regüle ettiğini tespit etmişler ve meme kanseri metastazında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (C.-L. Wang vd., 2020).

2.10.2. LOC152578 (LINC01618)

LOC152578 lncRNA 4q12'de lokalize genomik büyüklüğü yaklaşık 25 kbp olan bir intergenik lncRNA'dır. Aynı zamanda *LINC01618* olarak bilinmektedir. Bu lncRNA'nın oluşturduğu transkript 5 ekzon ve 727 bp'den oluşmaktadır. Shi ve ark., mikroarray analizi ile KRK gelişiminde etkili olabilecek 3 tane aday lncRNA keşfetmişlerdir. Biyobelirteç olabilecek bu 3 lncRNA; *XLOC_006844*, *LOC152578* ve *XLOC_000303*'dir. Bu üç yeni lncRNA geninin KRK hastalarının plazmasında farklı ekspresyon seviyesi sergilediğini tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışma ile ilk kez lncRNA *LOC152578*'nin aşırı eksprese olduğunu ve plazmadaki lncRNA'nın KRK için yeni ve hızlı bir tanı biyobelirteci olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (J. Shi vd., 2015).

2.10.3. Small nucleolar RNA host gene 16 (SNHG16)

17q25.1 lokalize 235 kbp büyüklüğünde bir lncRNA genidir. Bu genin yirmi altı farklı transkribi bildirilmiş olup, her biri 473-3616 bp arasında değişen büyüklüğe sahiptir. Agresif nöroblastomda eksprese olan kodlamayan bir RNA

olarak bilinen *SNHG16* meme kanseri ve KRK gibi çeşitli kanserlerde potansiyel bir onkogen olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda erken evre pulmoner malignitede bir biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeli olabileceği bildirilmiştir (H. Zhu vd., 2017; Zimta vd., 2020). KRK'nin bütün evrelerinde ve adenomlarda upregüle olduğu bulunmuştur. *SNHG16* geninin ekspresyonunun, *WNT* sinyal yolağı üzerinde yer alan çeşitli transkripsiyon faktörler ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Christensen vd., 2016). X. Cao ve ark., mesane kanseri hücrelerinde *SNHG16*'nın aşırı eksprese olduğunu ve artmış tümör boyutu, ilerlemiş TNM evresi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (X. Cao, Xu ve Yue, 2018). Özofagus skuamöz hücreli karsinom hastalarında yapılan çalışmalarda, *SNHG16*'da ekspresyon artışı ve tümör evresi, lenf nodu metastazı ve klinik evre ile pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur. Bu durumun da kötü tam sağ kalımla ilişkili olduğu ve *SNHG16*'nın yüksek ekspresyonunun bu hastalarda kötü prognoz biyobelirteci olarak kullanılabileceği öngörülmektedir (G. Han vd., 2018; K. Zhang, Chen, Song ve Chen, 2018).

2.10.4. *ZNRF3* intronik transkript 1 (*ZNRF3-IT1*)

22q12.1'de lokalize yaklaşık 26 kbp büyüklüğünde ve sense intronik bir lncRNA genidir. Şu ana kadar tanımlanmış 674 bp büyüklüğünde bir transkripti bildirilmiştir. *ZNRF3-IT1*'in hedef genlerinden biri, transmembran E3 ubiquitin ligaz olan *ZNRF3*, endojen *WNT* proteinleri tarafından başlatılan β -katenin sinyalini baskılayarak *WNT* sinyal yolağının negatif düzenleyicilerinden biridir. *WNT* sinyal yolağının reseptör kompleksi ile ilişkilidir. Frizzled ve *LRP6* reseptörleri ile etkileşime girerek *WNT* sinyalini inhibe eder. *ZNRF3*'ün ekspresyonu ve işlevi mide adenokarsinomunda incelenmiş ve proliferasyonu baskıladığı ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Bazı çalışmalar, kolorektal karsinomda *ZNRF3*'ün stabilizasyonunun hücre proliferasyonunu inhibe edebileceğini ve *ZNRF3*'ün β -katenin hedef geni olarak davrandığını ve ubiquitinasyon aracılı bozunma yoluyla negatif geri besleme döngülerinde işlev gördüğünü bulmuştur (Hao vd., 2012; Wu vd., 2014). Bir başka çalışmada, *ZNRF3*'ün KRK'de *WNT*/ β -katenin/*TCF* yolağının baskılanması yoluyla bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceği ileri sürülmüştür (Yu vd., 2016).

2.10.5. Kolon kanseri ilişkili transkript-1 (CCAT1)

İlk olarak Nissan tarafından KRK'de bir onkogen olarak tanımlanmış, 2628 nt'lik 8q24.21'de lokalize bir lncRNA'dır (Nissan vd., 2012). Daha sonraki çalışmalar ile birçok genetik değişim ile ilgili bir bölge olduğu gösterilmiştir (Zhao, Song, Zhang, Kuerban ve Wang, 2015). Birçok malign kanserde anormal ekspresyonu gözlenen *CCAT1*'in KRK'in de dahil olduğu malign tümörlerin patogenezinde rol oynadığı bildirilmiş olup tümör oluşumu, metastaz gelişimi ve hastalığın evresi ile yakın ilişkili olduğu saptanmıştır (Ye, Zhou, Tian, Wu ve Li, 2015). Proliferasyon, invazyon ve migrasyonda etkili olduğu çalışmalar ile tespit edilmiştir (Alaiyan vd., 2013). Yapılan çalışmalarla, *CCAT1*'nin bir transkripsiyon faktörü olan *C-MYC*'e yakın bir yerde lokalize olduğu ve transkripsiyonunun *C-MYC* tarafından uyarıldığı ve bunun da kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonunu teşvik ettiği bulunmuştur. Ayrıca *CCAT1*'in miRNA'lar aracılığıyla kanser gelişimini desteklediği bildirilmiştir (C. Zhang, Wang, Lin, Xiao ve Tian, 2019). Örneğin; *CCAT1*'in aşırı ekspresyonunun, miR-490-3p, miR-218-5p ve miR-7 gibi miRNA'ları etkileyerek tümörögenезin başlamasını ve ilerlemesini aktive ettiği bildirilmiştir (You vd., 2019). Birçok çalışma, yüksek düzeylerde *CCAT1* ekspresyonunun insan kanserlerinin prognozu ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (D. Shi, Wu, Gao, Qing ve Shao, 2017).

2.10.6. Diferansiyel olarak eksprese edilen kolorektal neoplazi (CRNDE)

Yaklaşık 10.3 kb büyüklüğünde, kromozom 16q12.2'de *IRX5* geni yanında lokalize bir lncRNA geni olarak 2011 yılında keşfedilmiştir. *CRNDE* geni KRK, glioma, meme kanseri ve hepatik karsinom dahil olmak üzere bazı kanserlerde bir onkogen olarak tanımlanmıştır. Daha önceki çalışmalar, *CRNDE*'nin tümör hücrelerinde hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonun teşvik edilmesiyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese olduğu ve doku ve zaman spesifik ekspresyon özelliği sergilediği saptanmıştır (Ellis, Molloy ve Graham, 2012). Liu ve ark., ekzokrin *CRNDE* ekspresyonunun saptanmasının, KRK'in teşhisi ve prognozu için invaziv olmayan bir serum tümör belirteci olabileceğini öne sürmüştür. Aynı zamanda KRK gelişiminde önemli rolü olduğu ve kötü prognostik etki gösterdiğini bildirmiştir (Liu, Zhang, Gao, vd., 2016). *CRNDE* ekspresyonunun upregülasyonu, KRK hücrelerinde apoptozu inhibe ederken, proliferasyon, invazyon ve migrasyonu aktive ettiği gözlenmiştir (Ding vd., 2017).

Gao ve ark yaptıkları çalışma ile *CRNDE*'nin aşırı ekspresyonunun KRK hücrelerinin oksaliplatine direncini arttırdığını bildirmiştir (Gao vd., 2017). X.Bai ve ark. tarafından *CRNDE* 'nin *PI3K/AKT* sinyal yolunu etkileyerek bir onkogen gibi davrandığı ve ekspresyon seviyesi, invazyon derecesi, tümör nodu metastazı aşaması ve mide kanserinin lenf nodu metastazı ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca *CRNDE* 'nin miRNA'lar ile etkileşime girerek, hedef genin düzenlenmesini ve dolaylı olarak hedef genin ekspresyonunu etkileyebileceği gösterilmiştir. *CRNDE* lncRNA'nın, KRK progresyonunu invitro ve in vivo olarak yönlendirmede önemli bir rol oynadığı ve gelecekte KRK tedavisi için umut verici bir tanısal biyobelirteç haline gelebileceği öne sürülmüştür (Bai vd., 2020).

2.10.7. *XLOC_000303 (LINC01507)*

Yaklaşık 210 kbp büyüklüğünde ve 9q21.31'de lokalize, lncRNA *XLOC_000303* diğer adı *LINC01507* olan yeni tanımlanmış bir intergenik lncRNA'dır. Bu intergenik lncRNA'nın 8 farklı transkripti bildirilmiş olup bunların büyüklüğü 446-1027 bp arasında değişmektedir. Kolorektal kanserli hastaların plazma örneklerinde aşırı eksprese olduğu ve gelecekte KRK'de tümörögenез oluşumu tahmini için potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (J. Shi vd., 2015). Sun ve ark.'nın çalışmasında servikal kanserlerde upregüle olduğu ve servikal kanserde tümörögenез oluşumunu öngörmede potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Wenping Sun vd., 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Mevcut çalışmada ESOGÜ Tıp Fak. Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda kolon kanseri veya rektum kanseri tanısıyla Şubat 2007-Nisan 2021 tarihleri arasında takipli olan 65 hastanın plazma örneği dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak ESOGÜ Tıp Fak. Dahiliye Anabilim Dalı'na başvuran çalışma için uygun kriterleri taşıyan 31 bireyin plazma örneği çalışmaya alınmıştır. Kontrol grubunda yer alanların çoğunluğunu kolonoskopi sonucu normal gelen hastalar oluşturmaktadır. Çalışmamız ESOGÜ Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı almış (Etik kurul no:2019-349) ve ESOGÜ BAP 202011036 nolu proje kodu ile desteklenmiştir. Çalışmada, olgu ve kontrol grubu temelinde 3 grup olarak planlama yapılmıştır. Gruplar şu şekilde oluşturulmuştur;

1. Grup (Olgu grubu 1-Erken Evre): KRK evre I/II hastalarının plazma örnekleri 15 hasta
2. Grup (Olgu grubu 2-İleri Evre): KRK evre III/IV hastalarının plazma örnekleri 50 hasta (Ayrıca evre III/IV KRK 50 olgu grubundaki hastaların formalin ile sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) doku örnekleri *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* somatik varyant analizinde kullanılmıştır).
3. Grup (Kontrol grubu): Sağlıklı bireylerden oluşan 31 kişi

Bu çalışmada, KRK'de etkili olabilecek sirküle lncRNA'ları belirlemek amacıyla çeşitli lncRNA in silico veri tabanları (LNCipedia version 5.2 ve NONCODE v5, LncRNADisease v2.0 gibi) ve literatürde yapılan ilgili çalışmalar taranarak, aday sirküle lncRNA genleri saptanmıştır (Dong Lab, 2021; University, 2021). Bu veri tabanlarında circulating lncRNA, colorectal cancer, lncRNA, colon, rectum gibi anahtar kelimeler girilerek tarama yapılmıştır. Aynı zamanda belirlenen aday genlerin kolon ya da rektum doku/ plazma/serumdaki ekspresyon seviyeleri de göz önüne alınmıştır. Bu sirküle lncRNA genleri; *ARHGAP5- AS1*, *LOC152578*, *SNHG16*, *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE* ve *XLOC_000303* olarak belirlenmiştir.

3.1. Plazma Eldesi

Olgu ve kontrol grubundaki bireylerden EDTA'lı tüpe 3-5 ml periferik kan alınmıştır. Alınan bu kanlar 2 saat sonrasında 3000xrpm'de 15 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konularak

3000xrpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. Sonrasında tüm süpernatant temiz bir tüpe alınıp porsiyonlanarak RNA izolasyonu yapılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Burada plazma eldesi için Elyased ve ark. ve Herreco-Villanueva ve ark.'nın plazma elde etme yöntemi uyarlanarak kullanılmıştır (Elsayed, Salem, Darwish ve Fayed, 2018; Herreros-Villanueva vd., 2019).

3.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonunda "A.B.T. Blood/Tissue RNA Purification Kit for Leukemia" ticari kiti kullanılmıştır. RNA izolasyonu işlem basamakları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için kullanılan; Lizis Buffer (1 örnek için), Buffer L 500 µl ve Beta merkaptotanol (14,3 M) 10 µl olacak şekilde kullanılmıştır.

1. 10-20 mg dokuya 200 µl PBS (Ca Mg free), 10 µl Proteinaz K (20mg/ml), 500 µl LIZIS buffer ve 60 mg zirkonyum bead eklenmiştir ve homojenizatörde homojenize edilmiştir.
2. Homojenizat yeni bir 2 ml'lik santrifüj tüpüne aktararak 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3. Üzerine 500 µl Buffer P eklenerek vortekslenmiş ve 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Karışımın üzerine 200 µl Kloroform izoamilalkol (49:1) karışımı eklenmiştir. Alt-üst edilerek karıştırılmıştır ve oda sıcaklığında 2 dk daha bekletilmiştir.
5. Karışım 4°C'de 12000xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası en üstte bulunan sıvı fazdaki süpernatant (yaklaşık 600 µl) yeni bir tüpe aktarılmıştır.
6. Üzerine 1.25 kat etanol (%96-100) eklenmiştir (yaklaşık 800 µl) ve pipetlenerek karıştırılmıştır.
7. 700 µl lizat kolona transfer edilmiştir ve oda sıcaklığında 12000xg' de 20 sn santrifüj edilmiştir. Tüp dökülerek kolon tekrar tüpün içerisine yerleştirilmiştir. Tüm lizatlar kolona transfer edilinceye kadar bu basamak tekrarlanmıştır.
8. Kolonun üzerine 700 µl wash buffer1 solusyonu eklenmiştir, oda sıcaklığında 12000xg' de 20 sn santrifüj edilmiştir. Tüp dökülerek kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirilmiştir.

9. Kolonun üzerine 600 µl Wash Buffer 2 solüsyonu eklenmiştir, oda sıcaklığında 12000xg' de 20 sn santrifüj edilmiştir, tüp dökülüp kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirilmiştir.
10. Kolonun üzerine 600 µl Wash Buffer 2 solüsyonu eklenmiştir, oda sıcaklığında 12000xg' de 20 sn santrifüj edilmiştir. Tüp dökülmüş ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirilmiştir.
11. Kolon tekrar 1 dakika maksimum hızda santrifüj edilmiştir ve kolon 1,5 ml'lik eppendorf tüpün üzerine yerleştirilmiştir.
12. Kolonun merkezine 50-100 µl, 65-70°C'de bekletilmiş nükleaz free, ultra distile su veya DEPC'li su eklenmiştir, oda sıcaklığında 12000xg' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
13. Elde edilen RNA kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.3. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'ların nanodrop cihazında ölçümü yapılmıştır. Her bir örnek 20 ng olacak şekilde gerekli hesaplamalar yapılarak reaksiyon kurulmuştur. Elde edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi için "RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" ticari kiti kullanılmıştır. cDNA sentez aşamaları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.1 ve 3.2).

3.3.1. Total RNA örneklerinden genomik DNA'nın uzaklaştırılması

RNase-free tüpün içerisine aşağıdaki tabloda 3.1'de gösterilen reaksiyon bileşenleri eklenerek 37°C 30 dk inkübe edilmiştir. Üzerine 1 µl 50 mM EDTA eklenmiş ve 65°C 10 dk inkübe edilmiştir. Hazırlanan RNA, reverse transkriptaz işlemi için kullanılır haldedir.

Tablo 3.1 Total RNA örneklerinden genomik DNA'nın uzaklaştırılması

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
RNA	1 µl
MgCl ₂ içeren 10X Reaction Buffer	1 µl
DNase I, RNase-free	1 µl
Nukleaz free su	Üzeri 10 µl olacak şekilde tamamlanır
Total volume	10 µl

3.3.2. First Strand cDNA sentezi

Kit bileşenleri çözündükten sonra miks kısa süre santrifüj edilmiş ve buz üzerine alınmıştır. Sonrasında aşağıda anlatılan işlem basamakları uygulanmıştır.

1. Aşağıdaki tablo 3.2'de belirtilen reaktifler belirtilen sırada buz üzerinde steril, nukleaz free bir tüpe eklenmiştir.

Tablo 3.2 First strand cDNA sentezi aşama 1 kurulum bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
Template RNA (total RNA)	0,1 ng-5 µg
Random Hexamer primer	1 µl
Nukleaz free su	12 µl olacak şekilde miksin üzerine eklenir.
Toplam volume	12 µl

2. Miks yavaşça pipetaj yapılarak kısa bir santrifüj edilmiş ve 65°C 5 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında bu miks buz üzerine alınmıştır.
3. Üzerine aşağıdaki tablo 3.3'deki bileşenler sırasıyla eklenmiştir. Reaksiyona girilen örnek sayısı ile bileşenler çarpılarak 1.5 mL lik ependorf tüpte 9 µl miks hazırlanmıştır. Hazırlanan 9 µl miks eşit bir şekilde kuyucuklara dağıtılmıştır.

Tablo 3.3 First strand cDNA sentezi aşama 2 kurulum bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Miktar (µl)
5x Reaksiyon Buffer	4 µl
Ribolock RNase inhibitör (200/U/ µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT(200/U/ µl)	1 µl
Total volume	20 µl

4. Miks yavaşça pipetaj ve kısa bir santrifüj edilmiştir. Random hexamer primeri kullanılarak 25°C’de 5 dk, 42°C’de 60 dk 70°C’de 5 dk ve 4°C ∞ inkübe edilmiştir.
5. Elde edilen reverse transkripsiyon ürünü kullanılıncaya kadar -80°C’de saklanmıştır.
6. Kullanılan primerler üretici firmanın önerdiği şekilde sulandırılmış ve hazırlanan stok primerler 10 µM olacak şekilde dilüsyon edilmiştir.

