



**FARKLI EVRE KOLOREKTAL TÜMÖRLERDE
BAZI GENLERİN İFADELENME DÜZEYLERİNİN
ARAşTIRILMASI**

Zafer SÖYLEMEZ

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIşMAN
Prof.Dr. Mustafa SOLAK
Tez No: 2020-001**

2020-Afyonkarahisar

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**FARKLI EVRE KOLOREKTAL TÜMÖRLERDE BAZI
GENLERİN İFADELENME DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Zafer SÖYLEMEZ

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. MUSTAFA SOLAK**

**Bu tez; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Komisyonu tarafından 19.DOK.001 proje numarası ile
desteklenmiştir.**

Tez No: 2020-001

2020-AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından

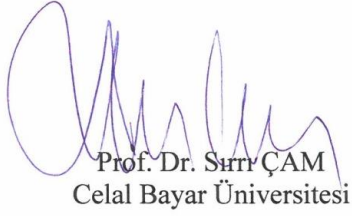
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:../../...



Prof. Dr. Mustafa SOLAK
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri
Üniversitesi

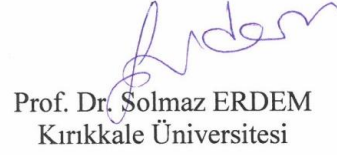
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Şükrü ÇAM
Celal Bayar Üniversitesi

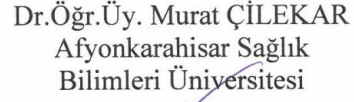
Üye


Prof. Dr. Müjgan ÖZDEMİR
ERDOĞAN
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri
Üniversitesi

Üye

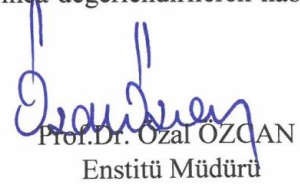

Prof. Dr. Solmaz ERDEM
Kırıkkale Üniversitesi

Üye


Dr. Öğr. Üy. Murat ÇİLEKAR
Afyonkarahisar Sağlık
Bilimleri Üniversitesi

Üye

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Zafer SÖYLEMEZ'in "Farklı Evre Kolorektal Tümörlerde Bazı Genlerin İfadeleme Düzeylerinin Araştırılması" başlıklı tezi 23.03.2022 günü saat 13:00'da Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ozal ÖZCAN
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÖNSÖZ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER.....	viii
TABLolar	ix
GRAFİKLER	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Kolorektal Kanser, Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi	6
2.2. Kolorektal Kanserlerin Genetiği ve Patogenezi	7
2.3. Kolorektal Kanserlerde Evreleme, Teşhis ve Prognoz	12
2.4. Tarama.....	14
2.5. Kolorektal Kanserde Gen Ekspresyon Profillemesi.....	15
2.6. Teşhis, Prognostik Belirteçler ve Gen İfadelenme Profili	16
2.7. Real-Time Polymerase Chain Reaction (Eş - Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi)	17
2.7.1. SYBR Green PZR Nedir?	18
2.8. Kolorektal Kanser ile İlişkili Aday Genler	20
2.8.1. <i>CPEB4</i> (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 4) Geni	20
2.8.2. <i>APC</i> (APC Regulator Of WNT Signaling Pathway) Geni	24
2.8.3. <i>CTNNB1</i> (Catenin Beta 1) Geni	27
2.8.4. <i>TRIP13</i> (Thyroid Hormone Receptor Interactor 13) Geni	28
2.8.5. <i>IFγ</i> (Interferon Gamma) Geni	32
2.8.6. <i>PIK3CA</i> (Phosphatidylinositol - 4,5 - Bisphosphate 3 - Kinase Catalytic Subunit Alpha) Geni	33
2.8.7. <i>EIF2S3</i> (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Subunit Gamma) Geni ...	35

2.8.8. <i>EIF4A1</i> (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1) Geni	35
2.8.9. Kolorektal Kanserle İlişkisi Olduğu Düşünülen Genlerle İlgili Yapılan Bazı Çalışma Örnekleri.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1. Örnek Toplanması.....	40
3.2. Dokulardan Total RNA İzolasyonu	41
3.3. Kandan Total RNA İzolasyonu.....	42
3.4. cDNA Sentezi.....	43
3.5. Hedef genler ve GAPDH için Reaksiyon Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	44
3.6. <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine Ait mRNA seviyelerinin Eş Zamanlı PZR İle Ölçülmesi.....	46
4. BULGULAR.....	48
4.1. Olgulara Ait Klinik ve Demografik Özellikler	48
4.2. <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine İlişkin mRNA Analizleri	48
4.3. Dokularda İfade Edilen <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine İlişkin mRNA Analizleri	53
4.4. Periferik Kan Örneklerinde İfade Edilen <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine İlişkin mRNA Analizleri	53
4.5. Evre I Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Tümör Dokularında İfade Edilen <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine İlişkin mRNA Analizleri	54
4.6. Evre II Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Dokularda İfade Edilen <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine İlişkin mRNA Analizleri	55
4.7. Evre III Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Dokularda İfade Edilen <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine İlişkin mRNA Analizleri.....	56

4.8. Evre IV Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Dokularda İfade Edilen <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine İlişkin mRNA Analizleri.....	57
4.9. Evre I Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Periferik Kan Örneklerinde İfade Edilen <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine İlişkin mRNA Analizleri.....	58
4.10. Evre II Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Periferik Kan Örneklerinde İfade Edilen <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine İlişkin mRNA Analizleri.....	59
4.11. Evre III Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Periferik Kan Örneklerinde İfade Edilen <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine İlişkin mRNA Analizleri.....	60
4.12. Evre IV Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Periferik Kan Örneklerinde İfade Edilen <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>CTNNB1</i> Genlerine İlişkin mRNA Analizleri.....	61
5. TARTIŞMA	63
5.1. Kolorektal Kanser ile <i>CPEB4</i> Gen İfadesinin İlişkisi.....	65
5.2. Kolorektal Kanser ile <i>APC</i> Gen İfadesinin İlişkisi	68
5.3. Kolorektal Kanser ile <i>CTNNB1</i> Gen İfadesinin İlişkisi	70
5.4. Kolorektal Kanser ile <i>TRIP13</i> Gen İfadesinin İlişkisi	72
5.5. Kolorektal Kanser ile <i>IFγ</i> Gen İfadesinin İlişkisi	75
5.6. Kolorektal Kanser ile <i>PIK3CA</i> Gen İfadesinin İlişkisi	76
5.7. Kolorektal Kanser ile <i>EIF2S3</i> Gen İfadesinin İlişkisi.....	78
5.8. Kolorektal Kanser ile <i>EIF4A1</i> Gen İfadesinin İlişkisi	78
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	80
ÖZET.....	85
ABSTRACT	87
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ.....	101
EKLER.....	103

ÖNSÖZ

Doktora tez danışmanım, çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa SOLAK'a, eğitimime sağladığı katkılardan ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim. Hayatım boyunca bilgi ve tecrübeleri ile eğitimime büyük katkı sağlayan, emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen, çok değerli hocam Prof.Dr.Yüksel ARIKAN'a ve tezimin hazırlanmasında her zaman yanımda olan Dr.Öğr.Üy.Evrin Suna ARIKAN ve Öğr.Grv. Tevhide FISTIK'A sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde hiç bir fedakârlığı esirgemeyen, sevgi ve desteğini daima hissettiğim sevgili annem Aysel SÖYLEMEZ ve babam Ahmet SÖYLEMEZ'e çok teşekkür ederim.

Bu tez; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 19.DOK.001 proje numarası ile desteklenmiştir.

SİMGELER ve KISALTMALAR

APC	Adenomatöz polipozis coli
AJCC	Amerika Birleşik Devletleri Kanseri Komitesi
BER	Base-excision repair (Baz eksizyon tamiri)
BRAF	V-raf mürin sarcoma viral onkogen homolog B1
CEA	Carsinoembriyonik antijen
CIN	Kromozomal instabilite
CIMP	CpG adası metilasyon fenotipi
CK20	Sitokeratin 20
CPEB4	Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 4
Ct	Threshold Cycle
CTNNB1	Catenin Beta 1
DCC	Deleted in Colon Cancer
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
eIF2	Ökaryotik çeviri başlatma faktörü-2
EIF2S3	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Subunit Gamma
EIF4A1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1
FAB	Ailesel adenopolipozis coli
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GCC	Guanilil siklaz C
GDP	Guanozindifosfat
GSK	Glikojen sentaz kinaz
GUCY2C	Guanilil siklaz C
GTP	Guanozintrifosfat
GTPaz	Guanozintrifosfataz
HNPCC	Kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser
IFγ	İnterferon Gamma
IFN	İnterferon
KLK6	Kallikrein 6
KRAS	v-Ki-ras2 Kirstensin sarkomu viral onkogen homologu
MMP7	Matris metaloproteinaz 7
MMR	Mismatch repair system (Eşleşme tamir sistemi)
MSI	Mikrosatellit instabilitesi
MUC2	Müsin 2
NER	Nükleotid-excision repair (Nükleotid eksizyon tamiri)
OS	Total survival=Ovaral survival
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
Real-time PCR	Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT	Reverse transkripsiyon
SCNA	Somatik Kopya Sayısı Değişimi
SMAD2	SMAD Family Member 2
SMAD4	SMAD Family Member 4
SNP	Single Nucleotide Polymorphism= Tek Nükleotid Değişimi
TCGA	Kanser Genom Atlası
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
TRIP13	Thyroid Hormone Receptor Interactor 13

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Çok basamaklı karsinogenez aşamaları.....	8
Şekil 2.2. Amplifikasyon grafiği.	18
Şekil 2.3. SYBR Green PZR prensibi	19
Şekil 3.1. Çalışmaya aldığımız bir olguya ait RNA ölçüm bilgileri	44
Şekil 3.2. Farklı cDNA dilüsyonlarıyla amplifiye edilen genler için için örnek erime eğrileri	45
Şekil 4.1. Eş Zamanlı PZR ekspresyon reaksiyon örneği	49
Şekil 4.2. APC ve GAPDH erime eğrisi örneği.....	50
Şekil 4.3. PIK3CA, IFN γ ve GAPDH erime eğrisi örneği.....	50
Şekil 4.4. EIF2S3 ve GAPDH erime eğrisi örneği	51
Şekil 4.5. EIF2S3 ve GAPDH erime eğrisi örneği	51
Şekil 4.6. CTNNB1 ve GAPDH erime eğrisi örneği.....	52
Şekil 4.7. TRIP13 ve GAPDH erime eğrisi örneği.....	52
Şekil 4.8. CPEB4 ve GAPDH erime eğrisi örneği	52

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. Kolon ve rektum tümörlerinde <i>UICC/TNM/pTNM</i> sınıflaması	12
Tablo 3.1. cDNA sentez reaksiyon karışımı.....	44
Tablo 3.2. cDNA sentezi reaksiyon protokolü	44
Tablo 3.3. Hedef genlere ve referans gene ait baz dizileri	46
Tablo 3.4. Eş Zamanlı PZR reaksiyon karışımı.....	47
Tablo 3.5. <i>CPEB4</i> , <i>APC</i> , <i>TRIP13</i> , <i>EIF2S3</i> , <i>EIF4A1</i> , <i>CTNNB1</i> ve <i>GAPDH</i> amplifikasyon protokolü	47
Tablo 3.6. <i>IFNγ</i> , <i>PIK3CA</i> ve <i>GAPDH</i> amplifikasyon protokolü	47
Tablo 4.1. Olgulara ait klinik ve demografik özellikler	48