3.3.3. First Strand cDNA ürünlerinin kontrol reaksiyonları

First strand cDNA sentezi ürünlerinin sonuçlarını doğrulamak için pozitif ve negatif kontrol reaksiyonları kullanılmıştır. Bu aşamada kullanılan negatif kontrol first strand cDNA ürününün genomik DNA kontaminasyonunu değerlendirmek için kullanılmıştır. Kullanılan bir diğer kontrol ise NTC (DNA içermeyen örnek)’dir. NTC first strand cDNA ürünündeki reaktif kontaminasyonunu değerlendirmek için kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak da kitin içerisinde yer alan GAPDH kontrol RNA’sı kullanılmıştır. First strand cDNA sentez reaksiyonu kontrolü aşağıdaki tablo 3.4’de belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Steril nukleaz free bir tüpün içerisine reaktifler belirtilen sırayla eklenmiştir. Bu işlem buz üzerinde yapılmıştır.

Tablo 3.4 First strand cDNA sentezi kontrol reaksiyonu kurulum bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Miktar (μl)
Kontrol GAPDH RNA (50 ng/μl)	2 μl
Random Hexamer primer	1 μl
5x Reaksiyon Buffer	4 μl
RiboLock RNase inhibitör (20 U/μl)	1 μl
10 mM dNTP miks	2 μl
RevertAid RT (200 U/μl)	1 μl
Nukeaz free su	9 μl
Toplam hacim	20 μl

2. Miks yavaşça pipetaj yapılarak kısa bir santrifüj edilmiştir. Sonrasında PCR amplifikasyon kontrol reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları 25°C’de 5 dk 42°C’de 60 dk 70°C’de 5 dk
3. Kontrol first strand cDNA sentez ürünü 1:1000 nukleaz free su ile dilusyon edilmiştir. Reaktifler çözüldükten sonra yavaşça vorteks ve kısa bir santrifüj edilmiştir.
4. Reaksiyon bileşenleri aşağıdaki tablo 3.5’deki gibi bir tüpün içerisinde birleştirilmiştir. Bu işlem buz üzerinde yapılmıştır.

Tablo 3.5 PCR amplifikasyon ürünün kontrol edilmesi

Reaksiyon bileşenleri	Miktar (µl)
Kontrol RT reaksiyon ürünü cDNA (1:1000 dilsyon edilmiş)	2 µl
10x PCR buffer	5 µl
10 mM dNTP miks	1 µl (0,2 mM)
25 mM MgCl ₂	3 µl
GAPDH forward primer	1,5 µl
GAPDH reverse primer	1,5 µl
Taq DNA Polimeraz (5 U/µl)	0,5 µl
Nukleaz free su	35,5 µl
Toplam hacim	50 µl

5. Oluşturulan miks PCR cihazında aşağıdaki protokol ile kurulum yapılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6 PCR amplifikasyon kontrol PCR kurulum şartları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94	3 dk	1x
Denatürasyon	94	30 sn	35x
Annealing	58	30 sn	
Extension	72	45sn	

3.4. Ekspresyon Analizi

cDNA eldesi yapılan örnekler CFX96 Real-Time PCR cihazında ekspresyon çalışmasına alınmıştır. Her bir örnek, belirlenen 7 aday sirküle lncRNA ve 1 housekeeping gen açısından değerlendirilmeye alınmıştır. Örneklerin her biri duplike olarak çalışılmış olup çıkan sonuçların ortalaması alınmıştır. Gen ekspresyon

durumları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplama yöntemine göre değerlendirilmiştir. Ekspresyon analizinde kullanılan primer çiftleri tablo 3.7’de gösterilmiştir. Kullanılan primerler firmanın önerdiği şekilde sulandırılmıştır. Hazırlanan stok primerler 10 μ M olacak şekilde dilüsyon edilmiştir. Ekspresyon çalışmasında izlenen protokol tablo 3.8’de anlatıldığı gibi her bir örnek için uygun miktarlar kullanılarak miks hazırlanmış ve 96 kuyucuklu plate konularak üzeri sealing ile kapatılmıştır. Sonrasında tablo 3.9’da gösterildiği şekilde PCR koşulları cihaza tanımlanarak reaksiyon başlatılmıştır.

Ayrıca CEA ve CA 19-9 tümör belirteçlerinin serum örneklerindeki antikor seviyelerini değerlendirmek için Elektro-Kemilüminesans Immunoassay (ECLIA) yöntemi kullanılarak rutin olarak çalışmaları yapılmıştır.

Tablo 3.7 Kullanılan primer dizileri

Gen Adı	Forward Primer Dizisi (5'→3')	Reverse Primer Dizisi (5'→3')
<i>CCAT1</i>	CCTGGGCCACAAATCAACAA	TTGAGAAGGGGTGAAGGGAC
<i>CRNDE</i>	TTTCCGGAGTAGAGCCCTTG	CTCCTCCTTCCAATAGCCAGT
<i>LOC152578</i> (<i>LINC01618</i>)	AGCTCCTCACTTCTTGGCTT	AGAGCCGGTATTGCAGTTCA
<i>XLOC_000303</i> (<i>LINC01507</i>)	ACCTTGCAACACTCTCTGGA	TCCAACCTCTTCAGCTCCAG
<i>ARHGAP5-AS1</i> (<i>C14orf128</i>)	TCAGCTTCCCTCTTTCTCCG	GTTCCCTTGCAGTACGGTGG
<i>SNHG16</i>	TGCGTTCTTTGGGCTTCATC	CAATCCTTGCAGTCCCATCG
<i>ZNRF3-IT1</i>	GATGTGGAGAGAGGAAGGGG	TCATCTCTAGCCCTGACCCT
<i>BETA-ACTIN</i>	GCCAACTTGTCTTACCCAGA	AGGAACAGAGACCTGACCCC

Tablo 3.8 Real-Time PCR reaksiyon kurulum bileşenleri

Kimyasal Bileşenler	Miktar(μl)
SYBR Green Master mix	10
cDNA ürünü	2
Primer	2
ddH ₂ O	6
Toplam miktar	20

Tablo 3.9 Real-Time PCR kurulum şartları

Aşama	Sıcaklık değeri (°C)	Zaman	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	10 dk	1x
Denatürasyon	95	15 sn	40x
Annealing/Extension	60	60 sn	

3.5. FFPE Dokulardan *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* Somatik Varyant Analizi

3.5.1. FFPE dokudan DNA izolasyonu

Parafinli tümörlü doku kesitlerinden (FFPE) DNA izolasyon işlem basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işlemi sırasında "QIAamp DNA FFPE Tissue Kit-50 Test (QIAGEN, Hilden, Germany)" ticari kiti kullanılmıştır.

1. Parafinli doku örneği ependorf tüpe konulmuştur. Üzerine 1200μl ksilol eklenmiştir. 15 sn vorteks yapılmıştır ve 14.000xrpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmıştır.
2. Dokunun üzerine 1200μl ksilol eklenmiştir. 15 sn vorteks yapılmıştır ve 14.000xrpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmıştır.
3. Pelet üzerine süzölmüş 1200μl %70'lik etanol eklenip vorteks yapılmıştır ve 14.000x rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmıştır.

4. Pelet üzerine süzölmüş 1200µl %70'lik etanol eklenip vorteks yapılmıştır ve 14.000xrpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmıştır. Bu şekilde deparafinize işlemi gerçekleştirilmiştir.
5. Peletin üzerindeki alkol tamamen alınmış ve alkolün giderilmesi için örnek oda ısısında inkübe edilmiştir.
6. Sonrasında peletin üzerine 180 µl buffer ATL ve 20 µl Proteinaz K eklenmiştir, vorteks yapılmıştır, 56°C'de su banyosunda pelet lizat oluşturuncaya kadar inkübe edilmiştir. Gerektiğinde bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
7. İnkübasyon sonrasında 200 µl buffer AL eklenmiştir ve 70°C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
8. Örneğin üzerine 200 µl %96-100'lük etanol eklenmiş ve 15 sn vortekslenmiştir. Ependorftaki örnek spin kolona aktarılmıştır.
9. 10.000xrpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Altteki toplama tüpü atılmıştır. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
10. Üzerine 500 µl buffer AW1 eklenmiştir. 10.000xrpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Altteki toplama tüpü atılmıştır. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
11. Üzerine 500 µl buffer AW2 eklenmiştir. 14.000xrpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Altteki toplama tüpü atılmıştır. Spin kolon yeni bir ependorf tüpüne yerleştirilmiştir.
12. Üzerine 200 µl buffer AE eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. 10.000xrpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Spin kolon atılmıştır. Ependorf içerisindeki DNA kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.5.2. FFPE dokulardan KRAS ve NRAS somatik varyant analizi

FFPE dokulardan elde edilen DNA'lar *KRAS* ve *NRAS* genlerindeki somatik varyantlar açısından "EntroGen RAS Mutation Screening Panel Real-Time PCR" ticari kiti (EntroGen) kullanılarak değerlendirilmiştir. FFPE dokudan Real-Time PCR işlem basamakları şu şekilde gerçekleştirilmiştir;

1. Real-Time PCR (RT-PCR) reaksiyon için miks hazırlama kurulumu tablo 3.10'da verilmiştir. Her bir örnek için 8 ayrı reaksiyon miksi hazırlanmıştır.

Hazırlanan bu mikslar 96'lık plate içerisine her bir örnek için 8 kuyucuk olacak şekilde toplam 21 µl olarak dağıtılmıştır. Bu kuyucukların üzerine 9 µl örnek (DNA) eklenmiştir. Çalışma için kullanılan DNA örneklerinin konsantrasyonları 10-30 ng arasına ayarlanmıştır. Her bir reaksiyonda aynı zamanda Pozitif ve Negatif Kontrol kullanılmıştır. Plate üzeri sealing ile kapatılmıştır.

Tablo 3.10 *KRAS* ve *NRAS* geni RT-PCR reaksiyon kimyasal bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Volume
2x PCR reaction mix	15 µl
Primer mix (1-8)	6 µl
DNA örneği	10-30 ng (9 µl)
ddH ₂ O	Toplam reaksiyon miktarı 30 µl olacak şekilde eklenir.

2. Oluşturulan plate RT- PCR LightCycler 480 I (Roche) cihazında PCR işlemi için aşağıdaki tablo 3.11'de belirtilen PCR programı uygulanmıştır.

Tablo 3.11 *KRAS* ve *NRAS* geni RT- PCR kurulumu

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
95°C	10 dk	1 x
95°C	15 sn	40 x
60°C	60 sn	

3. Kullanılan ticari kit 8 ayrı primer prob miksinden oluşmaktadır. Bu primer prob miksların 5 tanesi *KRAS* ve 3 tanesi de *NRAS* genindeki somatik varyantlara özgüdür. *KRAS* ve *NRAS* genlerinde bakılan ilgili ekzon ve kodon bölgeleri ve somatik değişimler aşağıda tablo 3.12'de verilmiştir.

Tablo 3.12 *KRAS* ve *NRAS* somatik varyantların lokalizasyonları

Gen	Ekzon	a.a değişimi	nt değişimi	Cosmic ID
<i>KRAS</i>	2	G12A	c.35G>C	522
		G12D	c.35G>A	521
		G12R	c.34G>C	518
		G12V	c.35G>T	520
		G13D	c.38G>A	532
		G12C	c.34G>T	516
		G12S	c.34G>A	517
	3	Q61H	c.183A>T	555
		Q61H	c.183A>C	554
		Q61L	c.182A>T	553
		Q61R	c.182A>G	552
		A59E	c.176C>A	547
		A59G	c.176C>G	28518
		A59T	c.175G>A	546
	4	K117N (AAC)	c.351A>C	19940
		K117N (AAT)	c.351A>T	28519
		K117R	c.350A>G	1178068
		K117E	c.349A>G	1360831
		A146T	c.436G>A	19404
		A146P	c.436G>C	19905
		A146V	c.437C>T	19900
<i>NRAS</i>	2	G12D	c.35G>A	564
		G12C	c.34G>T	562
		G12S	c.34G>TA	563
		G13R	c.37G>C	569
		G13V	c.38G>T	574
	4	K117R	c.350A>G	-
	3	Q61H (CAC)	c.183A>C	585
		Q61H (CAT)	c.183A>T	586
		Q61L	c.182A>T	583
		Q61K	c.181C>A	580
		Q61R	c.182A>G	584
	3 ve 4	A146T	c.436G>A	1237325
		A59D	c.176C>A	253327
		A59T	c.175G>A	578

3.5.3. *KRAS* ve *NRAS* somatik varyant analizinde kullanılan testin analitik prensibi

Ras somatik varyant analizi RT-PCR testi Allel spesifik PCR (ASO-PCR) temeline dayanılarak yapılmıştır. ASO-PCR’de, genin mutant varyantlarına % 100 komplementer olan primerler kullanılmıştır. DNA polimeraz, yalnızca tamamen komplementer olan şablon DNA içeren bölgeleri çoğaltır. Çoğu tümör numunesi, genin yabanıl ve mutant varyantlarının bir karışımını içerir (örn; *KRAS* ve *NRAS* gibi). Yapılan test aynı zamanda, amplifikasyon için yeterli miktarda DNA’nın mevcut olup olmadığını kontrol etmek için bir endojen kontrol genini de (*GAPDH*) çoğaltır.

Amplifikasyon ürününün tespiti, floresan hidroliz problemleri kullanılarak yapılır. Her prob, 5’ uçta bir florofor (FAM veya VIC) ve 3’ uçta bir söndürücü içerir. Problar ilgili bölgelere tamamlayıcıdır ve şablon DNA’ya hibridize olur. Amplifikasyon işlemi sırasında, DNA polimeraz floroforu ve söndürücüyü probdan ayırır. Söndürücüden ayrıldıktan sonra, floresan sinyalinde artış olur ve bu sinyal RT-PCR cihazının dedektörleri tarafından algılanır.

KRAS ve *NRAS* genlerine komplementer olan problar, FAM florofor ile işaretlenirken, endojen kontrol genini tamamlayıcı prob VIC florofor ile işaretlenir. VIC işaretli probdan gelen sinyal, reaksiyonda yeterli amplifiye edilebilir DNA şablonu olduğunu gösterirken, FAM floroforundan gelen bir sinyal, bir mutasyonun varlığını gösterir. Kullanılan testin analizi ve yorumlanması aşağıdaki tablo 3.13’de gösterilmektedir.

Tablo 3.13 *KRAS* ve *NRAS* geni RT-PCR sonuçlarının analizi

VIC Ct Değeri	FAM Ct Değeri	Sonuç ve Yorum
<25 ve 0 değil ise	Değer yok ya da >38,5	İlgili varyant açısından negatif
<25 ve 0 değil ise	<37,5	İlgili varyant açısından pozitif
25-30 arasında	Değer yok ya da >38,5	İlgili varyant açısından negatif
25-30 arasında	<38,5	İlgili varyant açısından pozitif
>30 ya da değer yok	<38,5	İlgili varyant açısından pozitif

3.5.4. FFPE dokulardan *BRAF* somatik varyant analizi

FFPE dokulardan elde edilen DNA’lar *BRAF* genindeki somatik varyantlar açısından "EntroGen *BRAF* Mutation Screening Panel Real-Time PCR" ticari kiti (EntroGen) kullanılarak değerlendirilmiştir. FFPE dokudan RT-PCR işlem basamakları şu şekilde gerçekleştirilmiştir;

1. RT-PCR reaksiyon için miks hazırlama kurulumu tablo 3.14’de verilmiştir. Her bir örnek için 5 ayrı primer için reaksiyon miksi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu mikslar 96’lık plate içerisine her bir örnek için 5 kuyucuk olacak şekilde toplam 21 µl olarak dağıtılmıştır. Bu kuyucukların üzerine 9 µl örnek (DNA) eklenmiştir. Çalışma için kullanılan DNA örneklerinin konsantrasyonları 10-20 ng arasına ayarlanmıştır. Her bir reaksiyonda aynı zamanda Pozitif ve Negatif Kontrol kullanılmıştır. Plate üzeri sealing ile kapatılmıştır.

Tablo 3.14 *BRAF* geni RT-PCR reaksiyon kimyasal bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Volume
2x PCR reaction mix	15 µl
Primer mix (V600E/D/K/M/R)	6 µl
DNA örneği	10-20 ng (9 µl)
ddH ₂ O	Toplam reaksiyon miktarı 30 µl olacak şekilde eklenir.

2. Oluşturulan plate RT- PCR LightCycler 480 I (Roche) cihazında PCR işlemi için aşağıdaki tablo 3.15’de belirtilen PCR programı uygulanmıştır.

Tablo 3.15 *BRAF* geni RT-PCR kurulumu

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
95°C	10 dk	1 x
95°C	15 sn	40 x
60°C	30 n	

3. Kullanılan ticari kit 5 ayrı primer prob miksinden oluşmaktadır. Bu primer prob miksler *BRAF* genindeki V600E/D/K/R/M somatik varyantlarına özgüdür. *BRAF* geninde bakılan ilgili ekzon ve kodon bölgeleri ve somatik değişimler aşağıda tablo 3.16’da verilmiştir.

Tablo 3.16 *BRAF* genindeki somatik varyantların lokalizasyonları (COSMIC ID:Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer Identity)

Gen	Ekzon	aa Değişimi	nt Değişimi	Cosmic ID
<i>BRAF</i>	15	V600E	c.1799T>A	476
		V600D	c.1799_1800TG>AT	477
		V600K	c.1798_1799GT>AA	473
		V600M	c.1798G>A	1130
		V600R	c.1798_1799GT>AG	474

3.5.5. *BRAF* somatik varyant analizinde kullanılan testin analitik prensibi

Bu analizde *BRAF* geninin ekzon 15'indeki somatik varyantları tespit etmek için RT-PCR kullanılmıştır. Test, mutant ve yabani tip DNA'nın bir karışımını içeren örneklerde mutanta özgü dizileri amplifiye ederek çalışır. Testte ayrıca, amplifikasyon için yeterli miktarda DNA'nın mevcut olup olmadığını tespit etmek için bir internal kontrol geni (*GAPDH*) de amplifiye edilir.

Amplifikasyon ürününün tespiti, floresan hidroliz problemleri kullanılarak yapılır. Her bir prob, 5' uçta bir florofor (FAM veya VIC) ve 3' uçta bir söndürücü içerir. Problemler ilgili bölgelere komplementerdir ve şablon DNA'ya hibridize olur. Amplifikasyon işlemi sırasında, DNA polimeraz floroforu ve söndürücüyü probdan ayırır. Söndürücüden ayrıldıktan sonra, floresan sinyalinde artış olur ve bu sinyal RT-PCR cihazının dedektörleri tarafından algılanır.

BRAF genine komplementer (tamamlayıcı) olan problemler FAM florofor ile işaretlenirken, internal kontrol genine komplementer (tamamlayıcı) prob VIC florofor ile işaretlenir. VIC işaretli probdan gelen sinyal, reaksiyonda yeterli amplifiye edilebilir DNA şablonu olduğunu gösterirken, FAM florofordan gelen sinyal, bir mutasyonun varlığını gösterir. Kullanılan testin analizi ve yorumlanması aşağıdaki tablo 3.17'de gösterilmektedir.

Tablo 3.17 *BRAF* geni RT-PCR sonuçlarının analizi

VIC Ct Değeri	FAM Ct Değeri	Sonuç
0 < Ct < 26	Ct > 37,0	İlgili varyant açısından negatif
0 < Ct < 26	0 < Ct < 36,5	İlgili varyant açısından pozitif
26 ≤ Ct ≤ 31	37,0 < Ct; Ct=0	İlgili varyant açısından negatif
26 ≤ Ct ≤ 31	Ct ≤ 37,0	İlgili varyant açısından pozitif
Ct > 31; Ct=0	Ct ≤ 37,0	İlgili varyant açısından pozitif

3.6. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

- -20°C buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- -80°C buzdolabı (Panasonic MDF-U5386S-PE, Ultra- Low Tempature Freezer, Panasonic Healthcare Co, Ltd, Sakata, Oizumi, Machi, Japan)
- +4°C buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Real-Time PCR cihazı-LightCycler 480 I Authorized Thermal Cyclers (Roche Diagnostics, Applied Science, Roche, Switzerland) ve CFX96 Real-Time System (BIO-RAD, C1000 Touch Thermal Cyclers, Bio-Rad Laboratories, Inc, California, USA)
- Mikrosantrifüj (MIKRO 120, Hettich Zentrifugen, Germany)
- Soğutmalı santrifüj (AllegraX-30R Centrifuge, Beckman Coulter, USA)
- Su banyosu (NB9, Nüve, Türkiye)
- Vorteks (Heidolph Reax Control, Germany)
- Nanodrop spektrofotometre (NANODROP 1000 Spectrophotometer, peQLab Biotechnologie, GmbH, Erlangen, Germany)
- Qubit 3 Fluorometer (Invitrogen, by Thermo Fisher Scientific, Malaysia)
- PCR Cihazı (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Singapore ve Applied Biosystems™ MiniAmp™ Thermal Cyclers, California, USA)
- Plate santrifüj (Laboratory Centrifuge, LMC-3000, Biosan, Latvia)
- Mikropipet seti (10-100-200-1000 µl) (Corning Lambda Plus, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany)
- Mikrosantrifüj tüpleri (2,0 ml) (Qiagen, Hilden, Germany)
- PCR tüpleri (0,5 ml) (Treff Lab, Switzerland)
- Proteinaz K (Thermo Scientific™ Proteinase K, recombinant, PCR grade, EO0491, Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania)
- Beta Merkaptotanol (M3148 Sigma-Aldrich 2-Mercaptoethanol, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

- Kloroform İzooamilalkol (Merck Isoamyl Alcohol, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-100 rxns (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lithuania)
- RAS-RT50 kit (TaqMan probe seti) (EntroGen, Woodland Hills, CA, USA)
- BRAFX-RT64 kit (TaqMan probe seti) (EntroGen, Woodland Hills, CA, USA)
- Steril mikro pipet uçları (10-100-200-1000 µl) (BIOFIL, ZEROTIP, Guangzhou, China)
- 96 kuyucuklu PCR plate (LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white, USA)
- PCR plate uygun optikal sealing film (LightCycler 480 Sealing Foil, USA)
- %70 ve %100 etanol (Tarımsal amaçlı etil alkol, Antalya, Türkiye)
- Steril tek kullanımlık eldiven (Beybi, Power-Free Nitrile Examination Gloves, İstanbul, Turkey)
- Distile su (Thermo Scientific™ Water, Nuclease-free, Molecular Biology Grade, Ultrapure, Thermo Fisher Scientific Inc, California, USA)
- Ksilol (p-Xylene, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- PBS (Gibco PBS, pH 7.2, Thermo Fisher Scientific Inc, California, USA)
- FFPE dokudan DNA izolasyonunda QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Buffer ATL, Proteinaz K, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AE) (Qiagen, Hilden, Germany)
- RNA izolasyon kiti- A.B.T.™ Blood/Tissue RNA Purification Kit for Leukemia, I04-01-10 100 preps (Atlas Biyoteknoloji Laboratuvar Malzemeleri San. Ve Tic. Ltd. Şti, Ankara, Türkiye)
- Spin kolon filtreler ve toplama tüpleri (2ml) (Qiagen, Hilden, Germany)
- Real Time PCR Master Mix-SYBR Green primer seti (Thermo Scientific™ Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), Thermo Fisher Scientific Inc, California, USA)

4. BULGULAR

Çalışmaya ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim dalında kolon ve rektum kanseri tanısıyla tedavi gören 65 hasta ve 31 kontrol dahil edilmiştir. Bu hastaların yaş ortalaması 62,6 (25-80) idi. Hastaların % 61,53'ü kolon kanseri % 38,46'sı rektum kanseri tanısı almış ve % 83,07'si opere edilmiş iken % 16,92'si opere edilmemiştir. Histopatolojik özelliklerine göre hastaların % 93,8'i adenokarsinom, % 3,1'i taşlı yüzük komponentli adenokarsinom ve % 3,1'i müsinöz komponentli adenokarsinom olarak saptanmıştır. TNM Evreleme sistemine göre ise hastaların, %6,15'i evre I, %16,92'si evre II, %9,23'ü evre III ve %67,69'u evre IV olarak tanı almıştır. Cinsiyet dağılımı açısından olgu grubunun %61,5'i erkek ve %38,5'i kadın, kontrol grubunun ise %51,6'sı erkek ve %48,4'ü kadın idi. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubunun klinik karakteristikleri tablo 4.1'de gösterilmektedir.

Çalışmaya dahil edilen 65 hasta ve 31 kontrolden alınan plazma örnekleri 7 aday sirküle lncRNA açısından ekspresyon analizine tabi tutulmuştur. Bu sirküle lncRNA genleri sırasıyla, *ARHGAP5-AS1*, *LOC152578*, *SNHG16*, *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE* ve *XLOC_000303*'dür. Referans gen olarak β -actin kullanılmıştır. Her örnek duplike olarak çalışılmıştır. Ekspresyon çalışmasında relatif gen ekspresyon $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak hedef genlerin referans gene kıyaslanarak ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001).

4.1. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi IBM SPSS 21 paket programı ile yapılmıştır. Nitel değişkenlere ait özet değerler frekans ve yüzde, nicel değişkenlerde ise ortalama±standart sapma ya da medyan (Q1-Q3) olarak gösterilmiştir. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılan değişkenlerde iki grup karşılaştırılması t testi ile, dağılmayan durumlarda ise Mann Whitney U testi ile yapılmıştır. Nitel değişkenler arasındaki ilişki Ki Kare analizleri, nicel değişkenler arasındaki ilişki ise Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. CEA ve CA 19-9 serum seviyelerinin tanı ve prognozda elde edilen nitel değişkenler arasındaki farklılık McNemar testi ile incelenmiştir. Hasta ve kontrol gruplarını ayırsamada kullanılması önerilen lncRNA ekspresyonlarının ayırsama güçleri olan eğri altında kalan alanlar (AUC), duyarlılık

(sensivite) ve özgüllük (spesifite) değerleri Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi ile değerlendirilmiştir. Tanı süresine ait sağ kalım analizi değerlendirmeleri ve yaşam fonksiyonları grafikleri Kaplan-Meier yöntemi ile elde edilmiştir. Analiz sonucu istatistiksel olarak $p<0,05$ olan durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 4.1 Kolorektal kanserli hastalar ve kontrol grubunun klinik karakteristikleri. Ki-Kare analizi ile değerlendirilmiştir. * $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Değişken	Klinik Parametre	Hasta Grubu (n) (%)	Kontrol Grubu (n) (%)	P Değeri
Cinsiyet	Erkek Kadın	40 (%61,5) 25 (%38,5)	16 (%51,6) 15 (%48,4)	0,483
Yaş	≤50 >50	9 (%13,8) 56 (%86,2)	4 (%12,9) 27 (%87,1)	0,343
Tanı Yaşı	≤50 >50	11 (%16,92) 54 (%83,08)		0,5
TNM Evresi	I II III IV	4 (%6,2) 11 (%16,9) 6 (%9,2) 44 (%67,7)		
Tümör Grade	Kötü Differansiye Orta Differansiye İyi Differansiye	1 (%1,5) 57 (%87,7) 7 (%10,8)		
Histolojik Tip	Adenokarsinoma Taşlı Yüzük Komponentli Adenokarsinom Müsinöz Komponentli Adenokarsinom	61 (%93,8) 2 (%3,1) 2 (%3,1)		
Tanı	Kolon Rektum	40 (%61,5) 25 (%38,5)		
Metastaz Yeri	Akciğer Karaciğer Peritonitis Karsinomatoza Lenf Nodu Beyin Kemik Metastaz Yok	23 25 3 17 1 6 24		
Lenfovasküler İnvazyon (LVI)	Var Yok Bilinmeyen	28 (%43,1) 34 (%52,3) 3 (%4,6)		
Perinöral İnvazyon (PNI)	Var Yok Bilinmeyen	15 (%23,1) 47 (%72,3) 3 (%4,6)		
Primer Tümörün Lokalizasyonu	Sağ Kolon Sol Kolon	17 (%26,2) 48 (%73,8)		
Primer Tümör Opere	Evet Hayır	53 (%81,5) 12 (%18,5)		
Tümör Size	≤ 5 cm >5 cm	59 (%90,8) 6 (%9,2)		
Tedaviye Yanıt	Tam Yanıt Parsiyel Yanıt Stabil Hastalık Progrese	1 (%1,5) 57 (%87,7) 5 (7,7) 2 (%3,1)		
Neo Adjuvan Tedavi	Hayır Evet	27 (%41,54) 38 (%58,46)		
Sağ Kalım	Sağ Ölü	60 (%92,3) 5 (%7,7)		

Aday sirküle lncRNA genleri klinik parametreler açısından değerlendirdiğimizde, tümör farklılaşması ile *CRNDE* lncRNA ekspresyon seviyesi ($p=0,023$) arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Primer tümör yerleşim yeri ile *CRNDE*

lncRNA ekspresyon seviyesi ($p=0,009$) arasında ilişki olduğu bulunmuştur (Tablo 4.2). Tümör boyutu ile *CCAT1* ($p=0,021$), *CRNDE* ($p=0,010$) ve *SNHG16* ($p=0,023$) lncRNA ekspresyon seviyesi arasında ilişki olduğu gözlenmiştir. Metastaz varlığı ile *XLOC_000303* lncRNA ekspresyon seviyesi arasında ($p=0,016$) güçlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Çalışmada yer alan 65 olgunun neo/adjuvan tedavi alma durumları ile aday sirküle lncRNA genlerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.2. Olgu grubunda yer alan KRK hastalarının, primer tümör yerleşim yeri ile aday lncRNA'ların ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması ($p<0,05$). Analizler t testi ve Mann-Whitney testi ile değerlendirilmiştir.

	PRİMER TÜMÖR LOKALİZASYONU				
	SAĞ KOLON (n=17)		SOL KOLON (n=48)		
circulating lncRNA Adı	Ortalama±SS	Median (%25-%75)	Ortalama±SS	Median (%25-%75)	P değeri
ARHGAP5-AS1	-11,98±37,67	-19,36 (-29,41-6,54)	-3,09±40,66	5,66 (-33,67-26,49)	0,433
LOC152578	-1,93±11,86	-3,50 (-6,61-6,74)	-0,60±13,06	-0,29- (5,49-8,50)	0,550
SNHG16	-4,53±5,17	-5,09 (-8,72-1,86)	-3,67±5,16	-3,20 (-7,19-0,21)	0,558
ZNRF3-IT1	2,27±0,92	2,40 (1,91-2,63)	2,40±1,10	2,62 (1,72-3,10)	0,659
CCAT1	2,08±0,35	2,12 (1,79-2,37)	2,23±0,46	2,21 (1,88-2,71)	0,213
CRNDE	3,84±26,15	10,38 (-9,14,21,81)	20,17±19,58	19,64 (4,47-32,73)	0,009*
XLOC_000303	11,37±2,85	10,59 (10,16-12,85)	11,23±3,91	10,84 (8,60-13,80)	0,887

Tablo 4.3. Olgu grubunda yer alan KRK hastalarının, neo adjuvan tedavi durumları ile aday lncRNA'ların ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması ($p<0,05$). Analizler t testi ve Mann-Whitney testi ile değerlendirilmiştir.

	NEO/ADJUVAN TEDAVİ DURUMU				
	HAYIR (n=27)		EVET (n=38)		
circulating lncRNA	Ortalama±SS	Median (%25-%75)	Ortalama±SS	Median (%25-%75)	P değeri
ARHGAP5-AS1	-8,84±33,53	17,16(-34,13-15,15)	-2,98±43,99	11,00(-31,41-32,83)	0,562
LOC152578	0,11±11,06	0,57(-5,55-7,28)	-1,70±13,81	-2,39-(-6,41-8,72)	0,573
SNHG16	-3,04±3,97	-3,23(-5,43-1,00)	-4,49±5,80	-3,42(-9,35-0,60)	0,237
ZNRF3-IT1	2,50±0,97	2,62(1,91-3,08)	2,27±1,10	2,44(1,68-3,02)	0,384
CCAT1	2,27±0,38	2,23(1,96-2,47)	2,16±0,47	2,13(1,78-2,60)	0,609
CRNDE	14,01±24,92	13,01(1,30-32,70)	17,24±20,78	18,18(4,97-32,10)	0,571
XLOC_000303	12,11±3,48	11,63(9,76,63-14,87)	10,66±3,66	10,17(8,76-12,33)	0,115

4.2. KRK'li Hastalarda, Aday Genlerin Plazma Ekspresyon Seviyesi ve *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* Mutanlığı Arasındaki İlişki

KRK'li ileri evre hasta grubu içerisinde *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* somatik mutasyon varlığı değerlendirilmiştir. Olguların %34'ünde *KRAS* varyantı, %12'sinde *NRAS* varyantı, %6'sında *BRAF* varyantı görülmekte olup %48'inde ise herhangi bir somatik değişim gözlenmemiştir (Tablo 4.4). İleri evre grubundaki 50 olguda en sık kodon 12-13 ve kodon 61'de *KRAS* varyantı gözlenmiştir. Çalışmada değerlendirilen aday 7 sirküle lncRNA ekspresyon seviyesi ile *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* genlerinde sık gözlenen somatik varyantlar arasındaki ilişki değerlendirildiğinde istatistiksel olarak sadece *KRAS* somatik varyantları ile *CRNDE* geni ($p=0,031$) arasında anlamlı bir farklılık saptanmış olup, diğer aday 6 sirküle lncRNA geni arasında ise anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.4 *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* genlerinde sık gözlenen somatik varyantlar. Ki-Kare analizi ile değerlendirilmiştir.

<i>KRAS-NRAS-BRAF</i> somatik varyant durumu	Frekans (n)	Yüzde (%)
<i>KRAS</i> mutasyonu toplam	17	34
Kodon 12-13	11	22
Kodon 61	3	6
Kodon 146	3	6
<i>NRAS</i> mutasyonu toplam	6	12
Kodon 61	6	
<i>BRAF</i> mutasyonu toplam	3	6
Kodon 600(V600D)	3	
Negatif	24	48

Tablo 4.5 *KRAS* somatik varyant varlığı ile ilgili circIncRNA'lar arasındaki ilişki. Student t testi ile analiz edilmiştir. * p değeri: $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

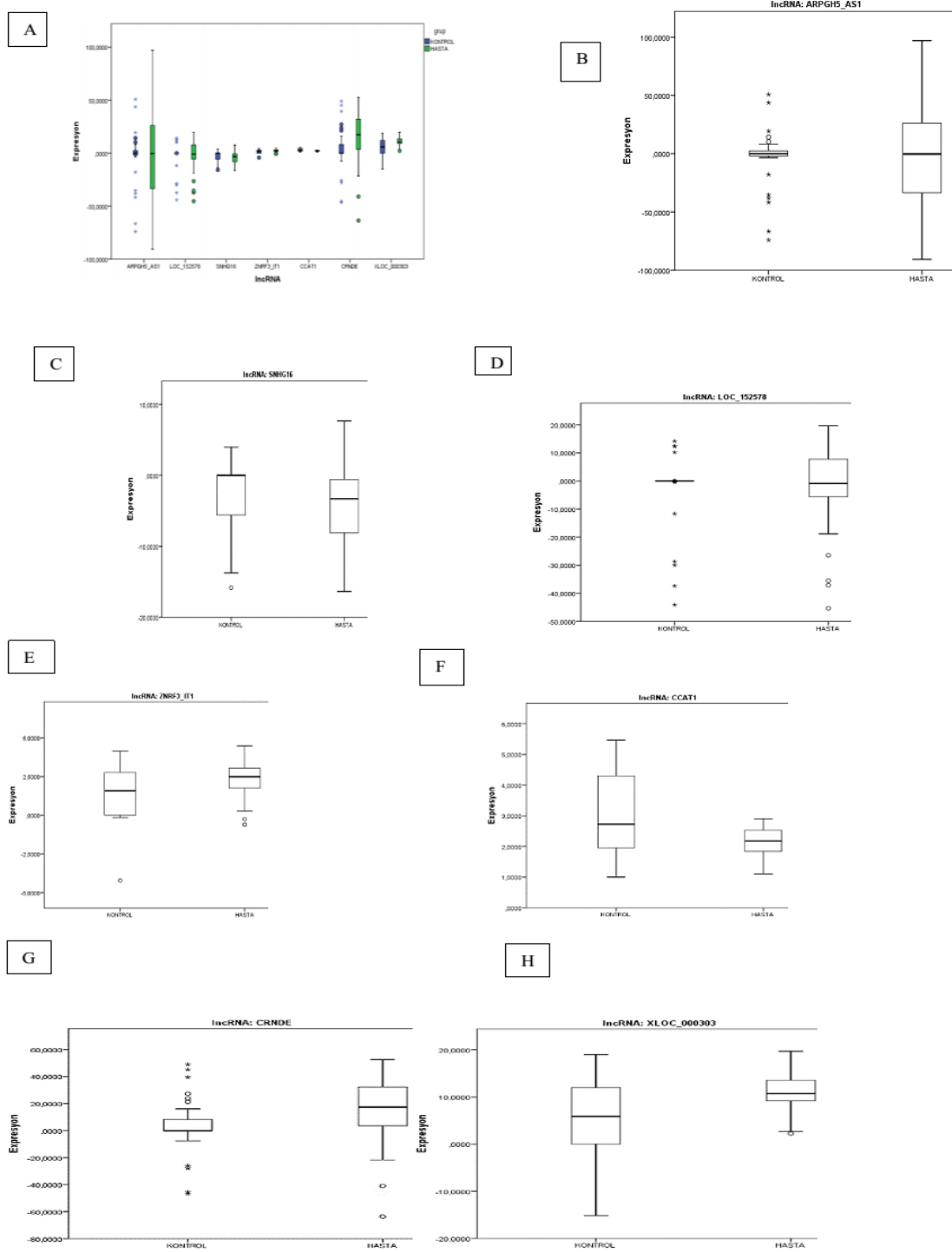
	<i>KRAS</i> VARYANT POZİTİF (n=17)		<i>KRAS</i> VARYANT NEGATİF (n=33)		
circulating lncRNA	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma	p değeri
<i>ARHGAP5-AS1</i>	-19,9234	33,5810	-5,5848	35,5899	0,269
<i>LOC152578</i>	-4,6196	7,1035	0,8081	11,8304	0,180
<i>SNHG16</i>	-5,3139	4,4137	-2,8499	4,5827	0,144
<i>ZNRF3-IT1</i>	1,9590	0,9314	2,4296	0,9510	0,179
<i>CCAT1</i>	2,0159	0,3025	2,2463	0,4244	0,121
<i>CRNDE</i>	8,9010	9,7280	19,6629	20,4280	0,031*
<i>XLOC_000303</i>	9,7693	2,5665	11,0793	3,0971	0,234

4.3. KRK'li Hastalarda Aday circIncRNA Genlerindeki Ekspresyon Seviyesinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızdaki ana hipotezlerden biri olan "Kolorektal kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında *ARHGAP5-AS1*, *LOC152578*, *SNHG16*, *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE* ve *XLOC_000303* sirküle lncRNA genleri açısından ekspresyon farklılığı var mı?" sorusunu değerlendirmek için KRK'li 65 hasta ile kontrol grubundaki 31 birey arasındaki ekspresyon farklılığı incelenmiştir. Yapılan RT-PCR ekspresyon analizi sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda hasta ve kontrol grubu arasında *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE*, *XLOC_000303* sirküle lncRNA genleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup, bu ilişki tablo 4.6'da gösterilmiştir (Bu farklılıklar sırasıyla, $p=0,011$, $p=0,007$, $p=0,002$ ve $p=0,001$ şeklinde idi).