GRAFİKLER

Sayfa

Grafik 4.1. Tümör dokularının, kontrol dokularına göre gen ifade düzeylerindeki değişimler	53
Grafik 4.2. Çalışmamızda yer alan genlerin, hasta olguların periferik kan örneklerindeki kontrole göre ifade değişimleri.	54
Grafik 4.3. Evre I kolorektal tümörlerde çalışmamızda yer alan genlerin kontrole göre mRNA düzeyindeki değişimleri	55
Grafik 4.4. Evre II kolorektal tümörlerde çalışmamızda yer alan genlerin kontrole göre mRNA düzeyindeki değişimleri.....	56
Grafik 4.5. Evre III kolorektal tümörlerde ilgili genlerin kontrole göre mRNA düzeyindeki değişimleri.	57
Grafik 4.6. Evre IV kolorektal tümörlerde ilgili genlerin kontrole göre mRNA düzeyindeki değişimleri	58
Grafik 4.7. Çalışmamızda yer alan genlerin, Evre I kolorektal kanserli olguların periferik kan örneklerindeki kontrole göre ifade değişimleri.....	59
Grafik 4.8. Çalışmamızda yer alan genlerin, Evre II kolorektal kanserli olguların periferik kan örneklerindeki kontrole göre ifade değişimleri	60
Grafik 4.9. Çalışmamızda yer alan genlerin, Evre III kolorektal kanserli olguların periferik kan örneklerindeki kontrole göre ifade değişimleri.....	61
Grafik 4.10. Çalışmamızda yer alan genlerin, Evre IV kolorektal kanserli olguların periferik kan örneklerindeki kontrole göre ifade değişimleri.....	62

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kolon ya da rektumdan köken alan kanserlere kolorektal kanser adı verilir. Kolorektal kanser dünyada en yaygın üçüncü kanser tipi olup kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir (Favoriti ve ark., 2016). Dünyada tahmini 1.8 milyon yeni vaka ile önemli bir sağlık sorunudur (Parkin ve ark., 2005). Erken teşhis, prognozun iyileştirilmesiyle ilişkilidir ve genetik biyobelirteçlerin tanımlanması ve mevcut kullanılabilir tanılama araçlarının geliştirilmesiyle ilişkilidir (Lagerstedt, 2009).

Karsinogenez çalışmalarına gen ifadenme profillerinin uygulanması, tümör gelişimine göre gen ifadenmesi üzerindeki spesifik değişiklikleri tanımlamayı ve moleküler özelliklere göre tümörleri teşhis ve sınıflandırılmasını amaçlamaktadır. Normal mukoza, adenom ve karsinoma ait ayırd edici genetik işaretleri belirlemek için gen karşılaştırma çalışmaları yapılmaktadır. Prognoz tahmin çalışmaları, düşük riskli kolorektal kanserden yüksek riski ayırt etmek, klinik sonuca göre moleküler işaretler sağlamak, primer tümörün metastatik potansiyelini tahmin etmek için kullanışlı olabilecek gen ifadenme profilindeki spesifik değişimleri tanımlamayı amaçlar (Kheirelseid, 2011).

Tümör ve normal kolorektal dokular arasındaki gen ifadenme seviyelerindeki farkı araştırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Tamamlanan bazı çalışmalarda, kanser ile normal doku arasında farklı şekilde eksprese edilen ve bu nedenle potansiyel olarak kolorektal karsinogenez gelişiminde rol oynayan bazı gen grupları bildirilmiştir (Kitahara ve ark., 2001; Lin ve ark., 2002; Zou ve ark., 2002; Kwon ve ark., 2004; Friederichs ve ark., 2005). Yine bazı çalışmalarda adenom ve normal mukoza arasındaki gen ifadenme profilinde önemli farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Bu prekanseröz lezyonlar farklı gelişim mekanizmalarının mevcut olabileceğini düşündürmektedir (Kita ve ark. 2006; Kim ve ark., 2008). Ayrıca metastaz gelişiminin altında yatan moleküler modifikasyonları açıklığa kavuşturmak için, primer tümörlerin gen ifadenme profilleri kendilerine ait metastazlarla

karşılaştırılmıştır (Yanagawa ve ark., 2001; Agrawal, 2002; Koehler ve ark., 2004; Ki ve ark., 2007; Lin ve ark., 2007). Agrawal ve ark. (2002) hastalık ilerlemesiyle ilişkili tüm genler arasında osteopontin ifadenmesinin önde gelen aday gibi görüldüğünü bildirmiştir. Yanagawa ve ark. (2001), 10 primer kolorektal kanser genom-boyu ekspresyon profillerini ve karşılık gelen karaciğer metastazını analiz etmişler ve 40 genin ifadenmesinin metastatik lezyonlarda yaygın olarak arttığı ve 7 genin ifadenmesinin de yaygın olarak azaldığını tanımlamışlardır. Diğer yandan; Watanabe ve ark. (2009) lenf nodu metastazının karakterizasyonu ve tahmini için kullanılabilecek bir dizi ayırıcı gen setini tanımlamak için 89 kolorektal kanser hastasını çalışmış ve lenf nodu metastazı olan ve olmayan hastalar arasında 73 genin ifadenmesinin önemli ölçüde farklı olduğunu bildirmişlerdir. Bu gen setini kullanarak, %88.4'lük bir doğrulukla lenf nodu metastazının varlığını tahmin etmek için bir model oluşturmuşlardır.

CPEB4 ile ilişkili mRNA'lar, RAS ile ilişkili moleküller, hücre sinyal bileşenleri, kromatin yeniden modelleme proteinleri, siklinler, apoptoza bağlı moleküller, stres ve inflamasyon faktörleri, metabolik hücre göçü ve metastazı ile ilgili enzimler ve genlerin dahil olduğu tümörögenез ilişkili çoklu hücresel fonksiyonlarla zengin bir yelpazede eksprese edilir (Ortiz-Zapater ve ark., 2012). Ayrıca, *CPEB4*'ün invaziv duktal meme kanserinde, kolorektal kanserde, pankreatik duktal adenokarsinomda, metastatik prostat kanserinde ve glioblastomada, invazyon, tümör büyümesi, vaskülarizasyon ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Ortiz-Zapater ve ark., 2012; Xu ve ark., 2013; Zhong ve ark., 2013; Sun ve ark., 2015; Chen ve ark., 2016).