Tablo 4.6 KRK'li hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. *P değeri: $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. SS: Standart Sapma

circulating lncRNA	Kontrol Grubu		Hasta Grubu		P değeri
	Ortalama±SS	Median (%25-%75)	Ortalama±SS	Median (%25-%75)	
<i>ARHGAP5-AS1</i>	-4,02±25,48	0,00(-2,17-3,44)	-5,42±39,80	-0,33(-33,54-26,19)	0,909
<i>LOC152578</i>	-3,33±13,50	0,00(0,00-0,00)	-0,95±12,69	-0,86(-5,55-7,78)	0,984
<i>SNHG16</i>	-2,87±5,02	0,00(-5,73-0,00)	-3,89±5,14	-3,31(-8,09-0,58)	0,226
<i>ZNRF3-IT1</i>	1,39±1,77	1,58(0,00-2,84)	2,37±1,05	2,49(1,76-3,044)	0,011*
<i>CCAT1</i>	3,05±1,28	2,73(1,93-4,30)	2,19±0,43	2,18(1,84-2,53)	0,007*
<i>CRNDE</i>	2,80±21,40	0,00(0,00-9,26)	15,89±22,47	17,39(3,55-32,11)	0,002*
<i>XLOC_000303</i>	5,67±7,84	5,89(0,00-12,48)	11,26±3,64	10,73(9,17-13,53)	0,001*



Şekil 4.1 KRK hasta grubu ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyesi gösterilmektedir. A)7 tane aday sirküle lncRNA 'nın birlikte ekspresyon düzeyi B) *ARHGAP5-AS1* C) *SNHG16* D) *LOC152578* E) *ZNRF3-IT1* F) *CCAT1* G) *CRNDE* H) *XLOC_000303*

Kontrol ve hasta grubunun *ARHGAP5-AS1*, *LOC152578*, *SNHG16*, *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE*, *XLOC_000303* sirküle lncRNA ekspresyon seviyesi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile değerlendirilmiş ve relatif hesaplama yapılmıştır. Bunun sonucunda

kontrol grubu ile hasta grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olan 4 sirküle lncRNA değerlendirildiğinde sırasıyla, *ZNRF3-IT1* geninde ortalama 0,22 kat artış ve 3 hastada değişiklik olmamış, *CCAT1* geninde ortalama 0,006 kat artış ve 6 hastada değişiklik olmamış, *CRNDE* geninde ortalama 0,008 kat artış ve 9 hastada değişiklik olmamış ve *XLOC_000303* geninde ortalama 0,25 kat artış ve hastaların hepsinde ekspresyon değişimi gözlenmiştir (Şekil 4.1).

Çalışmadaki bir diğer hipotezimiz olan "KRK hastalarında erken evre ve ileri evre arasında *ARHGAP5-AS1*, *LOC152578*, *SNHG16*, *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE* ve *XLOC_000303* sirküle lncRNA genleri açısından ekspresyon farklılığı var mı?" sorusunu değerlendirmek için 50 ileri evre ve 15 erken evre KRK olguları karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, evrelere göre değerlendirildiğinde, bu 7 aday sirküle lncRNA gen içerisinde sadece *XLOC_000303* geninin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ($p=0,001$). Ayrıca Cox Regresyon analizine göre *XLOC_000303* geninin metastaz oluşumuna karşı koruyucu bir faktör olduğu tespit edilmiştir ($p=0,045$, HR=0,90, %95CI=0,812-0,997). İncelenen diğer genlerde ise evreler açısından istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmamıştır (Tablo 4.7). Tablo 4.8'de Cox Regresyon analizi ile aday genlerin metastaz oluşumunda risk faktörü olma olasılığı gösterilmektedir.

Tablo 4.7. KRK'li hasta grubunun evreler arasındaki ekspresyon seviyesinin karşılaştırılması. Student t testi ve Mann-Whitney testi ile analiz edilmiştir. SS: Standart Sapma * p değeri: $p<0,05$

circulating lncRNA Adı	Erken Evre Grubu (Evre I-II)		İleri Evre Grubu (Evre III-IV)		p değeri
	Ortalama±SS	Median (%25-%75)	Ortalama±SS	Median (%25-%75)	
<i>ARHGAP5-AS1</i>	11,90±51,85	32,83(-23,41-37,44)	-10,61±34,37	-8,75(-33,80-15,15)	0,054
<i>LOC152578</i>	-2,45±18,96	4,59(-6,60-11,62)	-0,49±10,32	-1,57(-5,55-6,73)	0,554
<i>SNHG16</i>	-4,93±7,00	-7,58(-10,57-1,72)	-3,58±4,47	-3,20(-6,55-0,60)	0,491
<i>ZNRF3-IT1</i>	2,50±1,46	2,43(1,82-3,92)	2,32±0,91	2,53(1,74-3,02)	0,544
<i>CCAT1</i>	2,27±0,54	2,42(1,81-2,73)	2,16±0,40	2,17(1,85-2,43)	0,501
<i>CRNDE</i>	16,10±29,81	20,77(4,97-32,57)	15,83±20,13	16,46(2,70-30,86)	0,968
<i>XLOC_000303</i>	13,99±3,71	14,07(11,45-17,03)	10,44±3,22	10,21(8,76-12,33)	0,001*

Tablo 4.8. KRK'li hasta grubunun metastaz durumuna göre evreler arasındaki aday genlerin risk oluşturma olasılığının karşılaştırılması. Cox Regresyon testi ile analiz edilmiştir. HR: Hazard ratio, CI: Confidence interval, * $p < 0,05$.

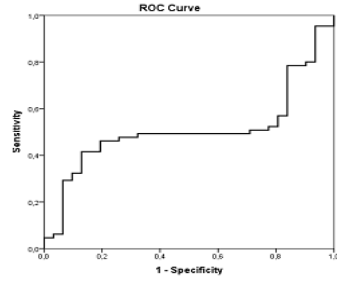
circulating lncRNA	Ortalama	p değeri	HR	HR %95 CI
<i>ARHGAP5-AS1</i>	-7,409	0,494	0,998	0,990-1,005
<i>LOC152578</i>	-1,266	0,352	1,011	0,988-1,035
<i>SNHG16</i>	-4,293	0,189	1,046	0,978-1,119
<i>ZNRF3-IT1</i>	2,313	0,716	0,948	0,711-1,263
<i>CCAT1</i>	2,167	0,631	1,181	0,599-2,326
<i>CRNDE</i>	15,125	0,851	1,001	0,989-1,014
<i>XLOC_000303</i>	10,990	0,045*	0,900	0,812-0,997

4.4. Ekspresyon Seviyesinin ROC ve AUC Analizleri

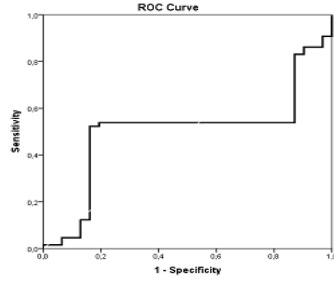
KRK hasta (65 olgu) ve kontrol (31 olgu) grubu olarak toplamda 96 olgunun incelenen 7 aday sirküle lncRNA geni açısından ROC ve AUC analizleri yapılmıştır. Bu analizlere göre ilgili aday circLncRNA genlerin bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için testin duyarlılık ve özgüllük değerleri hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda aday sirküle lncRNA genlerinde, elde edilen ROC ve AUC değerleri tablo 4.9, şekil 4.2 ve şekil 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.9 KRK hasta ve kontrol grubunda incelenen circulating lncRNA genlerinin ROC ve AUC değerleri. CI: Confidence interval, AUC: Area Under the Curve, P değeri: * $p < 0,05$.

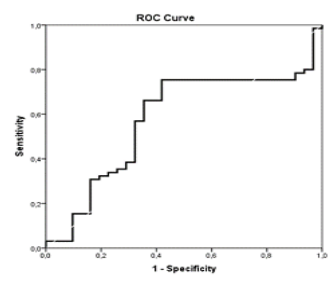
circulating lncRNA Adı	Sensivite (Duyarlılık)	Spesifite (Özgüllük)	AUC	%95 CI	p Değeri
<i>ARHGAP5-AS1</i>	49,2	59,2	0,507	0,389-0,625	0,910
<i>LOC152578</i>	52,3	83,9	0,501	0,378-0,624	0,984
<i>SNHG16</i>	75,4	58,1	0,577	0,452-0,701	0,226
<i>ZNRF3-IT1</i>	92,3	45,2	0,660	0,531-0,790	0,012*
<i>CCAT1</i>	100,0	45,2	0,672	0,534-0,810	0,007*
<i>CRNDE</i>	81,5	64,5	0,700	0,586-0,814	0,002*
<i>XLOC_000303</i>	93,8	51,6	0,706	0,579-0,833	0,001*



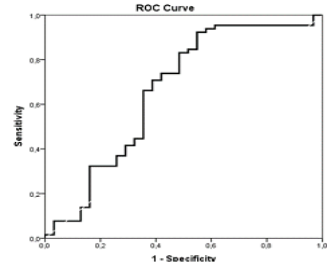
ARPHGAS5-AS1



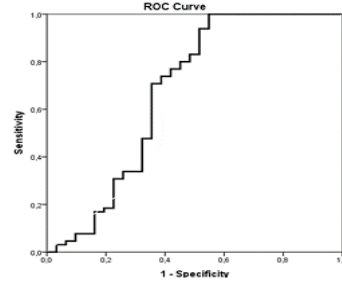
LOC152578



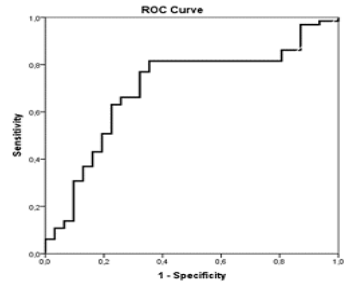
SNHG16



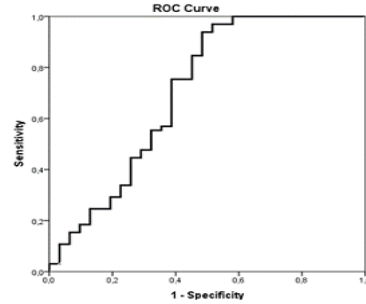
ZNRF3-IT1



CCAT1



CRNDE



XLOC_000303

Şekil 4.2 İncelenen genlerin ROC analizleri gösterilmektedir.

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): ARHGAP5-AS1_EKSPRESYONU

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.507	.060	.910	.389	.625

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): LOC_152578_EKSPRESYONU

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.501	.063	.984	.378	.624

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): SNHG16_EKSPRESYONU

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.577	.063	.226	.452	.701

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): ZNRF3_IT1_EKSPRESYONU

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.660	.066	.012	.531	.790

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): CCAT1_EKSPRESYONU

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.672	.071	.007	.534	.810

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Area Under the Curve

Test Result

Variable(s): XLOC_000303_EKSPRESYONU

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.706	.065	.001	.579	.833

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): CRNDE_EKSPRESYONU

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.700	.058	.002	.586	.814

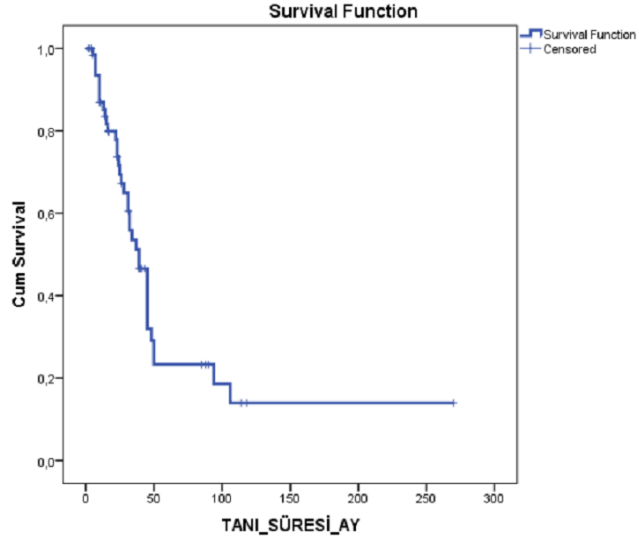
a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Şekil 4.3 İncelenen genlerin AUC analizleri gösterilmektedir.

Ayrıca KRK hastalarının toplam sağ kalım ve metastaz tanısı aldıktan sonraki sağ kalım analizleri şekil 4.4 ve şekil 4.5’de gösterilmiştir. Toplam sağ kalım analizi ile ilgili ise medyan değeri hesaplaması yapılamadığından bu açıdan değerlendirme yapılamamıştır. Metastaz tanısı aldıktan sonraki sağ kalım süresi ortalama $69,95 \pm 14,528$ ay (%95 CI:41,480-98,429) ve medyan $39,00 \pm 3,968$ ay (%95 CI: 31,223-46,777) olarak bulunmuştur (Şekil.4.4). Progresyonsuz sağ kalım süresi ise ortalama

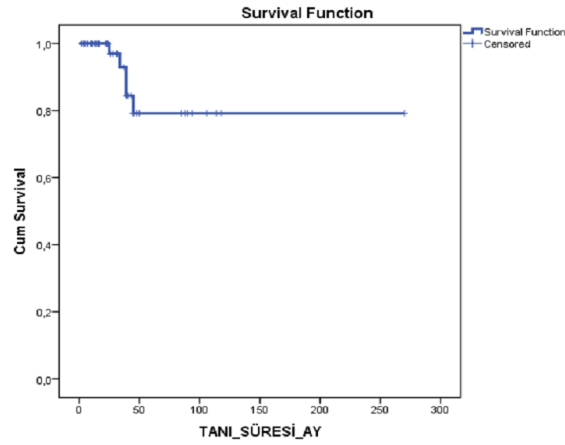
86,864±17,564 ay (%95 CI:52,439-121,289) ve medyan 39,00±5,544 ay (%95 CI:28,134-49,866) olarak saptanmıştır (Şekil 4.6).



Means and Medians for Survival Time							
Mean ^a				Median			
		95% Confidence Interval				95% Confidence Interval	
Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
69,954	14,528	41,480	98,429	39,000	3,968	31,223	46,777

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

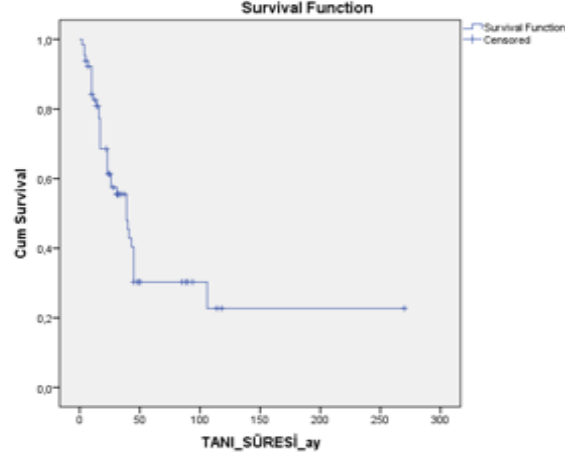
Şekil 4.4 Metastaz tanı durumuna göre sağ kalım analizi gösterilmektedir. Kaplan-Meier analizi ile yapılmıştır.



Means and Medians for Survival Time							
Mean ^a				Median			
		95% Confidence Interval				95% Confidence Interval	
Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
221,645	19,636	183,158	260,132	.	.	.	.

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

Şekil 4.5 Toplam sağ kalım analizi gösterilmektedir. Kaplan-Meier analizi ile yapılmıştır.* Ölü sayısı az olduğundan medyan süresi hesaplanamamıştır.



Means and Medians for Survival Time							
Mean ^a				Median			
Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
86.864	17.564	52.439	121.289	39.000	5.544	28.134	49.866

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

Şekil 4.6 KRK'li hastaların progresyonsuz sağ kalım analizi gösterilmektedir. Kaplan-Meier analizi ile yapılmıştır.

4.5. KRK'li Hastaların CEA ve CA 19-9 Tümör Belirteçlerinin Serum Seviyesinin Değerlendirilmesi

KRK'li hastaların serum örneklerinde CEA ve CA 19-9 tümör belirteçlerinin serum seviyelerinin hastanın tanı ve prognozda değerleri McNemar testi ve Spearman korelasyon testi ile karşılaştırılmıştır. Hastalar arasında Ki kare testi ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda CEA tanıda ve prognozda anlamlı farklılık olmadığı ($p=0,388$), yine CA 19'da da tanı ve prognozda anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır ($p=1,00$). Yapılan Spearman korelasyon analizine göre, CEA tümör belirtecinin tanı ve prognostik zamandaki serum seviyesi arasında anlamlı ve pozitif yönlü bir ilişki olduğu bulunmuştur ($r^{\text{spearman}}= 0,490$, $p<0,001$). Aynı zamanda, CA 19-9 tümör belirtecinin tanı zamanında ve prognostik zamandaki serum seviyesi arasında anlamlı ve pozitif yönlü ilişki olduğu gözlenmiştir ($r^{\text{spearman}}= 0,609$, $p<0,001$). CEA ile CA 19-9'un tanı zamanındaki serum seviyesi arasında anlamlı ve pozitif yönlü bir korelasyon olduğu, ($r^{\text{spearman}}= 0,309$, $p=0,029$) ve yine CEA ve CA 19-9'un prognoz zamanındaki serum seviyesi arasında anlamlı ve pozitif korelasyon olduğu görülmüştür ($r^{\text{spearman}}= 0,496$, $p<0,001$). Ayrıca 7 aday genin ekspresyon seviyesi ile CEA ve CA 19-9 serum seviyesi arasındaki ilişki

incelenmiştir. İstatistiksel olarak sadece *ARHGAP5-AS1* geni ile CA 19-9 tümör belirtecinin tanı ($p=0,014$) ve prognozdaki ($p=0,036$) serum değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (Tablo 4.10). Aynı zamanda *ARHGAP5-AS1* ekspresyonu ile CA 19-9 tümör belirtecinin tanı ($r^{spearman} = -0,344$) ve prognozdaki ($r^{spearman} = -0,297$) değerleri arasındaki negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.10 CEA ve CA 19-9 tümör belirtecinin tanı ve prognozdaki serum seviyesi ile ilgili 7 aday genin ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki. Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir.

* $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

circulating lncRNA	CEA Tanıda p Değeri	CEA Prognozda p Değeri	CA 19-9 Tanıda p Değeri	CA 19-9 Prognozda p Değeri
<i>ARHGAP5-AS1</i>	0,863	0,261	0,014*	0,036*
<i>LOC152578</i>	0,757	0,574	0,232	0,067
<i>SNHG16</i>	0,282	0,210	0,590	0,857
<i>ZNRF3-IT1</i>	0,404	0,411	0,106	0,938
<i>CCAT1</i>	0,488	0,536	0,110	0,119
<i>CRNDE</i>	0,192	0,883	0,33	0,209
<i>XLOC_000303</i>	0,822	0,075	0,068	0,087

5. TARTIŞMA

Kolorektal kanser en yaygın görülen kanser tiplerindendir ve kanser nedenli ölümlerin başında yer almaktadır (Aykan vd., 2015; J. Shi vd., 2015). KRK, gelişimine çevresel ve genetik faktörlerin eşlik ettiği multifaktöriyel bir hastalıktır. KRK gelişiminde etkili genetik faktörlerin moleküler mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik son yıllarda oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular ncRNA'ların, KRK hastaları için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Chandra Gupta ve Nandan Tripathi, 2017).

ESOGÜ Tıp Fak. Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda kolorektal kanser tanısı alarak tedavi gören 65 hasta ve 31 kontrol grubunun plazma örneği ile yapılan mevcut çalışmada, KRK tanılı hastalarda aday circLncRNA genlerinin hasta ve kontrol grubu arasındaki ekspresyon profili karşılaştırılmış ve erken evreden ileri evreye geçişteki rolü incelenmiştir. Aday sirküle lncRNA genlerinin non-invaziv bir biyobelirteç olarak kullanıma olasılıkları tartışılmıştır. Aynı zamanda aday sirküle lncRNA genlerindeki ekspresyon profilinin hastaların tümörlü FFPE doku örneklerinde *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* somatik varyantları ile olan ilişkisi de değerlendirilmiştir. Ek olarak CEA ve CA 19-9 tümör belirteci ile aday sirküle lncRNA genleri arasında ilişki de incelenmiştir.

5.1. *ARHGAP5-AS1* LncRNA Ekspresyon Profiline Değerlendirilmesi

ARHGAP5-AS1'in (*C14orf128*) tümör ilerlemesini ve metastazı teşvik etmede onkogenik bir rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Zhu ve ark., kemoterapiye dirençli mide kanseri hücrelerinde *ARHGAP5-AS1*'in upregüle olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada, *ARHGAP5-AS1*'in, hedef geni *ARHGAP5*'in ekspresyonunu arttırdığı ve mide kanseri hücrelerinde kemodirençliliği teşvik ettiği gösterilmiştir. *ARHGAP5-AS1*'i nukleusta ve sitoplazmada *ARHGAP5* mRNA'nın hem oluşumunu hem de stabilitesini düzenlemek için gerekli olan bir molekül olarak tanımlamışlardır. Bu nedenle, mide kanserinde kemoterapiye direncin klinikte takibi için *ARHGAP5-AS1/ARHGAP5*'i birlikte hedef almanın yeni bir potansiyel terapötik strateji olabileceğini öne sürmüşlerdir (L. Zhu vd., 2019).

Fang ve ark., nazofarenks karsinomlu hastalarda *ARHGAP5* mRNA seviyesinin, klinik evre ve lenfatik metastaz ile pozitif korelasyon gösterdiğini ve *ARHGAP5*'in ektopik ekspresyonunun, nazofarenks karsinom hücrelerinin invaziv ve migrasyon kabiliyetini arttırdığını göstermişlerdir (Fang vd., 2015).

Wang ve ark., metastatik meme kanseri hücre hattında *ARHGAP5-AS1* geni ekspresyonunun down regüle olduğunu tespit etmişler ve meme kanseri metastazında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (C.-L. Wang vd., 2020)

Yaptığımız çalışmada KRK hastalarında *ARHGAP5-AS1* lncRNA geninin ekspresyonunun upregüle olduğu ancak, KRK'li hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise *ARHGAP5-AS1* lncRNA'nın ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği görülmüştür ($p=0,909$). Ayrıca *ARHGAP5-AS1* açısından evreler arasında da bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0,054$). *ARHGAP5-AS1* lncRNA ile yapılan çalışmalara bakıldığında, çeşitli kanser türlerinde hem upregüle hem de down regüle bir ekspresyon profili sergilediği ve bu değişken ekspresyon seviyelerinin hastalığın metastaz durumu ve kötü sağ kalımı ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (L. Zhu vd., 2019; C.-L. Wang vd., 2020). Bizim yaptığımız çalışmada ise *ARHGAP5-AS1* ile hem metastaz durumu hem de neo adjuvan tedaviye yanıtta her hangi bir ilişki saptanmamıştır. Daha önceki çalışmalarda mide kanserinde kemoresistant etkisi olduğu yönündeki bulgularla bizim sonuçlarımız çelişmektedir. Sonuçlarımız, bu konuda net bir yargıya varabilmek için ileri fonksiyonel çalışmalar yapılmasının gerekli olduğunu düşündürmektedir. Ancak KRK hastalarında yaygın olarak kullanılan CA 19-9 tümör belirtecinin tanı ve prognoz zamanındaki serum seviyeleri ile *ARHGAP5-AS1* arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ve aralarında negatif bir korelasyon olduğu saptanmıştır. *ARHGAP5-AS1* lncRNA'nın yaygın kullanılan tümör belirteçleri ile birlikte kullanılabilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. ROC analizi sonucunda *ARHGAP5-AS1*'in duyarlılığı 49,2 ve özgüllüğü 59,2 ve AUC değeri ise 0,507(%95 CI: 0,389-0,625; $p=0,910$) olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular ışığında, lncRNA *ARHGAP5-AS1*'i bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin özgüllük ve duyarlılık bakımından düşük olduğu görülmektedir. *ARHGAP5-AS1*'in hasta ve kontrol grubu arasında ayırt etme gücünün zayıf olduğu gözlenmiştir.

5.2. *LOC152578* LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

Shi ve ark.'nın, iki yüz doksan insan plazma örneği ile yaptıkları tüm genom çalışmasında KRK'de biyobelirteç olabilecek 3 yeni lncRNA tanımlamışlardır. Bunlar sırasıyla, *XLOC_006844*, *LOC152578* ve *XLOC_000303* genleridir. Bu genlerin sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında KRK hasta grubunda önemli derecede upregüle olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar bu 3 genin KRK hastalarında erken tanıda bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (J. Shi vd., 2015).

Sun ve ark.'nın, servikal kanserli üç yüz hastanın plazma örneği ile yaptıkları çalışmada *LOC152578*'nin ekspresyon seviyesinde bir farklılık olmadığı gösterilmiştir (Wenping Sun vd., 2018).

Çalışmamızda KRK hastalarında *LOC152578*'nin upregüle olduğu gözlenmiş, ancak ekspresyon seviyesinin KRK ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği gözlenmiştir ($p=0,984$). Aynı zamanda hastalar evreler açısından değerlendirildiğinde de anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0,554$). ROC analizi sonucunda *LOC152578*'in duyarlılığı 52,3 ve özgüllüğü 83,9 ve AUC değeri ise 0,501(%95 CI:0,378-0,624; $p=0,984$) olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular ışığında, lncRNA *LOC152578*'i bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin özgüllük olarak yüksek, duyarlılık bakımından ise düşük olduğu görülmektedir. Bu da bize lncRNA *LOC152578*'in hasta ve kontrol grubu arasındaki ayırt etme gücünün zayıf olduğunu göstermiş olup, KRK'de bir prognostik biyobelirteç olma olasılığının düşük olduğunu düşündürmektedir.

5.3. *SNHG16* LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

Daha önce yapılan çalışmalarda, *SNHG16* lncRNA'nın glioma, meme kanseri ve servikal kanser gibi çeşitli kanser türlerinde upregülasyon sergilediği ve malignite tümör örneklerinde potansiyel bir onkogen gibi davrandığı bildirilmiş olup, metastaz

ve proliferasyonu düzenlemede önemli rolü olduğu gösterilmiştir (C. Zhu, Cheng, Qiu, Zhuang ve Liu, 2018).

Han ve ark.'ı, yüz yirmi sekiz özefagus karsinomlu hastadan aldıkları taze doku örneklerini normal doku örnekleri ile karşılaştırmışlardır. Çalışmada ayrıca tümörlü hücre hattı ve taze dokunun birlikte ekspresyon seviyesi ölçülmüş olup, normal hücre hattı ve normal dokulara göre daha yüksek oranda upregüle eksprese oldukları gözlenmiştir. *SNHG16* ekspresyon artışının, tümör evresi, lenf nod metastazı ve klinik evre ile güçlü şekilde korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca fonksiyon kaybı deneylerinde *SNHG16*'nın tümörlü hücrelerde apoptozu indüklediği, invazyon ve proliferasyonu baskıladığı ortaya konulmuştur (G. Han vd., 2018).

Cao ve ark.'ı, mesane kanserli kırk altı hastanın doku örneği ile normal doku örneğini karşılaştırdıklarında *SNHG16* geninin önemli derecede eksprese olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca çalışmalarında mesane kanseri hastalarında artan *SNHG16* ekspresyonunun, artmış tümör boyutu, ileri TNM evresi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra yaptıkları fonksiyon kaybı çalışmaları, *SNHG16*'nın inhibe edilmesinin, *SNHG16*'nın hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki etkisi sonucu, tümörlü hücrenin proliferatif yeteneğini zayıflattığını göstermişlerdir. Bu gözlemler sonucunda, *SNHG16*'nın mesane kanseri hastalarının prognozu için yeni bir klinik moleküler belirteç olabileceğini öne sürmüşlerdir (X. Cao vd., 2018).

Zhu ve ark.'ı, yirmi osteosarkoma tümör dokusu ve hücre hattı ile yaptıkları çalışmada *SNHG16*'nın yüksek derecede eksprese olduğunu ve bu ekspresyon profilinin osteosarkom hücrelerinin proliferasyon yeteneğini önemli ölçüde arttırabileceğini ileri sürmüşlerdir (C. Zhu vd., 2018).

Cristensen ve ark.'ı, iki yüz seksen bir KRK hastasının taze dokusu ile yaptıkları çalışmada, *SNHG16*'nın *WNT* yolu tarafından düzenlendiğini ve KRK'de erken evrede upregüle olduğunu göstermişlerdir (Christensen vd., 2016).

Zhang ve ark.'ı, yaptıkları bir sistematik ve meta analiz çalışmasında insan kanserlerinde *SNHG16*'nın prognostik önemini incelemişlerdir. Bu çalışmada toplamda 8 araştırma çalışmasından beş yüz altmış sekiz hasta örneğinin ekspresyon profili değerlendirilmiş olup, lncRNA *SNHG16*'nın anormal ekspresyonunun, çeşitli kanserlerde sağ kalım sonuçlarıyla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu ve bu nedenle

insan kanserlerinin prognozu için umut verici bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Chenghao Zhang vd., 2019).

Yaptığımız çalışmada, KRK ve kontrol grubu karşılaştırıldığında *SNHG16*'nın upregüle olduğu ancak ekspresyon seviyesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir ($p=0,226$). Yine KRK hastalarında evreler arasında da anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,491$). Tümör boyutu ile *SNHG16* lncRNA'nın ekspresyon seviyesi arasında güçlü bir ilişki olduğu gözlenmiştir ($p=0,023$). Bu veri Cao ve ark.'nın mesane kanserli hastalarla yaptıkları çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermekle birlikte, hem evreler arası hem de hasta ve kontrol grubu arasında farklılık olmaması, *SNHG16*'nın biyo belirteç olarak kullanılabileceği kanısına varabilmek için daha fazla çalışma yapılması gerektiğini düşündürmektedir. ROC analizi sonucunda *SNHG16*'nın duyarlılığı 75,4 ve özgüllüğü 58,1 ve AUC değeri ise 0,577 (%95 CI:0,452-0,701; $p=0,226$) olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular ışığında, lncRNA *SNHG16*'ı bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin hem duyarlılık hem de özgüllük bakımından düşük olduğu görülmektedir. LncRNA *SNHG16*'nın hasta ve kontrol grubunu ayırt etme özelliğinin düşük olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızdaki veriler, lncRNA *SNHG16*'nın KRK'de prognostik bir biyobelirteç olma olasılığının zayıf olduğunu düşündürmektedir.

5.4. *ZNRF3-IT1* LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

ZNRF3-IT1, bir sense intronik ncRNA sınıfında yer alan lncRNA'dır. LNCipedia version 5.2 ve LncRNADisease v2.0 gibi çeşitli ncRNA veri tabanlarında bu genin hedef genleri arasında *ZNRF3*, *C22orf31* ve *KREMEN1* gibi genlerin yer aldığı bildirilmektedir (Dong Lab, 2021; University, 2021). KRK, meme kanseri, hepatoselüler karsinoma gibi çeşitli malign kanser türlerinde hücrel proliferasyona sebep olduğu yine aynı veri tabanlarında yer almaktadır (Bao vd., 2019). Hedef genlerinden biri olan *ZNRF3* ile ilgili yapılan çalışmalarda, *WNT/β*-katenin sinyal yolağının negatif regülatörlerinden biri olduğu gösterilmiştir (D.-L. Chen ve Xu, 2018).

Bir başka çalışmada KRK hastalarında, *ZNRF3*'ün daha yüksek ekspresyonunun, kanser hücresi büyümesini baskılayarak ve apoptozu indükleyerek

kolorektal karsinomun iyi prognoz sergilemesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Yu vd., 2016). Ayrıca ensembl veri tabanında yapılan RNA seq verilerinde bu genin ekspresyon profilinin çeşitli kanser türlerinde down regüle yönde olduğu ve yaklaşık 5,6 kat azalış gösterdiği bildirilmiştir (How vd., 2020).

Yaptığımız çalışmada, *ZNRF3-IT1* lncRNA geninin, KRK hasta grubunda kontrol grubuna göre ortalama 0,23 kat upregüle olduğu tespit edilmiştir. Bu genin ekspresyon profilinin hasta grubunda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p=0,011$). *ZNRF3-IT1*'in evrelere göre karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,544$). *ZNRF3-IT1*'in hedef geni olan *ZNRF3*'ün, *WNT/β*-katenin yolağında bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü yönündeki bilgiler ışığında, kontrollere kıyasla farklılık olması, *ZNRF3-IT1*'in *ZNRF3*'ün tümör baskılayıcı işlevini değiştirebileceğini düşündürmektedir. Bu konuda net bir yargıya varabilmek için bu iki gen için fonksiyonel çalışmalar yapılması uygun olacaktır. ROC analizi sonucunda *ZNRF3-IT1*'in duyarlılığı 92,3 ve özgüllüğü 45,2 ve AUC değeri ise 0,660 (%95 CI:0,531-0,790; $p=0,012$) olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular ışığında, lncRNA *ZNRF3-IT1*'i bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin duyarlılık olarak yüksek, özgüllük bakımından ise düşük olduğu görülmektedir. Ancak hasta ve kontrol grubu arasındaki ayırt etme özelliğinin güçlü olduğu bulunmuştur. Bu veriler, *ZNRF3-IT1* lncRNA'nın KRK hastalarında bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

5.5. *CCAT1* LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

İlk kez Nissan ve ark.'ı tarafından tanımlanan lncRNA *CCAT1*'in, primer KRK tümörlerinin büyük çoğunluğunda, prekanseröz poliplerde (adenomlar), lenf düğümlerinde, kanda ve uzak KRK metastazlarında normal dokulara kıyasla yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada, yirmi sekiz KRK tümör örneği normal doku örnekleri ile karşılaştırıldığında *CCAT1* ekspresyonunun 30 kat daha fazla oranda upregülasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmadaki önemli bulgulardan biri, *CCAT1* ekspresyon artışının bölgesel nod, uzak karaciğer metastazı ve KRK hastalarının periferik kan örneklerinde de gözlenmiş olmasıdır. Araştırmacılar, bu bulgular sonucunda *CCAT1*'in KRK'li hastaların tanı, tedavi,

evreleme ve genel prognostik durumu hakkında bilgi elde etmeyi sağlayabilecek bir biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeli olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Nissan vd., 2012). Daha sonra yapılan çalışmalarda, *CCAT1* lncRNA'nın kolon kanseri, oral skuamöz hücreli karsinom, epitel yumurtalık kanseri, renal hücreli karsinom, hepatosellüler karsinom, rahim ağzı kanseri, safra kesesi kanseri, mide kanseri ve meme kanseri gibi bir çok malignitede anormal şekilde eksprese edildiği ve bu kötü huylu tümörlerin patogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir (Y. Cao, Shi, Ren, Jia ve Zhang, 2017; S. Chen vd., 2017; Lai, Chen, Lin ve Ye, 2018).