APC genindeki mutasyonlar, Familial Adenomatöz Polipozi koli'de (FAP) kolorektal kansere kalıtsal yatkınlığın temelidir ve aynı zamanda sporadik kolorektal tümörlerin oluşmasında birincil nedendir. *APC* mutasyonlarının diğer kanser tümör tiplerinde neden daha az bulunduğu henüz net bilinmemektedir. Mutant *APC* ayrıca, kanser ilerlemesinde rol oynayan hücre iskeleti yapışmasını ve stabilitesini bozabilir. Düşük penetranslı *APC* mutasyonlarının veya missens varyantlarının kalıtsal kolorektal kanser riskine katkısı hakkında daha fazla araştırma yapılması

gerekmektedir. APC'nin hem genetik hem de biyolojisinin daha iyi anlaşılması, zaman içinde, özellikle kolorektal kanser yükünü azaltmayı hedefleyen önleyici veya terapötik stratejilerle sonuçlanabilir (Nicola ve ark., 2001).

CTNNB1 genindeki somatik mutasyonlar, birçok kanser türünde tanımlanmıştır. Bunlar arasında kolorektal, karaciğer, tiroid, yumurtalık, endometriyal ve cilt kanserleri ile medulloblastom adı verilen bir beyin tümörü bulunur. Çalışmalar, *CTNNB1* genindeki fonksiyon kazancı mutasyonlarının, artık ihtiyaç duyulmadığında beta-katenin parçalanmasını önlediğini ve proteinin hücreler içinde birikmesine izin verdiğini göstermektedir. Fazla beta-katenin hücre çekirdeğine geçer ve kanserli tümörlerin gelişmesine izin vererek hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını destekler. *CTNNB1* genindeki mutasyonlar, normal hücrelerin kanserli hale gelmesine neden olabileceğinden, *CTNNB1* onkogenler olarak bilinen bir gen sınıfına aittir. Bazen, diğer onkogenlerdeki mutasyonlar, kansere neden olmak için *CTNNB1* gen mutasyonları ile birlikte ortaya çıkar (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1#>).

TRIP13'ün mayotik rekombinasyon, iğ kontrol noktası ve kromozom sinapslarında anahtar rol oynadığı bulunmuştur (Vader, 2015). Yapılan çalışmalar *TRIP13*'ün çoklu neoplazmlarda aşırı eksprese edildiğini göstermiştir (Banerjee ve ark., 2014; Tao ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2017). Japonya'da yapılan bir çalışma, *TRIP13*'ün kolorektal kanser hücrelerinde onkogen olarak hareket edebileceğini, ancak mekanizmanın netleştirilmediğini göstermiştir (Kurita ve ark., 2016). Sheng ve ark., (2018) *TRIP13*'ün in vitroda kolorektal kanser hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve istilasını ve deri altı implante edilmiş tümör oluşumunu destekleyebileceğini göstermek için birçok yöntem kullanmışlar ve sonuçlara göre kolorektal kanser hastalarının hayatta kalma sürelerinin düşük olduğunu rapor etmişlerdir.

IF γ , viral ve hücre içi bakteriyel enfeksiyonlara ve tümör kontrolüne karşı doğal ve adaptif bağışıklık için kritik öneme sahip bir proinflamatuvar sitokindir. CD4 Th1 hücreleri ve CD8 hücreleri *IF γ* üretmektedir. *IF γ* ayrıca enfeksiyon üzerine hızlı

indüksiyona izin veren IF γ mRNA'yı yapısal olarak eksprese eden natural killer hücreler ve natural killer T hücreleri tarafından üretilir. IF γ , MHC sınıf I ve II moleküllerinin yüzey ekspresyonunu düzenleyerek antijen sunumunu artırır. IFN γ , hücre içi bakteri ve virüslere yanıt olarak makrofajların aktivasyonu için de önemlidir. Azalan IF γ indüksiyonu veya sinyali, hücre içi bakterilere, bazı virüslere ve tümör başlangıcına karşı artan duyarlılık ile ilişkilidir (Akdis ve ark., 2011).

PIK3CA, EGFR tirozin-kinaz domaininde yer alan fosfatidilinositol-3-kinazları (PI3K) kodlayan bir proto-onkojendir ve AKT'nin fosforilasyonuna ve AKT-mTOR sinyal yolunun aktivasyonuna yol açar (Fernandes ve ark., 2018). Fosfoinositol-3-kinaz (PI3K) yolağı, insan kanserlerinde bir viral onkoprotein ile ilişkili bir enzimatik aktivite olarak keşfedilmiştir. Bu yolak, insan kanser çalışmalarında çok dikkat çekmiştir, çünkü hücre döngüsü, proliferasyon, büyüme, hayatta kalma, protein sentezi ve glikoz metabolizması için önemlidir (Vivanco ve Sawyers, 2002). PI3K yolağındaki düzensizlik tüm kanserlerin yaklaşık %30'unda görülmektedir. Bu deregülasyon çeşitli genetik ve epigenetik mekanizmalar yoluyla gerçekleşir ve çok çeşitli tümör tiplerine yol açar (Ipsida ve Mandal, 2012).

EIF2S3 geni, metiyonil-tRNA (i)'nin 40S ribozomal alt birimine dahil edilmesinde rol oynayan bir heterotrimerik GTP bağlayıcı protein olan ökaryotik çeviri başlatma faktörü-2'nin (eIF2) çekirdek alt birimini kodlar. EIF2 kompleksi protein sentezi için gereklidir (Moortgat ve ark., 2016). EIF4A ise DEAD kutusu protein ailesinin bir üyesidir ve 5'UTR'de mRNA sekonder yapısının çözülmesini katalize etmek için ATP'ye bağlı bir RNA helikaz olarak işlev görür (Rogers ve ark., 2002). Bu genler de tümör gelişiminde çalışılmaya başlanmış genlerdir.

Bu tez çalışması kapsamında, kolorektal kanserle ilişkisi olabileceği düşünülen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerinin;

- **Kolorektal kanser tümörlerinde ve normal kolon dokusunda ifadenme düzeyleri,**

- Farklı evre kolon kanseri tümörlerinde ve normal kolon dokusunda ifadenme düzeyleri,
- Kolorektal kanser tanıı olgular ile kontrol grubu bireylere ait periferik kan örneklerinde ifadenme düzeyleri,
- Farklı evre kolorektal kanser tanıı olgular ile kontrol grubu bireylerin periferik kan örneklerinde ifadenme düzeyleri belirlenmiştir.
- Periferik kan ile tümör dokularındaki ifadenme farklılıkları değerlendirilmiştir.

Yaptığımız literatür taramasına göre; kolorektal kanserde *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerinin mRNA düzeylerindeki değişimlerin ilk defa bizim çalışmamızda değerlendirildiği görülmüştür.

Çalışmamızda yer alan kolorektel kanser tanıı 45 olguda söz konusu genlere ait ifade değerleri hem kanda hem de tümör dokularında belirlenmiş, bunun yanı sıra kolorektal kanser evreleri bakımından da değerlendirilmiştir.

Sonuçlarımız kolorektel kanser ile *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genleri arasındaki ilişkinin ortaya konması açısından ülkemizdeki ilk veriler olma özelliğini taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser, Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Kolon ya da rektumdan köken alan kanserlere kolorektal kanser adı verilir. Kolorektal kanser dünyada en yaygın üçüncü kanser tipi olup kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir (Favoriti ve ark., 2016). Erken teşhis, prognozun iyileştirilmesiyle ilişkilidir. Genetik biyobelirteçlerin tanımlanması mevcut kullanılabilir tanılama araçlarının geliştirilmesiyle ilişkilidir (Lagerstedt, 2009).

Kolorektal kanser vakalarının çoğu sporadiktir, ancak kalıtsal faktörler de önemli rol oynamaktadır. Büyük olasılıkla, kolorektal kanserin birden fazla nedeni vardır. Kolorektal kanser için önemli bir risk faktörü uzun süredir devam eden inflamatuvar bağırsak hastalığıdır. Obezite, yüksek yağlı ve düşük lifli diyet, alkol tüketimi ve sigara içilmesi de diğer çevresel risk faktörleridir (Mattar ve ark., 2011; Wei ve ark., 2004). Kolorektal kanser insidansı yaşla birlikte artmaktadır ve düzenli fiziksel aktivite düşük kolorektal kanser riski ile ilişkilidir (Wei ve ark., 2004). Dışkıda kan ve mukuslu dışkı kolorektal kanser ile ilişkili yaygın semptomlardır ancak hastaların asemptomatik de olabilir (Rubin, 2001).

Kolorektal kanser, kolon, rektum ve/veya devamında kanserli büyümelerle tanımlanır. Kolorektal kanserlerin %95'inden fazlası glandüler epitelden gelişen adenokarsinomlardır. Kolorektal kanser, genellikle uzun bir süre yavaş yavaş gelişen bir dizi iyi tanımlanmış morfolojik adımda ilerler. Kolorektal kanserin kaynağı, kolorektal epitelyumda adenom adı verilen, yavaş yavaş büyüyerek malign bir fenotipe dönüşene kadar hücre içi organizasyonunda gittikçe daha düzensiz hale gelen küçük, iyi huylu bir tümör veya poliptir (Rubin, 2001).

Tanı ve tedavideki bazı ilerlemelere rağmen, bu hastalık çok sayıda insanın yaşamını tehdit etmektedir. Hastaların yaklaşık %20'sinde metastaz yapar ve

kolorektal kanserlerin %30'u tekrar eder (Comber ve Walsh, 2008). Genel olarak kolorektal karsinom, kalıtsal etkinin ve kanser riskinin artmasına bağlı olarak üç kategoriye ayrılır (Ivanovich ve ark., 1999):

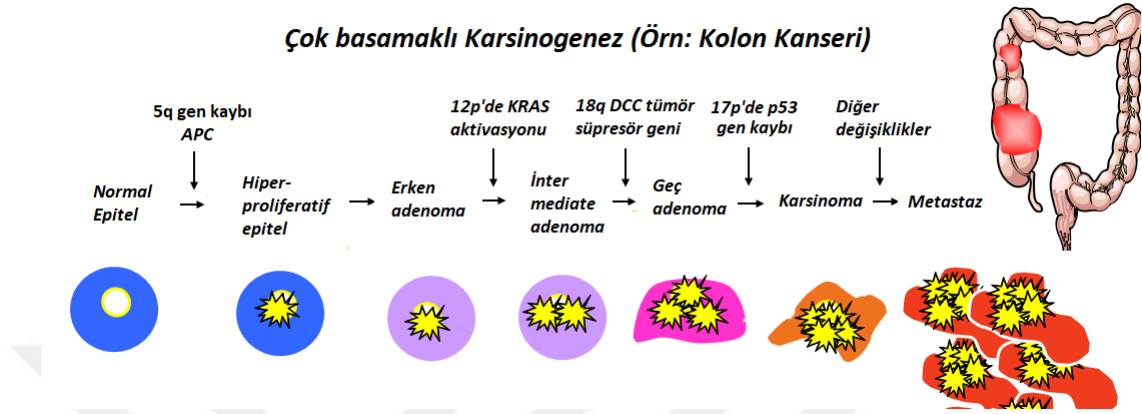
1. Sporadik kolorektal kanser, hastaların **yaklaşık %60'ını** oluşturur ve kayda değer aile öyküsü olmayan ve tanım gereği, kanser gelişimini hızlandıran tanımlanabilir kalıtsal gen mutasyonu olmayan hastaları içerir.
2. Ailesel kolorektal kanser, vakaların **yaklaşık %30'unu** oluşturur. Kolorektal kanser veya adenom ile ilgili bir akrabası olan, ancak spesifik bir germ hattı mutasyonu veya net bir kalıtım kalıbı olmayan hastaları ifade eder.
3. Olguların **yaklaşık %10'unu** oluşturan gerçek kalıtsal kolorektal kanser sendromları, kanser duyarlılık genlerindeki tek gen mutasyonlarının kalıtımından kaynaklanır. Her ne kadar son kanser grubu en düşük sıklıkta ortaya çıksa da, açık kalıtım kalıpları ve anahtar patojenik genlerin tanımlanması nedeniyle, sporadik kolorektal kansere uygulanabilen karsinogenezin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına yardımcı olmuştur.