Zhang ve ark.'ı, otuz dört mesane kanserli hastanın tümör dokusunda normal doku örneklerine kıyasla önemli oranda *CCAT1* ekspresyon artışı tespit etmişlerdir. Bu ekspresyon artışının aynı zamanda tümör evre, derece ve büyüklüğü ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Yine aynı çalışmada *CCAT1* ekspresyonunun downregülasyonunun mesane kanser hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Caixiang Zhang vd., 2019).

Shi ve ark.'ı, bin beş yüz seksen yedi kanser hastası ile yaptığı bir meta analiz çalışmasında elde edilen sonuçlarda, *CCAT1*'in artan ekspresyon seviyesinin kötü prognozla ilişkili olduğunu ve prognozu değerlendirmek için bağımsız bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Aynı zamanda *CCAT1* ekspresyon seviyesinin, ilgili kanserlerde klinikopatolojik özelliklerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (D. Shi vd., 2017).

Ye Zhenyu ve ark.'ı, otuz yedi KRK'li hastanın tümör örneği ile yaptıkları çalışmada, kolorektal kanser dokularında *CCAT1* ekspresyonunun upregüle olduğunu ve ekspresyon seviyesinin, evreleme, vasküler invazyon ve CA19-9 seviyesiyle önemli ölçüde ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (Ye vd., 2015).

He ve ark.'ı, *CCAT1* ekspresyonunun upregülasyonunun kolon kanseri hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu teşvik ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca, artan *CCAT1* ekspresyonunun, kolon kanseri hastalarının klinik evresi, lenf nodu metastazı ve sağ kalım süresi ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Elde edilen bulgularla, lncRNA *CCAT1*'in kolon kanseri tedavisinin önemli bir hedefi olabileceğini ileri sürmüşlerdir (X. He vd., 2014).

Abedini ve ark.'ı tarafından, yetmiş dört kontrol ve yetmiş dört KRK hastanın plazma örneğinde, *lnc-ATB*, *lnc-CCAT1* ve *lnc-OCC-1*'nin kontrollere kıyasla

önemli oranda upregüle olduğu ve *lnc-ATB* ve *CCAT1*'in istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Klinik evreler arasında ise anlamlı farklılık saptamamışlardır. *lnc-ATB* (AUC = 0.78; $p < 0.001$) ve *lnc-CCAT1*'in AUC değeri 0,64 (95% CI: 0.811–0.94; $p = 0.024$) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre *lnc-ATB* ve *CCAT1*'in ayırt etme gücünün yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (Abedini vd., 2019).

Zhao ve ark.'ı otuz ikişer KRK ve kontrol grubundan elde ettikleri plazma ve serum örneklerinde *CCAT1* ve *HOTAIR* lncRNA'nın ekspresyon seviyelerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda kontrollere göre KRK'li hastaların plazma ve serumlarında *CCAT1* ve *HOTAIR*'de önemli oranda ekspresyon artışı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarla, KRK ile ilişkili lncRNA'ların dolaşıma girebileceğini ve plazmadaki farklılaşmış ekspresyonunun KRK için tanısal biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Yapılan ROC ve AUC analizleri ile, *CCAT1* ve *HOTAIR* lncRNA'nın KRK hastaları ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırım yapabildiği gözlenmiş olup, *CCAT1* için AUC değeri 0,836 (%95 CI:0,739-0,934; $p < 0,001$ ve *HOTAIR* lncRNA için AUC değeri ise, 0,777 (%95 CI:0,663-0,891; $p < 0,001$ olarak bulunmuştur. Ayrıca *HOTAIR* ve *CCAT1* kombinasyonunun, tek başına *HOTAIR* veya *CCAT1*'den daha yüksek pozitif KRK tanısal oranı olduğu ileri sürülmüştür (Zhao vd., 2015).

Siddique ve ark, altmış üç KRK hastası ve kırk kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada, plazma örneklerinde belirledikleri 8 aday lncRNA (*PANDAR*, *MALAT1*, *PCAT6*, *CCAT1*, *UCA1*, *MEG3*, *CCAT2* ve *BCAR4*) genindeki ekspresyon farklılıklarını incelemişlerdir. Bu aday genlerden, *MALAT1*, *CCAT1* ve *PANDAR* lncRNA genlerinin önemli oranda upregüle olduklarını (sırasıyla 1.86, 4.54 ve 4.68 kat) ve bunun da istatistiksel olarak farklılık gösterdiğini bulmuşlardır. Elde ettikleri bulguların, *MALAT1*, *CCAT1*, ve *PANDAR* lncRNA ekspresyonunun KRK prognozunda potansiyel bir biyomarker olabileceğini desteklediğini vurgulamışlardır (Siddique vd., 2019).

Yaptığımız çalışmada *CCAT1* lncRNA geninin, KRK hasta grubunda kontrol grubuna göre ortalama 0,0059 kat upregüle olduğu tespit edilmiştir. Bu genin ekspresyon profilinin hasta grubunda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p=0,007$). *CCAT1*'in evrelere göre karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,501$). *CCAT1*'in ekspresyon seviyesi ile tümör boyutu arasında güçlü bir ilişki olduğu saptanmıştır

($p=0,021$). *CCAT1*'in, *C-MYC* aracılığıyla proliferasyon ve invazyonu teşvik ettiği bilinmektedir. Bizim sonuçlarımız da KRK'de *CCAT1*'in proliferasyon ve invazyonu arttırdığı yönündeki bilgileri desteklemektedir. ROC analizi sonucunda *CCAT1*'in duyarlılığı 100 ve özgüllüğü 45,2 ve AUC değeri ise 0,672 (%95 CI:0,534-0,810; $p=0,007$) olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular ışığında, lncRNA *CCAT1*'i bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin duyarlılık olarak yüksek, özgüllük bakımından ise düşük olmakla birlikte hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir. Bu veriler, *CCAT1* lncRNA'nın KRK hastalarında bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

5.6. *CRNDE* LncRNA Ekspresyon Profilinin Değerlendirilmesi

CRNDE, başlangıçta normal kolon epitel hücrelerinde düşük veya sıfır ekspresyon ile kolorektal kanserlerde aşırı regüle edilmiş bir lncRNA olarak tanımlanmıştır (W Wang, Yuan ve Xu, 2019). *CRNDE* lncRNA'nın çeşitli kanser tiplerinin tümörögenezinde, progresyonunda ve prognozunda önemli role sahip olduğunu gösteren bir çok çalışma bildirilmiştir. Özellikle KRK, mide kanseri, glioma ve hepatoselüler karsinom gibi kanser türlerinde yüksek oranda ekspresyon profili sergilediği gösterilmiştir (Ding vd., 2017; Hu, Du, Zhang ve Huang, 2017; Jiang vd., 2017; Zheng vd., 2016). Bu yüksek orandaki ifadenme, *CRNDE* lncRNA'nın kanser prosesinde hücre proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu, anjiyogenezis, apoptozun baskılanması ve tümör oluşumu ve gelişimi gibi süreçlere dahil olabileceğini düşündürmektedir. Doku veya serum kaynaklı çalışmalarda *CRNDE*'nin, yüksek oranda duyarlılık ve özgüllük ile bir biyobelirteç görevi görebileceği ileri sürülmüştür (Liu, Zhang, Gao, vd., 2016). *CRNDE*, kanser hücresi büyümesini ve metastazı teşvik ettiği düşünülen bir onkogendir ve ayrıca oksaliplatin bazlı kemoterapi direncinde rolü olduğuna inanılmaktadır (Gao vd., 2017).

Wang ve ark.'ı, çeşitli kanser hastalarında *CRNDE* ile ilgili yapılmış kırk dokuz çalışmayı taramışlar ve içlerinden on üçünü seçerek, yaptıkları meta analiz çalışmasında *CRNDE*'nin bir onkogen gibi davrandığını ve ekspresyonunun upregüle olmasının kötü prognoz ve ilerlemiş tümör progresyonu ile güçlü bir korelasyon sergilediğini bildirmişlerdir (W Wang vd., 2019).

He ve ark.'ı, 1053 gastrointestinal malignite hastası ile yaptıkları bir meta analiz çalışmasında, gastrointestinal kanserde, yüksek *CRNDE* ekspresyonu ve zayıf genel sağ kalım arasında önemli bir ilişki olduğu gözlenmiştir. *CRNDE*'nin, gastrointestinal kanserli hastalarda erken teşhis, hedefe yönelik tedavi ve prognozun değerlendirilmesi için potansiyel bir kanser biyobelirteci olarak uygulanabileceği yönünde görüş bildirilmiştir (T.-Y. He, Li, Huang, Gong ve Li, 2019).

Han ve ark.'ı, altmış dört KRK hastası ile yaptıkları çalışmada, *CRNDE* ekspresyonunu upregüle olduğunu saptamışlardır. *CRNDE*'nin KRK gelişiminin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir KRK hücrelerinde, *CRNDE*'nin *miR-181a-5p*'nin ekspresyonunu teşvik ettiği ve bu yolla Wnt/ β -katenin sinyalini inhibe ettiği gösterilmiştir (P. Han vd., 2017).

Ding ve ark.'ın çalışmasında, *CRNDE*'nin KRK dokularında ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuş ve *CRNDE*'nin KRK'de önemli bir rol oynadığını ve KRK prognozu ve tedavisinde bağımsız bir klinik belirteç olabileceğini ileri sürmüşlerdir. *CRNDE* aşırı ekspresyonunun, ilerlemiş patolojik evre ve daha büyük tümör boyutları ile pozitif bir şekilde ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Ek olarak, *CRNDE*'i knockdown edip, hücreleri G1 evresinde durdurarak, apoptozu teşvik etmişler ve hem in vitro hem de in vivo KRK hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde baskıladığını göstermişlerdir (Ding vd., 2017).

Liu ve ark.'ı, yüz kırk sekiz KRK hastasının serum örneklerindeki ekzozomlarda *CRNDE*'nin yüksek oranda eksprese olduğunu bulmuşlardır. Ekzozomal *CRNDE*'nin, agresif tümör davranışı ve kötü prognoz ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Liu, Zhang, Gao, vd., 2016).

Liu ve ark.'ı, yüz kırk iki KRK hastasının tümör doku örneğinde, *CRNDE*'nin yüksek oranda eksprese olduğunu göstermişlerdir. *CRNDE*'nin upregüle ekspresyonunun, tümör büyüklüğü, bölgesel lenf nod metastazı ve uzak metastaz ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. *CRNDE* lncRNA yüksek ekspresyonunun, KRK dokularında *IRX5* mRNA ile pozitif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçların KRK gelişim ve progresyonunda *CRNDE*'nin önemli bir rol oynayabileceği ve biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (Liu, Zhang, Yang, Du ve Wang, 2016).

Yaptığımız çalışmada, *CRNDE* lncRNA geninin, KRK hasta grubunda kontrol grubuna göre ortalama 0,0081 kat upregüle olduğu tespit edilmiştir. Bu genin ekspresyon profilinin, hasta grubunda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p=0,002$). *CRNDE*, evrelere göre karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,968$). *CRNDE*'nin ekspresyon seviyesi ile tümör boyutu ($p=0,010$), tümör farklılaşması ($p=0,023$) ve primer tümör yerleşimi ($p=0,009$) arasında güçlü bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Verilerimiz literatürle uyumlu olup, *CRNDE*'nin proliferasyon, migrasyon, invazyon ve apoptozun baskılanması gibi süreçlerde etkin olduğu yönündeki bilgileri desteklediği görülmektedir. Ancak yapılan çalışmada *CRNDE*'nin, neoadjuvan tedavi ile ilişkisi incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu bulgu *CRNDE*'nin, oksaliplatin bazlı kemoterapi direncinde rolü olduğu yönündeki bilgiler ile çelişmektedir. Kemoresistant etkisini değerlendirebilmek için daha fazla sayıda çalışma yapılması gerektiği kanısındayız. ROC analizi sonucunda *CRNDE*'nin duyarlılığı 81,5 ve özgüllüğü 64,5 ve AUC değeri ise 0,700 (%95 CI:0,586-0,814; $p=0,002$) olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular göre, lncRNA *CRNDE*'yi bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin hem duyarlılık hem de özgüllük bakımından yüksek olduğu, hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir. Bu veriler, *CRNDE* lncRNA'nın KRK hastalarında bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği hipotezini desteklediğini göstermektedir.

5.7. *XLOC_000303* LncRNA Ekspresyon Profiline Değerlendirilmesi

LINC01507 olarak da bilinen *XLOC_000303* lncRNA ilk kez Shi ve ark. tarafından keşfedilmiştir. Shi ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, sağlıklı kontrollere kıyasla 290 KRK hastalarının plazmasında farklı şekilde eksprese edilen 3 lncRNA (*XLOC_006844*, *LOC152578* ve *XLOC_000303*) belirlenilmiştir. Bu bulgular ilk kez plazmadaki lncRNA'nın KRK için yeni ve hızlı bir tanı biyobelirteci olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada pozitif prediktif değer: 0,80, negatif prediktif değer: 0,84, AUC = 0.975 olarak saptanmıştır (J. Shi vd., 2015).

Sun ve ark. tarafından üç yüz servikal kanser hastalarının plazmasında farklı şekilde eksprese edilen 4 lncRNA (*HOTAIR*, *PVT1*, *XLOC_000303* ve *AL592284.1*) belirlenmiştir. Bu lncRNAların upregüle olduğu bulunmuştur ve bu genlerin servikal kanserde tümörögenезisin gelişiminde potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (Wenping Sun vd., 2018).

Yaptığımız çalışmada, *XLOC_000303* lncRNA geninin, KRK hasta grubunda kontrol grubuna göre ortalama 0,25 kat upregüle olduğu tespit edilmiştir. Bu genin ekspresyon profilinin hasta grubunda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p=0,001$). Yine lncRNA *XLOC_000303* evrelere göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p=0,001$). *XLOC_000303*'nin ekspresyon seviyesi ile metastaz durumu arasında güçlü bir ilişki olduğu bulunmuştur ($p=0,016$). Aday genleri sağ kalım analizlerinde metastaz oluşturma riski açısından değerlendirdiğimizde, *XLOC_000303*'de ($p=0,045$, $HR=0,90$) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ve metastaz oluşumuna karşı koruyucu bir faktör olduğu (1,111 kat) tespit edilmiştir. *XLOC_000303*'nin evreler arası ekspresyon farklılığı göstermesi ve metastaz oluşumunda koruyucu faktör olması, bu genin KRK hastalarında tümörögenезis gelişiminde ve hastalık progresyonunda etkin rolü olduğunu düşündürmektedir. ROC analizi sonucunda *XLOC_000303*'ün duyarlılığı 93,8 ve özgüllüğü 51,6 ve AUC değeri ise 0,706 (%95 CI:0,579-0,833; $p=0,001$) olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular ışığında, lncRNA *XLOC_000303*'ü bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığı açısından değerlendirdiğimizde, testin duyarlılık olarak yüksek, özgüllük bakımından ise düşük olmakla birlikte hasta ve kontrol grubu arasında güçlü bir ayırt etme özelliği olduğu gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, *XLOC_000303* lncRNA'nın KRK'de prognostik faktör olarak kullanılabileceği hipotezini desteklemektedir. Aynı zamanda bu gendeki ekspresyon artışının, erken evreden ileri evreye geçişte öngörülebilir koruyucu bir faktör olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Ancak bu verinin hastaların tümörlü doku örneklerinde yapılan ekspresyon çalışmaları ile desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

5.8. *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* Somatik Varyantlarının Aday Genler İle İlişkisi

de Bony ve ark., beş yüz altmış altı KRK örneğini mikroarray çalışmasına dahil etmişler ve dört bin sekiz yüz doksan sekiz lncRNA genini taramışlardır. Bunlar içerisinde iki yüz seksen ikisinin KRK ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Sonrasında *WNT/β-catenin*, *TGF-β* sinyal yolağı, immünite ve epitelyal mezenşimal dönüşüm (EMT) yolağında bu genlerin etkisini değerlendirmişlerdir. Burada KRK örneklerinde somatik *TP53*, *BRAF* ve *KRAS* varyantları ile lncRNA'ların ekspresyon seviyesi arasındaki ilişkiye bakıldığında, *lnc-multi POTEM-2*'nin, *TP53*-mutant tümörlerde upregüle olduğu, ancak *KRAS*-mutant tümörlerde ise downregüle edildiği bulunmuştur. Çalışma sonucunda, bir *BRAF* mutasyonu mevcut olduğunda, *lnc-ITGB8-4*'nin en güçlü aşağı yönlü düzenlemeyi ve *lncRNA HAGLR*'nin de en güçlü yukarı yönlü düzenlemeyi gösterdiğini belirlemişlerdir (de Bony vd., 2018).

Yaptığımız çalışmada ise ileri evre KRK hastalarında *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* somatik varyantları açısından ilgili aday circLncRNAlar arasında ilişki incelenmiş olup, sık gözlenen *KRAS* somatik varyantları ile *CRNDE* lncRNA ($p=0,031$) arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır. Bildiğimiz kadarıyla ilgili aday 7 circLncRNA geninin *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* somatik varyantları ile ilişkisini inceleyen bir çalışma yapılmamıştır. Elde edilen bulgular, KRK'de yaygın olarak gözlenen somatik varyantlar ile circLncRNA arasında ilişki olabileceğini ortaya koymuştur. Bu da somatik varyantlar üzerine circLncRNA'ların etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezi açıklayabilmek için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir.

5.9. KRK'de Aday Genlerin CEA ve CA 19-9 Tümör Belirteçleri İle İlişkisi

Ye Zhenyu ve ark., otuz yedi KRK tümör dokusunda *lncRNA-CCAT1*, *E-cadherin* ve *N-cadherin* genlerinin ekspresyon seviyesi ile CEA ve CA 19-9 tümör belirteçleri arasındaki korelasyonu incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda, *lncRNA-CCAT1*'nin tümör dokularında normal dokulara oranla daha yüksek oranda ekprese olduğunu saptamışlardır. Aynı zamanda yüksek *lncRNA-CCAT1* ekspresyon profilinin tümör evresi, lokal invazyon, vasküler invazyon ve CA 19-9 ile korelasyon

gösterdiği ancak tümör lokasyonu, tümör farklılaşma seviyesi, primer lezyonun büyüklüğü ve CEA seviyesi ile korelasyon göstermediği bulunmuştur (Ye vd., 2015).