Kolorektal kanserlerin moleküler ve biyolojik karakteristiklerinin yoğun biçimde araştırılması sayesinde, son yıllarda kanser patogenezinin anlaşılmasında oldukça aydınlatıcı bilgiler elde edilmiştir. Genetik ve çevresel faktörlerin etkisi altında uzun bir süreç sonucu gelişen kolorektal kanserlerin daha erken evrede yakalanabilmeleri, bu tümörlerin hem tedavileri hem de prognozları açısından daha da olumlu sonuçlar doğuracaktır.

2.2. Kolorektal Kanserlerin Genetiği ve Patogenezi

Onkogen ve tümör baskılayıcı gen mutasyonlarının hepsi fizyolojik seviyede benzer şekilde çalışır: hücre bölünmesinin uyarılması veya apoptoz veya hücre döngüsünün engellenmesinin inhibisyonu yoluyla tümör hücre sayısını artırarak

neoplastik süreci yönlendirirler. Hücre sayısındaki artış, hücre döngüsünü yönlendiren genlerin aktive edilmesinden, normal apoptotik süreçlerin inhibe edilmesinden veya gelişmiş anjiyogenez yoluyla besin sağlanmasının kolaylaştırılmasından kaynaklanmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çok basamaklı karsinogenez aşamaları (Fearon ve Vogelstein, 1990'dan değiştirilerek.)

Stabilite genleri olarak adlandırılan **üçüncü bir kanser gen sınıfı, mutasyona uğradığında, tümörjenezini tamamen farklı bir şekilde teşvik eder.** Bu sınıf, normal DNA replikasyonu sırasında yapılan veya mutajenlere maruz kalmanın neden olduğu substitüsyon hatalarını (yer değiştirme) onarmaktan sorumlu olan;

- i) Uyumsuzluk onarımı (**MMR=Mismatch repair**),
- ii) Nükleotid eksizyon onarımı (**NER=Nucleotide-excision repair**) ve
- iii) Baz eksizyon onarımı (**BER=Base-excision repair**) genlerini içerir.

Stabilite genleri genetik değişiklikleri minimumda tutar. Bu nedenle inaktif hale geldiklerinde diğer genlerdeki mutasyonlar daha yüksek bir oranda meydana gelir (Friedberg, 2003).

Sonuç olarak tüm genler, ortaya çıkan mutasyon oranının artmasından potansiyel olarak etkilenir, ancak yalnızca onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, hücre büyümesi sürecini etkiler ve bu nedenle mutant hücreye seçici bir büyüme avantajı sağlayabilir. Tümör baskılayıcı genlerde olduğu gibi, fizyolojik bir etkinin ortaya çıkması için stabilite genlerinin her iki aleli de inaktive edilmelidir. Bu üç gen sınıfındaki mutasyonlar germ hattında meydana

gelirse kanser için katılsal bir yatkınlığa veya tek somatik hücrede meydana gelirse sporadik tümörlere neden olur (Nowell, 2002).

Kolorektal kanser, normal kolon epitelyumunun kolon adenokarsinomuna dönüşmesine yol açan genetik ve epigenetik değişikliklerin ilerleyen birikiminden kaynaklanır. Kolorektal kanserin moleküler oluşumu analiz edildiğinde, kanserin patogeneziyle ilişkin **dört ilke belirlendiği** görülmektedir.

Bunlar sırasıyla şöyledir;

- i) Birincisi, kolon kanseri oluşumunun altında yatan genetik ve epigenetik değişikliklerin kanser oluşum sürecini teşvik etmesidir. Bu durum değişiklikleri biriktiren hücrelere klonal bir büyüme avantajı sağlar.
- ii) İkinci ilke, kanserin hem moleküler hem de morfolojik seviyelerde çok aşamalı bir ilerleme ile ortaya çıkmasıdır (Fearon ve Vogelstein, 1990).
- iii) Üçüncüsü, genomik stabilite kaybının kanser oluşumunda önemli bir moleküler adım olmasıdır (Lengauer ve ark., 1998).
- iv) Dördüncüsü, kalıtsal kanser sendromlarının ortaya çıkmasına neden olan anahtar genetik defektlerin sıklıkla germ hattı formlarına karşılık gelmesidir ki bundan sonra devam eden somatik oluşumları sporadik kolon kanserlerinin ortaya çıkmasına neden olur (Kinzler ve Vogelstein, 1996).

Kolorektal kanserler ister sporadik olsun, isterse herediter, genetik değişiklikler sonucu meydana gelir. **Kolorektal kanser oluşumu için kromozomal instabilite ve mikrosatellit instabilite önemlidir.**

Kolorektal kanserin patogenezi karmaşık olup çok çeşitli faktörlere bağlıdır. Hem genetik değişiklikler hem de epigenetik yollar, malign dokunun gelişiminde önemli roller oynar.

Kolorektal kanserin malign transformasyonunda dört ana moleküler yolak tanımlanmıştır:

- i) Kromozomal instabilite (**CIN**) yolağı,
- ii) CpG adası metilatör fenotipi (**CIMP**) yolağı
- iii) Mikrosatellit instabilitesi (**MSI**) yolağı ve
- iv) **Serrated yolağı.**

Bu yolaqlara ek olarak diğerk genetik değışiklikler ve kronik inflamasyon da önemlidir.

i. **CIN-yolu**, kolorektal kanser’de en yaygın genetik sapmadır. **Tüm kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %85’inde mevcut olup**, kötü prognoz ile ilişkilidir. Kromozomlarda anöploidi ve yapısal değışiklikler ile tanınır ve adenomatöz polipozis koli (**APC**) ve v-Ki-ras2 Kirsten sıçan sarkomu viral onkogen homolog (**KRAS**) genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir. **APC** mutasyonu, (**DCC**), (**SMAD2**) ve/veya **SMAD4**’ün delesyonuyla birlikte bulunabilir. **SMAD2** ve **SMAD4**, proliferasyon yollarının kontrolünde yer alır. **APC** bir tümör baskılayıcı gendir ve bu genin mutasyonları çoğukolorektal kanserde ve ayrıca adenom gelişiminin başlarında bulunur. **APC** proteini, mikrotübül oluşumunda rol oynar ve β -katenin gibi çeşitli proteinlerle etkileşim gibi çeşitli işlevlere sahiptir. **APC genindeki kalıtsal mutasyonlar Familial Adenomatöz Polipozi koli (FAP) olarak bilinir.** **KRAS**, hücre proliferasyonunu kontrol eden transdüksiyon ve hücre içi sinyalizasyon için önemli bir proto-onkogendir. **KRAS** proteini, hücre zarın iç yüzeyinde bulunur ve aktif halde GTP’ye bağlanır. GTP’nin GDP’ye hidrolizi ile inaktif hale geçer. **KRAS**’ın yolak devamındaki aracılarının mutasyonları, GTPaz aktivitesinde azalmaya neden olarak **KRAS**’ın sürekli aktif kalmasına neden olur. Kolorektal kanser vakalarının %50’sinden fazlasında **KRAS** mutasyonu vardır (Harrison ve Benziger, 2011).