Jing Fangyuan ve ark., 6 KRK hastasından alınan tümör örneği ile bir mikroarray çalışması yapmışlardır. Sonrasında doksan beş KRK hastasının tümör örneği ile Real-Time PCR çalışması yapılmış olup, çalışma sonucunda farklı ekspresyon profili sergileyen 10 tane lncRNA geni tespit etmişlerdir. Bu genler arasında anlamlı farklılık tespit edilen *UCA1 lncRNA* geni ekspresyonu ile CEA ve CA 19-9 serum seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptamamışlardır (Jing vd., 2017).

Ozawa ve ark., iki yüz seksen KRK tümör dokusu ve yirmi normal doku ile çalışma yapmışlardır. Çalışmada *CCAT1* ve *CCAT2* lncRNA genlerinin ekspresyon seviyesi ile CEA serum seviyesi arasındaki ilişkiyi incelemiş olup, her iki gen ile CEA arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğunu saptamışlardır (Ozawa vd., 2017).

Yaptığımız çalışmada, KRK hastalarında yaygın olarak kullanılan tümör belirteçleri CEA ve CA19-9 serum seviyeleri ile ilgili 7 aday sirküle lncRNA ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Bu analiz sonucunda sadece *ARHGAP5-AS1* lncRNA'nın CA 19-9 tümör belirtecinin tanı ve prognozdaki değerleri ile anlamlı ilişkisi olduğu ve aralarında negatif yönlü bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Bu verilerin, tümör belirteçleri ile aday sirküle lncRNA'lar arasında ilişki olabileceğini göstermesi açısından önemli olduğunu düşünüyoruz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde kanserin patogenezi aydınlatmaya yönelik özellikle lncRNA'lar üzerine çalışmalar yoğunlaşmış durumdadır. Bu bağlamda KRK hasta grubunda da lncRNA'lar üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan bu çalışma ile KRK hastalarında sirküle lncRNA'ların non invaziv bir biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeli değerlendirilmiştir. Bu amaçla "KRK hasta ve kontrol grubu plazma örnekleri arasında ekspresyon profili açısından anlamlı bir farklılık var mıdır?" hipotezi tartışılmıştır. Yine aynı olgularda erken evre ve ileri evre arasında ekspresyon farklılığı değerlendirilmiştir. KRK hastaları ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE* ve *XLOC_000303* sirküle lncRNA'da istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır (sırasıyla $p=0,011$, $p=0,007$, $p=0,002$ ve $p=0,001$). Diğer sirküle lncRNA *ARHGAP5-AS1*, *LOC152578* ve *SNHG16* arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,909$, $p=0,984$ ve $p=0,226$). KRK hastalarında evreler arasındaki ekspresyon farklılığını karşılaştırdığımızda ise sadece *XLOC_000303* sirküle lncRNA'da istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir ($p=0,001$). İstatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanan *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE* ve *XLOC_000303* sirküle lncRNA'ların ekspresyon seviyeleri relatif olarak incelediğinde, ekspresyon profilinin upregüle olduğu gözlemlenmiştir (Sırasıyla ortalama 0.22, 0.0059, 0.0081 ve 0.25 kat artış). İstatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanan *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE* ve *XLOC_000303* sirküle lncRNA genlerinin klinikte prognostik biyobelirteç olarak kullanılma olasılığını değerlendirdiğimizde, bir indikatör olarak ayırt etme güçlerinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu genlerin ayırt etme gücü sırasıyla AUC:0,660 ($p=0,012$), AUC:0,672 ($p=0,007$), AUC: 0,700 ($p=0,002$), AUC: 0,706 ($p=0,001$) olarak bulunmuştur. Ayrıca *XLOC_000303* sirküle lncRNA'daki ekspresyon artışının metastaz oluşumuna karşı 1,111 kat koruyucu bir faktör olduğu tespit edilmiştir ($p=0,045$, HR=0,90).

KRK olgularını klinik parametreler açısından değerlendirdiğimizde, *CRNDE* sirküle lncRNA ekspresyon seviyesi ile tümör farklılaşması ($p=0,023$), primer tümör yerleşim yeri ($p=0,009$) ve tümör boyutu ($p=0,010$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. *CCAT1* ($p=0,021$) ve *SNHG16* ($p=0,023$) sirküle lncRNA ekspresyon seviyesi ile tümör boyutu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur.

KRK ileri evre grubu olgularında, *CRNDE* sirküle lncRNA ($p=0,031$) ekspresyon seviyesi ile sık gözlenen *KRAS* somatik varyantları arasında anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir. KRK vakalarında yaygın olarak kullanılan CEA ve CA 19-9 tümör belirteçleri arasında hem tanı ($p=0,029$) anında hem de prognoz zamanında ($p<0,001$) anlamlı ve pozitif yönlü bir korelasyon olduğu bulunmuştur. CA 19-9 ile *ARHGAP5-AS1* sirküle lncRNA geni (tanıda $p=0,014$, prognoz zamanında $p=0,036$) arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında, KRK hastalarının plazma örneklerinde *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE* ve *XLOC_000303* sirküle lncRNA genlerinde ekspresyon farklılığının saptanması, aday genlerin hastalığın prognozunda potansiyel bir non invaziv biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bu genlerdeki ekspresyon değişikliğinin tümör boyutu, tümör farklılaşması, primer tümör yerleşim yeri ile ilişkili bulunması, sirküle lncRNA'ların KRK'de tümör gelişimi, proliferasyon, invazyon ve migrasyonunda etkili genetik faktörler arasında yer aldığı yönündeki verileri desteklemektedir. Aynı zamanda *XLOC_000303* lncRNA'nın evreler arasında ekspresyon değişikliği sergilemesi erken evreden ileri evreye geçişte metastaz oluşumunda koruyucu faktör olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu veriler, *ZNRF3-IT1*, *CCAT1*, *CRNDE* ve *XLOC_000303* sirküle lncRNA'ların, klinikte prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermekle birlikte, KRK hastalığında aday tanı ve terapötik hedef olarak kullanılma olasılıklarını ortaya koyacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu da bir gerçektir.

Çalışma sonuçlarına göre, *KRAS* geninde sık gözlenen somatik varyantlar ile *CRNDE* sirküle lncRNA arasında ve tümör belirteci CA 19-9 ile *ARHGAP5-AS1* sirküle lncRNA arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Bu anlamlı farklılık, aday olarak belirlediğimiz sirküle lncRNA genlerinin ekspresyon seviyelerinin de ileride KRK hastalarının prognozunu takip ederken kullanılabilecek biyobelirteçler arasında yer alabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle elde ettiğimiz bu verilerden yola çıkarak, özellikle hastalığın patogenezinde etkili olan sinyal yolları üzerinde bu aday sirküle lncRNA'ların etkisini ortaya koyabilmek için ileri fonksiyonel çalışmalar yapmayı planlamaktayız.

Sonuç olarak çalışmadan elde edilen verilerin KRK hastalarında moleküler etiyopatogenezi açıklamaya katkıda bulunabileceğini ve ileride bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutabileceği kanaatindeyiz. KRK'de prognostik faktör olarak yaygın

kullanılan tümör belirteçlerinin özgüllüğü ve duyarlılığı oldukça düşük ve KRK'ye spesifikliğı zayıftır. Non invaziv bir biyobelirteç olarak sirküle lncRNA'ların kullanımı ise özgüllük ve duyarlılık açısından daha etkili görünmektedir. Bu da sirküle lncRNA'ların ayırt edici bir indikatör olarak kullanılma potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız çalışmanın bazı sınırlılıkları mevcuttur. Bunlar şu şekilde sıralanabilir;

1) Çalışma örnekleminin nispeten küçük olması. Gelecekte örnek sayısı artırılarak daha geniş çaplı populasyon ile çalışılması, ilgili lncRNA genlerinin tanısal ve prognostik doğruluğunu arttırabilir.

2) Sadece plazma örnekleri ile çalışma yapılmıştır. İleride yapılacak çalışmalarda, plazma örneklerinin yanı sıra doku örnekleri ile çalışılarak sonuçların doğrulanmasına ihtiyaç vardır.

3) Hastalarda toplam sağ kalım analizinde takip süresi ve ölü sayısı yeterli olmadığından medyan değerleri hesaplanamamıştır.