ii. *Kolon dokusunun malign transformasyonunu destekleyen ikinci en yaygın yol*, tüm **kolorektal kanser vakalarının %15’ini oluşturan CIMP-yoludur.** Bu yol, tümör baskılayıcı gen promotörlerinin hipermetilasyonunun neden olduğu epigenetik instabilite ile karakterizedir. Promotörler hipermetilasyona duyarlı

CpG adaları içerir. Tanımlanmış bir CIMP kolorektal kanser tümörü, CpG adası ile ilişkili genlerin bir panelinden en az üç lokusta metilasyona sahip olmalıdır.

iii. **MSI yolağı**, genom boyunca bulunan nükleotid tekrar dizilerinde mutasyonlar meydana geldiğinde ortaya çıkar. MSI, DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz tarafından yapılan hataları düzeltme işlevi gören uyumsuzluk onarım (MMR: Mismatch Repair System) sistemi ile yakından ilgilidir. MSI, kararsızlık derecesine bağlı olarak genellikle MSI-düzeyi yüksek ve MSI-düzeyi düşük olarak değerlendirilmeleri yapılır. MSI düzeyleri yüksek (pozitif) tümöre sahip kolorektal kanser hastalarının genellikle CIN tümörü olan hastalara göre daha iyi prognozu vardır. Kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser (HNPCC) hastalarında MMR genlerinde germ hattı mutasyonları vardır.

iv. **Serrated yolağı**: Daha önce hiperplastik poliplerin iyi huylu olduğu düşünülüyordu, ancak şimdi geleneksel serrated adenomlar, sesil serrated adenomlar veya gerçek hiperplastik polipler olarak sınıflandırılıyorlar. Geleneksel serrated adenomlar anormal hücrelerin tek tip popülasyonunu içerirken, sesil serrated adenomlar içermez. Serrated adenokarsinomların çoğu MSI-düşüktür ve geleneksel serrated adenomlardan kaynaklanır. KRAS mutasyonları geleneksel serrated adenom lezyonlarının %80'inde ve BRAF mutasyonları sesil serrated adenom lezyonlarında bulunur. Hem KRAS hem de BRAF genleri hücre çoğalmasında rol oynar (Harrison ve Benziger, 2011).

Dört ana patojenik yolağa ek olarak, malign kolon dokusunun gelişimine katkıda bulunan mutasyonlardan etkilenen başka yollar da vardır.

i. **TGF- β yolu** hücresel çoğalma, farklılaşma ve apoptozda rol oynar ve bu yoldaki değişiklikler habis kolon dokusunda yaygındır. Tümör baskılayıcı gen *DCC'nin* kaybı da kolorektal kanserde yaygındır ve daha kötü prognoz ile ilişkilidir.

ii. P53 mutasyonları tüm kolorektal kanserlerin %50'sinde bulunur. p53, DNA hasarı meydana geldiğinde hücrelerin S-fazına girmesini engelleyen ve böylece DNA onarımı için zaman tanıyan negatif bir hücre bölünmesi düzenleyicisidir.

iii. EGFR yolu, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve apoptozda rol oynar. *EGFR*'nin artan ifadenmesi, kolorektal kanserin daha ileri bir evresi ile ilişkilidir ve tümörün invazivliği ile ilişkilidir (Harrison ve Benziger, 2011).

2.3. Kolorektal Kanserlerde Evreleme, Teşhis ve Prognoz

Patolojik raporların tutarlılığı ve standartı için, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) (Hamilton ve Aaltonen, 2000) tarafından önerilen uluslararası düzeyde kabul edilen kolorektal kanserin histolojik sınıflandırması kullanılmaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Kolon ve rektum tümörlerinde UICCTNM/pTNM sınıflaması (Kuzu ve Kuzu, 2010'dan değiştirilerek)

<i>T/pT-Primer tümör</i>	
TX/pTX	Primer tümör değerlendirilemiyor
TO/pTO	Primer tümöre ait bulgu yok
Tis/pTis	Karsinoma in situ: intraepitelyal ya da lamina propria'nın invazyonu ³
T1/pT1	Tümör submukozaya invaze
T2/pT2	Tümör muskularis propriaya invaze
T3/pT3	Tümör muskularis propriayı aşmış ve subserosa ya da peritonla kaplı olmayan perikolik/perirektal dokuya invaze
T4/pT4	Tümör direkt olarak diğer organ ya da yapılara yayılmış ^{b,c} ve/veya Visseral peritonu perforé etmiş
<i>N/pN- Bölgesel lenf bezleri⁰</i>	
NX/pNX	Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemiyor
NO/pNO	Bölgesel lenf bezi metastazı yok
N1/pN1	1-3 adet perikolik ya da perirektal lenf bezi metastazı
N2/pN2	4 ve daha fazla perikolik ya da perirektal lenf bezi metastazı
<i>M/pM-Uzak metastaz</i>	
MX/pMX	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
MO/pMO	Uzak metastaz yok
M1/pM1	Uzak metastaz

Tablo 2.1 (Devam). Kolon ve rektum tümörlerinde UICCTNM/pTNM sınıflaması (Kuzu ve Kuzu, 2010'dan değiştirilerek)