4) Planladığımız çalışmada, bu genlerdeki somatik varyantlar incelenmemiştir. Ekspresyon profilinin yanında ek olarak polimorfik ve mutant varyantlar üzerine çalışmalar yapılması moleküler mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abedini, P., Fattahi, A., Agah, S., Talebi, A., Beygi, A. H., Amini, S. M., . . . Akbari, A. (2019). Expression analysis of circulating plasma long noncoding RNAs in colorectal cancer: The relevance of lncRNAs ATB and CCAT1 as potential clinical hallmarks. *Journal of cellular physiology*.
- Al-Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., Kohonen-Corish, M., & Warusavitarne, J. (2012). Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 27(9), 1423-1431.
- Alaiyan, B., Ilyayev, N., Stojadinovic, A., Izadjoo, M., Roistacher, M., Pavlov, V., . . . Trink, B. (2013). Differential expression of colon cancer associated transcript1 (CCAT1) along the colonic adenoma-carcinoma sequence. *BMC cancer*, 13(1), 196.
- AYDIN, İ., Şehitoğlu, İ., Ender, Ö., Yücel, A. F., Pergel, A., Bedir, R., . . . Şahin, D. A. (2015). Kolorektal Kanser Nedeniyle Opere Ettiğimiz Hastaların Değerlendirilmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 16(2), 102-109.
- Aykan, N. F., Yalçın, S., Turhal, N. S., Özdoğan, M., Demir, G., Özkan, M., . . . Artaç, M. (2015). Epidemiology of colorectal cancer in Turkey: A cross-sectional disease registry study (A Turkish Oncology Group trial). *Türk J Gastroenterol*, 26(2), 145-153.
- Bai, X., Wang, W., Zhao, P., Wen, J., Guo, X., Shen, T., . . . Yang, X. (2020). LncRNA CRNDE acts as an oncogene in cervical cancer through sponging miR-183 to regulate CCNB1 expression. *Carcinogenesis*, 41(1), 111-121.
- Bakanlığı, S. (2014). KOLOREKTAL KANSER TARAMALARI DEĞERLENDİRME RAPORLARI. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.
- Bao, Z., Yang, Z., Huang, Z., Zhou, Y., Cui, Q., & Dong, D. (2019). LncRNADisease 2.0: an updated database of long non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic acids research*, 47(D1), D1034-D1037.
- Behrens, J. (2005). The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. In: Portland Press Ltd.
- Benson, Al B, Venook, Alan P, Al-Hawary, Mahmoud M, Arain, Mustafa A, Chen, Yi-Jen, Ciombor, Kristen K, Cohen, Stacey, Cooper, Harry S, Deming, Dustin, Farkas, Linda. (2021). Colon cancer, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology . *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 19(3), 329-359.
- Bhan, A., Soleimani, M., & Mandal, S. S. (2017). Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm. *Cancer research*, 77(15), 3965-3981.
- Bonasio, R., & Shiekhattar, R. (2014). Regulation of transcription by long noncoding RNAs. *Annual review of genetics*, 48, 433-455.
- Botteri, E., Iodice, S., Raimondi, S., Maisonneuve, P., & Lowenfels, A. B. (2008). Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 134(2), 388-395. e383.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Brink, M., de Goeij, A. F., Weijenberg, M. P., Roemen, G. M., Lentjes, M. H., Pachen, M. M., . . . van den Brandt, P. A. (2003). K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*, 24(4), 703-710.
- Bruckner, H. W., Pitrelli, J., & Merrick, M. (2000). Adenocarcinoma of the colon and rectum. In *Holland-Frei Cancer Medicine. 5th edition*: BC Decker.
- Brunicaardi, F. C., & Schwartz, S. I. (2005). *Schwartzs principles of surgery*: McGraw-hill.
- Bustin, S. A., & Murphy, J. (2013). RNA biomarkers in colorectal cancer. *Methods*, 59(1), 116-125.
- Butterworth, A. S., Higgins, J. P., & Pharoah, P. (2006). Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *European journal of cancer*, 42(2), 216-227.
- Cabili, M. N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., & Rinn, J. L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes & development*, 25(18), 1915-1927.
- Cao, X., Xu, J., & Yue, D. (2018). LncRNA-SNHG16 predicts poor prognosis and promotes tumor proliferation through epigenetically silencing p21 in bladder cancer. *Cancer gene therapy*, 25(1), 10-17.
- Cao, Y., Shi, H., Ren, F., Jia, Y., & Zhang, R. (2017). Long non-coding RNA CCAT1 promotes metastasis and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Experimental cell research*, 359(1), 185-194.
- Chandra Gupta, S., & Nandan Tripathi, Y. (2017). Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: From biomarkers to therapeutic targets. *International journal of cancer*, 140(9), 1955-1967.
- Chen, D.-L., & Xu, R.-H. (2018). The emerging role of long non-coding RNAs in the drug resistance of colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 11(10), 4735.
- Chen, S., Ma, P., Li, B., Zhu, D., Chen, X., Xiang, Y., . . . Jin, X. (2017). LncRNA CCAT1 inhibits cell apoptosis of renal cell carcinoma through up-regulation of Livin protein. *Molecular and cellular biochemistry*, 434(1), 135-142.
- Chi, Y., Wang, D., Wang, J., Yu, W., & Yang, J. (2019). Long non-coding RNA in the pathogenesis of cancers. *Cells*, 8(9), 1015.
- Chiorean, E. G., Nandakumar, G., Fadelu, T., Temin, S., Alarcon-Rozas, A. E., Bejarano, S., . . . Odhiambo, A. (2020). Treatment of Patients With Late-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *JCO Global Oncology*, 6, 414-438.
- Christensen, L. L., True, K., Hamilton, M. P., Nielsen, M. M., Damas, N. D., Damgaard, C. K., . . . Pedersen, J. S. (2016). SNHG16 is regulated by the Wnt pathway in colorectal cancer and affects genes involved in lipid metabolism. *Molecular oncology*, 10(8), 1266-1282.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Chughtai, S. A., Crundwell, M. C., Cruickshank, N. R., Affie, E., Armstrong, S., Knowles, M. A., . . . Phillips, S. M. (1999). Two novel regions of interstitial deletion on chromosome 8p in colorectal cancer. *Oncogene*, 18(3), 657.
- Dahariya, S., Paddibhatla, I., Kumar, S., Raghuwanshi, S., Palapati, A., & Gutti, R. K. (2019). Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Molecular immunology*, 112, 82-92.
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Risk factors. *Lancet*, 394, 1467-1480.
- derived from GLOBOCAN, N. (2018). Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018.[Internet; cited 2018 May]. In.
- Ding, J., Li, J., Wang, H., Tian, Y., Xie, M., He, X., . . . Wang, K. (2017). Long noncoding RNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation via epigenetically silencing DUSP5/CDKN1A expression. *Cell death & disease*, 8(8), e2997.
- Dong Lab, Shanghai Key Laboratory of Regulatory Biology, Institute of Biomedical Sciences, School of Life Sciences, East China Normal University (2021). The LncRNA and Disease Database (version 2.0)
- Eddy, S. R. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews Genetics*, 2(12), 919-929.
- Edwards, B. K., Ward, E., Kohler, B. A., Ehemann, C., Zaubler, A. G., Anderson, R. N., . . . Seeff, L. C. (2010). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 116(3), 544-573.
- Ellis, B. C., Molloy, P. L., & Graham, L. D. (2012). CRNDE: a long non-coding RNA involved in cancer, neurobiology, and development. *Frontiers in genetics*, 3, 270.
- Elsayed, E. T., Salem, P. E., Darwish, A. M., & Fayed, H. M. (2018). Plasma long non-coding RNA HOTAIR as a potential biomarker for gastric cancer. *The International journal of biological markers*, 33(4), 528-533.
- Eser, S., Yakut, C., Özdemir, R., Karakılınç, H., Özalan, S., Marshall, S. F., . . . Akin, Ü. (2010). Cancer incidence rates in Turkey in 2006: a detailed registry based estimation. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 11(6), 1731-1739.
- Eser, S. Y. (2007). Cancer incidence in Turkey. *Cancer Control in Turkey. Ankara, Turkey: The Ministry of Health of Turkey*, 17, 44.
- Ewing, I., Hurley, J. J., Josephides, E., & Millar, A. (2014). The molecular genetics of colorectal cancer. *Frontline gastroenterology*, 5(1), 26-30.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Fang, Y., Zhu, X., Wang, J., Li, N., Li, D., Sakib, N., . . . Song, W. (2015). MiR-744 functions as a proto-oncogene in nasopharyngeal carcinoma progression and metastasis via transcriptional control of ARHGAP5. *Oncotarget*, 6(15), 13164.
- Fatica, A., & Bozzoni, I. (2014). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*, 15(1), 7.
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *cell*, 61(5), 759-767.
- Feldman, M., Friedman, L. S., & Brandt, L. J. (2020). *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease E-Book: Pathophysiology, Diagnosis, Management*: Elsevier.
- Ferracin, M., Lupini, L., Mangolini, A., & Negrini, M. (2016). Circulating non-coding RNA as biomarkers in colorectal cancer. In *Non-coding RNAs in Colorectal Cancer* (pp. 171-181): Springer.
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of gastrointestinal oncology*, 3(3), 153.
- Fukuyama, R., Niculaita, R., Ng, K. P., Obusez, E., Sanchez, J., Kalady, M., . . . Sizemore, N. (2008). Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses β -catenin-dependent transcription. *Oncogene*, 27(46), 6044-6055.
- Gao, H., Song, X., Kang, T., Yan, B., Feng, L., Gao, L., . . . Li, H. (2017). Long noncoding RNA CRNDE functions as a competing endogenous RNA to promote metastasis and oxaliplatin resistance by sponging miR-136 in colorectal cancer. *OncoTargets and therapy*, 10, 205.
- Ghent University. (2021). LNCipedia database
- Gibb, E. A., Vucic, E. A., Enfield, K. S., Stewart, G. L., Lonergan, K. M., Kennett, J. Y., . . . Brown, C. J. (2011). Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. *PLOS ONE*, 6(10), e25915.
- Goel, A., Arnold, C. N., Niedzwiecki, D., Chang, D. K., Ricciardiello, L., Carethers, J. M., . . . Mayer, R. J. (2003). Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer research*, 63(7), 1608-1614.
- Granados-Romero, J. J., Valderrama-Treviño, A. I., Contreras-Flores, E. H., Barrera-Mera, B., Herrera Enríquez, M., Uriarte-Ruíz, K., . . . Arauz-Peña, G. (2017). Colorectal cancer: a review. *Int J Res Med Sci*, 5(11), 4667.
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458(7242), 1127-1130.
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., De Reynies, A., Schlicker, A., Soneson, C., . . . Angelino, P. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature medicine*, 21(11), 1350.
- Gültekin, M., & Boztaş, G. (2014). Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 43.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Haggar, F. A., & Boushey, R. P. (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*, 22(4), 191.
- Han, G., Lu, K., Wang, P., Ye, J., Ye, Y., & Huang, J. (2018). LncRNA SNHG16 predicts poor prognosis in ESCC and promotes cell proliferation and invasion by regulating Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22(12), 3795-3803.
- Han, P., Li, J.-w., Zhang, B.-m., Lv, J.-c., Li, Y.-m., Gu, X.-y., . . . Li, L. (2017). The lncRNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation and chemoresistance via miR-181a-5p-mediated regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Molecular cancer*, 16(1), 9.
- Hao, H.-X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., . . . Ruffner, H. (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature*, 485(7397), 195-200.
- He, T.-Y., Li, S.-H., Huang, J., Gong, M., & Li, G. (2019). Prognostic value of long non-coding RNA CRNDE in gastrointestinal cancers: A meta-analysis. *Cancer management and research*, 11, 5629.
- He, X., Tan, X., Wang, X., Jin, H., Liu, L., Ma, L., . . . Fan, Z. (2014). C-Myc-activated long noncoding RNA CCAT1 promotes colon cancer cell proliferation and invasion. *Tumor Biology*, 35(12), 12181-12188.
- Herreros-Villanueva, M., Duran-Sanchon, S., Martín, A. C., Pérez-Palacios, R., Vila-Navarro, E., Marcuello, M., . . . Bujanda, L. (2019). Plasma microRNA signature validation for early detection of colorectal cancer. *Clinical and translational gastroenterology*, 10(1).
- Hisamuddin, I. M., & Yang, V. W. (2006). Molecular genetics of colorectal cancer: an overview. *Current colorectal cancer reports*, 2(2), 53-59.
- Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Garshell, J., Neyman, N., Altekruse, S., . . . Tatalovich, Z. (2013). SEER cancer statistics review, 1975–2010. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 21, 12.
- Hu, C. E., Du, P. Z., Zhang, H. D., & Huang, G. J. (2017). Long noncoding RNA CRNDE promotes proliferation of gastric cancer cells by targeting miR-145. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42(1), 13-21.
- Jass, J. R. (2004). HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Familial cancer*, 3(2), 93-100.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians*, 60(5), 277-300.
- Jiang, H., Wang, Y., Ai, M., Wang, H., Duan, Z., Wang, H., . . . Wang, S. (2017). Long noncoding RNA CRNDE stabilized by hnRNPUL2 accelerates cell proliferation and migration in colorectal carcinoma via activating Ras/MAPK signaling pathways. *Cell death & disease*, 8(6), e2862-e2862.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kemeny, N., Niedzwiecki, D., Shurgot, B., & Oderman, P. (1989). Prognostic variables in patients with hepatic metastases from colorectal cancer. Importance of medical assessment of liver involvement. *Cancer*, 63(4), 742-747.
- Kim, B.-h., Kim, J. M., Kang, G. H., Chang, H. J., Kang, D. W., Kim, J. H., . . . Kang, Y. K. (2020). Standardized pathology report for colorectal cancer. *Journal of pathology and translational medicine*, 54(1), 1.
- Kohonen-Corish, M. R., Daniel, J. J., Chan, C., Lin, B. P., Kwun, S. Y., Dent, O. F., . . . Bokey, E. L. (2005). Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(10), 2318-2324.
- Kolfschoten, N., Wouters, M., Gooiker, G., Eddes, E., Kievit, J., Tollenaar, R., & Marang-van De Mheen, P. (2012). Nonelective colon cancer resections in elderly patients: results from the Dutch surgical colorectal audit. *Digestive surgery*, 29(5), 412-419.
- Kolligs, F. T., Bommer, G., & Göke, B. (2002). Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*, 66(3), 131-144.
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., . . . Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 15065. doi:10.1038/nrdp.2015.65.
- kumar Pandurangan, A., Divya, T., Kumar, K., Dineshbabu, V., Velavan, B., & Sudhandiran, G. (2018). Colorectal carcinogenesis: Insights into the cell death and signal transduction pathways: A review. *World journal of gastrointestinal oncology*, 10(9), 244.
- Lai, Y., Chen, Y., Lin, Y., & Ye, L. (2018). Down-regulation of LncRNA CCAT1 enhances radiosensitivity via regulating miR-148b in breast cancer. *Cell biology international*, 42(2), 227-236.
- Lanza, G., Matteuzzi, M., Gafá, R., Orvieto, E., Maestri, I., Santini, A., & del Senno, L. (1998). Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *International journal of cancer*, 79(4), 390-395.
- Levin, B., Lieberman, D. A., McFarland, B., Andrews, K. S., Brooks, D., Bond, J., . . . Johnson, D. (2008). 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. *Gastroenterology*, 134(5), 1570-1595.
- Levine, D. S., & Haggitt, R. C. (1989). Normal histology of the colon. *The American journal of surgical pathology*, 13(11), 966-984.
- Li, C. H., & Chen, Y. (2013). Targeting long non-coding RNAs in cancers: progress and prospects. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(8), 1895-1910.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Li, J., Ni, S., Zhou, C., & Ye, M. (2018). The expression profile and clinical application potential of hsa_circ_0000711 in colorectal cancer. *Cancer management and research*, 10, 2777.
- Libutti, S. K., Saltz, L. B., Willett, C. G., & Levine, R. (2015). Cancer of the colon. In DeVita, Hellman, and Rosenberg's *Cancer: Principles & Practice of Oncology: Tenth Edition*: Wolters Kluwer Health Adis (ESP).
- Liu, T., Zhang, X., Gao, S., Jing, F., Yang, Y., Du, L., . . . Wang, C. (2016). Exosomal long noncoding RNA CRNDE-h as a novel serum-based biomarker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(51), 85551.
- Liu, T., Zhang, X., Yang, Y.-m., Du, L.-t., & Wang, C.-x. (2016). Increased expression of the long noncoding RNA CRNDE-h indicates a poor prognosis in colorectal cancer, and is positively correlated with IRX5 mRNA expression. *OncoTargets and therapy*, 9, 1437.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Malki, A., ElRuz, R. A., Gupta, I., Allouch, A., Vranic, S., & Al Moustafa, A. E. (2021). Molecular mechanisms of colon cancer progression and metastasis: Recent insights and advancements. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 130.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodríguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 197.
- Mourra, N., Zeitoun, G., Portier, G., Blanche, H., Tubacher, E., Gressin, L., . . . Olschwang, S. (2008). High-resolution genotyping of chromosome 8 in colon adenocarcinomas reveals recurrent break point but no gene mutation in the 8p21 region. *Diagnostic Molecular Pathology*, 17(2), 90-93.
- Murphy, G., Devesa, S. S., Cross, A. J., Inskip, P. D., McGlynn, K. A., & Cook, M. B. (2011). Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *International journal of cancer*, 128(7), 1668-1675.
- Nissan, A., Stojadinovic, A., Mitrani-Rosenbaum, S., Halle, D., Grinbaum, R., Roistacher, M., . . . Gomceli, I. (2012). Colon cancer associated transcript-1: A novel RNA expressed in malignant and pre-malignant human tissues. *International journal of cancer*, 130(7), 1598-1606.
- Nojadeh, J. N., Sharif, S. B., & Sakhinia, E. (2018). Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI journal*, 17, 159.
- Odze, R., Cree, I., & Klimstra, D. (2019). WHO Classification of Tumours. Digestive System Tumours. In: Lyon: IARC press.
- Pecero, M. L., Salvador-Bofill, J., & Molina-Pinelo, S. (2019). Long non-coding RNAs as monitoring tools and therapeutic targets in breast cancer. *Cellular Oncology*, 42(1), 1-12.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2059-2072.
- Pöschl, G., & Seitz, H. K. (2004). Alcohol and cancer. *Alcohol and alcoholism*, 39(3), 155-165.
- Provenzale, D., Ness, R. M., Llor, X., Weiss, J. M., Abbadessa, B., Cooper, G., . . . Glaser, K. (2020). NCCN Guidelines Insights: Colorectal Cancer Screening, Version 2.2020: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 18(10), 1312-1320.
- Qi, P., Zhou, X.-y., & Du, X. (2016). Circulating long non-coding RNAs in cancer: current status and future perspectives. *Molecular cancer*, 15(1), 39.
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019a). Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 14(2), 89.
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019b). Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*, 13(1).
- Rosai, J. (2004). *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology Vol1*.
- Sagaert, X., Vanstapel, A., & Verbeek, S. (2018). Tumor heterogeneity in colorectal cancer: what do we know so far? *Pathobiology*, 85(1-2), 72-84.
- Samowitz, W. S., Albertsen, H., Sweeney, C., Herrick, J., Caan, B. J., Anderson, K. E., . . . Slattery, M. L. (2006). Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(23), 1731-1738.
- Shi, D., Wu, F., Gao, F., Qing, X., & Shao, Z. (2017). Prognostic value of long non-coding RNA CCAT1 expression in patients with cancer: a meta-analysis. *PloS one*, 12(6), e0179346.
- Shi, J., Li, X., Zhang, F., Zhang, C., Guan, Q., Cao, X., . . . Ou, K. (2015). Circulating lncRNAs associated with occurrence of colorectal cancer progression. *American Journal of Cancer Research*, 5(7), 2258.
- Siddique, H., Al-Ghafari, A., Choudhry, H., AlTurki, S., Alshaibi, H., Al Doghaither, H., & Alsufiani, H. (2019). Long noncoding RNAs as prognostic markers for colorectal cancer in Saudi patients. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 23(8), 509-514.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Fedewa, S. A., Butterly, L. F., Anderson, J. C., . . . Jemal, A. (2020). Colorectal cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*.
- Singh, M. P., Rai, S., Pandey, A., Singh, N. K., & Srivastava, S. (2021). Molecular subtypes of colorectal cancer: An emerging therapeutic opportunity for personalized medicine. *Genes & Diseases*, 8(2), 133-145.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Smith, G., Carey, F. A., Beattie, J., Wilkie, M. J., Lightfoot, T. J., Coxhead, J., . . . Wolf, C. R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9433-9438.
- Smothers, L., Hynan, L., Fleming, J., Turnage, R., Simmang, C., & Anthony, T. (2003). Emergency surgery for colon carcinoma. *Diseases of the colon & rectum*, 46(1), 24-30.
- Stikma, J., Grootendorst, D. C., & van der Linden, P. W. G. (2014). CA 19-9 as a marker in addition to CEA to monitor colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*, 13(4), 239-244.
- Stintzing, S., Tejpar, S., Gibbs, P., Thiebach, L., & Lenz, H.-J. (2017). Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes. *European journal of cancer*, 84, 69-80.
- Sun, W., Ren, S., Li, R., Zhang, Q., & Song, H. (2019). LncRNA, a novel target biomolecule, is involved in the progression of colorectal cancer. *American Journal of Cancer Research*, 9(11), 2515.
- Sun, W., Wang, L., Zhao, D., Wang, P., Li, Y., & Wang, S. (2018). Four circulating long non-coding RNAs act as biomarkers for predicting cervical cancer. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 83(6), 533-539.
- Sun, Z., Liu, J., Chen, C., Zhou, Q., Yang, S., Wang, G., . . . Xu, J. (2018). The biological effect and clinical application of long noncoding RNAs in colorectal cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(2), 431-441.
- Tang, X., Qiao, X., Chen, C., Liu, Y., Zhu, J., & Liu, J. (2019). Regulation mechanism of long noncoding RNAs in colon cancer development and progression. *Yonsei medical journal*, 60(4), 319-325.
- Thélin, C., & Sikka, S. (2015). Epidemiology of colorectal cancer—Incidence, lifetime risk factors statistics and temporal trends. *Screening for colorectal Cancer with colonoscopy*. London: IntechOpen Limited, 61-77.
- Toyota, M., & Issa, J.-P. J. (1999). CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Vukobrat-Bijedic, Z., Husic-Selimovic, A., Sofic, A., Bijedic, N., Bjelogrić, I., Gogov, B., & Mehmedovic, A. (2013). Cancer antigens (CEA and CA 19-9) as markers of advanced stage of colorectal carcinoma. *medical archives*, 67(6), 397.
- Wang, C.-L., Li, J.-C., Zhou, C.-X., Ma, C.-N., Wang, D.-F., Wo, L.-L., . . . Zhao, Q. (2020). Long noncoding RNA ARHGAP5-AS1 inhibits migration of breast cancer cell via stabilizes SMAD7 protein.
- Wang, J.-Y., Wang, Y.-H., Jao, S.-W., Lu, C.-Y., Kuo, C.-H., Hu, H.-M., . . . Lin, S.-R. (2006). Molecular mechanisms underlying the tumorigenesis of colorectal adenomas: correlation to activated K-ras oncogene. *Oncology reports*, 16(6), 1245-1252.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell*, 43(6), 904-914.
- Wang, W., Wang, G.-Q., Sun, X.-W., Chen, G., Li, Y.-F., Zhang, L.-Y., . . . Zhou, Z.-W. (2010). Prognostic values of chromosome 18q microsatellite alterations in stage II colonic carcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 16(47), 6026.
- Wang, W., Yuan, F., & Xu, J. (2019). The prognostic role of long noncoding RNA CRNDE in cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Neoplasma*, 66(1), 73-82.
- Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., . . . Buchanan, D. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature genetics*, 38(7), 787-793.
- Wong, J. J. L., Hawkins, N. J., & Ward, R. L. (2007). Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*, 56(1), 140-148.
- Wu, C., Qiu, S., Lu, L., Zou, J., Li, W.-f., Wang, O., . . . Chen, L. (2014). RSPO2–LGR5 signaling has tumour-suppressive activity in colorectal cancer. *Nature communications*, 5(1), 1-13.
- Xie, X., Tang, B., Xiao, Y.-F., Xie, R., Li, B.-S., Dong, H., . . . Yang, S.-M. (2016). Long non-coding RNAs in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(5), 5226.
- Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y., & Hiraishi, H. (2016). Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chinese journal of cancer*, 35(1), 1-8.
- Ye, Z., Zhou, M., Tian, B., Wu, B., & Li, J. (2015). Expression of lncRNA-CCAT1, E-cadherin and N-cadherin in colorectal cancer and its clinical significance. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(3), 3707.
- You, Z., Liu, C., Wang, C., Ling, Z., Wang, Y., Wang, Y., . . . Guan, H. (2019). LncRNA CCAT1 promotes prostate cancer cell proliferation by interacting with DDX5 and miR-28-5p. *Molecular cancer therapeutics*, 18(12), 2469-2479.
- Yu, N., Zhu, H., Tao, Y., Huang, Y., Song, X., Zhou, Y., . . . Pei, H. (2016). Association between prognostic survival of human colorectal carcinoma and ZNRF3 expression. *OncoTargets and therapy*, 9, 6679.
- Zhai, H.-y., Sui, M.-h., Yu, X., Qu, Z., Hu, J.-c., Sun, H.-q., . . . Jiang, L.-x. (2016). Overexpression of long non-coding RNA TUG1 promotes colon cancer progression. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 22, 3281.
- Zhang, C., Ren, X., He, J., Wang, W., Tu, C., & Li, Z. (2019). The prognostic value of long noncoding RNA SNHG16 on clinical outcomes in human cancers: a systematic review and meta-analysis. *Cancer cell international*, 19(1), 1-14.
- Zhang, C., Wang, W., Lin, J., Xiao, J., & Tian, Y. (2019). lncRNA CCAT1 promotes bladder cancer cell proliferation, migration and invasion. *International braz j urol*, 45(3), 549-559.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Zhang, K., Chen, J., Song, H., & Chen, L.-B. (2018). SNHG16/miR-140-5p axis promotes esophagus cancer cell proliferation, migration and EMT formation through regulating ZEB1. *Oncotarget*, 9(1), 1028.
- Zhang, S.-Y., Lin, M., & Zhang, H.-B. (2015). Diagnostic value of carcinoembryonic antigen and carcinoma antigen 19-9 for colorectal carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(8), 9404.
- Zhao, W., Song, M., Zhang, J., Kuerban, M., & Wang, H. (2015). Combined identification of long non-coding RNA CCAT1 and HOTAIR in serum as an effective screening for colorectal carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(11), 14131.
- Zheng, J., Liu, X., Wang, P., Xue, Y., Ma, J., Qu, C., & Liu, Y. (2016). CRNDE promotes malignant progression of glioma by attenuating miR-384/PIWIL4/STAT3 axis. *Molecular therapy*, 24(7), 1199-1215.
- Zhu, C., Cheng, D., Qiu, X., Zhuang, M., & Liu, Z. (2018). Long noncoding RNA SNHG16 promotes cell proliferation by sponging MicroRNA-205 and upregulating ZEB1 expression in osteosarcoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(1), 429-440.
- Zhu, H., Zhang, L., Yan, S., Li, W., Cui, J., Zhu, M., . . . Chen, X. (2017). LncRNA16 is a potential biomarker for diagnosis of early-stage lung cancer that promotes cell proliferation by regulating the cell cycle. *Oncotarget*, 8(5), 7867.
- Zhu, L., Zhu, Y., Han, S., Chen, M., Song, P., Dai, D., . . . Shin, V. Y. (2019). Impaired autophagic degradation of lncRNA ARHGAP5-AS1 promotes chemoresistance in gastric cancer. *Cell death & disease*, 10(6), 383.
- Zimta, A.-A., Tigau, A. B., Braicu, C., Stefan, C., Ionescu, C., & Berindan-Neagoe, I. (2020). An emerging class of long non-coding RNA with oncogenic role arises from the snoRNA host genes. *Frontiers in oncology*, 10, 389.
- Zisman, A. L., Nickolov, A., Brand, R. E., Gorchow, A., & Roy, H. K. (2006). Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Archives of internal medicine*, 166(6), 629-634.