Her anatomik bölge için bölgesel lenf bezleri

Appendiks	İleokolik
Çekum	İleokolik, sağ kolik
Çıkan kolon	İleokolik, sağ kolik, orta kolik
Hepatik fleksura	Sağ kolik, orta kolik
Transvers kolon	Sağ kolik, orta kolik, sol kolik. inferior mezenterik
Splenik fleksura	Orta kolik, sol kolik. inferior mezenterik
İnen kolon	Sol kolik, inferior mezenterik
Sigmoid kolon	Sigmoid, sol kolik, superior rektal (hemoroidal). inferior mezenterik. ve rektosigmoid
Rektum	Superior, ortal, and inferior rektal (hemoroidal). inferior mezenterik. internal iliak. mezorektal (paraproktal), lateral sakral. presakral, sakral promontoryum (Gerota)

Alt Dallar (mevcut *TNM/pTNM* kategorilerinin opsiyonel alt grupları)

pT3

pT3a	Minimal: tümör muskularis propriayı aşmış ve subserosa ya da peritonla kaplı olmayan perikolik/ perirektal dokuya invaze, muskularis proprianın dış sınırından 1 mm ya da daha az taşma var
pT3b	Hafif: tümör muskularis propriayı aşmış ve subserosa ya da peritonla kaplı olmayan perikolik/perirektal dokuya invaze, muskularis proprianın dış sınırından taşma 1 mm'den fazla ancak 5 mm'den az
pT3c	Orta: tümör muskularis propriayı aşmış ve subserosa ya da peritonla kaplı olmayan perikolik/perirektal dokuya invaze, muskularis proprianın dış sınırından taşma 5 mm'den fazla ancak 15 mm'den az
pT3d	Yaygın: tümör muskularis propriayı aşmış ve subserosa ya da peritonla kaplı olmayan perikolik/ perirektal dokuya invaze, muskularis proprianın dış sınırından 15 mm'den fazla taşma var
pT4	
pT4a	Visseral periton perforasyonu olmaksızın komşu organ ve yapılara yayılım
pT4b	Visseral peritonun perforasyonu

Not: Klinik sınıflamanın (TNM) tanımları patolojik sınıflamanın (pTNM) tanımlarına karşılık gelmektedir.

^aBu grup bezlerde bazal membranla (intraepitelyal) ya da lamina propria (intramukozal) ile sınırlanmış muskularis mukozayı aşıp submukozaya geçmemiş kanser hücreleri içermektedir.

^bT4pT4'teki direkt invazyon, kolorektumun diğer kısımlarının seroza yoluyla invazyonunu içermektedir. Ör. Sigmoid kolonun çekum kanseri ile invazyonu

^cMakroskopik olarak diğer organ ve yapılara yapışık olan tümör T4 olarak sınıflandırılır. Ancak, Yapışıklık içerisinde tümör mikroskopik olarak mevcut değilse, sınıflandırma T3 şeklinde olmalıdır.

^dHistolojik olarak içerisinde residüel lenf bezi gösterilmeksizin perikolik/perirektal yağ dokusu içerisinde tümör nodüllü mevcutsa ve nodül lenf bezine benzer yapı ve düzgün konturlara sahipse, bu durum pN kategorisinde bölgesel lenf bezi metastazı olarak kabul edilir. Eğer nodül irregüler kontura sahipse T kategorisine göre değerlendirilmeli, ayrıca VI (mikroskopik venöz invazyon) ya da V2 (makroskopik olarak belirgin invazyon) olarak kodlanmalıdır.

Kolorektal kanserin evrelemesi, kanserin çevre dokuya ve uzak metastazlara penetrasyonunun kombine ölçümü olarak tanımlanabilir. Mevcut evreleme sistemi olan TNM sınıflandırması, en son ve günümüzde en sık kullanılan kolorektal kanser evreleme sistemidir. **Primer tümörün derece ve boyutu (T), bölgesel lenf nodu durumu (N) ve uzak metastaz (M)** durumuna göre olgular I.-IV. evre olarak sınıflandırılır. **T bağırsak dokusuna invaze olma derecesini, N lenf nodu tutulum derecesini, M ise uzak metastaz bulunup bulunmadığını tanımlar.**

Doğru lenf nodu durumunu tespit edebilmek için olabildiğince çok sayıda bölgesel lenf nodu toplanmalı ve en az 12 adet olması tavsiye edilmektedir. (AJCC, 2010; Obrocea, 2011). Klinik uygulamada histopatoloji tümör evrelemesi için kullanılır. Histopatolojik incelemelerde doku kesitleri, lokal tümör invazyonunu ve lenf düğümlerinde kolorektal kanser metastazlarının varlığını araştırmak için hematoxilen ve eozin (H&E) ile boyanır (Zlobec ve Lugli, 2008).

2.4. Tarama

Erken evre ve prekanseröz lezyonlar ileri evreden daha başarılı bir şekilde tedavi edilebildiğinden, kolorektal kanserin erken evresinde daha fazla olgu teşhis edilirse genel sağkalım oranı yükselir. Kolorektal kanser taramasının önemli nedenleri: Kolorektal kanserin önemli morbidite ve mortaliteye neden olduğu, ileri hastalığın tedavisinin toplum için finansal bir yük olduğu ve sıklıkla semptomsuz olan erken aşamalarda etkili tedavilerin mevcut olduğudur. Kolorektal kanser taraması için mevcut yöntemler; kolonoskopi ve sigmoidoskopi, CT- ve MR-kolonografi, kapsül endoskopi ve **dışkıda DNA ve gizli kan testidir.** Kolonoskopi, neoplastik kolon lezyonlarının saptanmasında altın standart olarak kabul edilir. Tüm kolonun incelenmesine izin verir ve biyopsi alma ve potansiyel adenomları çıkarma yeteneğine sahiptir. **Dışkı ile dökülen ve genetik bilgi içeren hücresel elementleri analiz eden dışkı DNA testi de bir seçenektir** (Nielsen ve ark., 2011).

Gelecekteki tarama zorluğu, kolorektal kanser ile ilişkili proteinlerin ve genlerin tespiti için basit bir kan analizinin geliştirilmesi olacaktır. CEA, kolorektal kanser için klinik kullanım için kabul edilen ilk çözünür biyobelirteçtir, ancak sadece ameliyattan sonra hastalık ilerlemesinin izlenmesi için kullanılmaktadır. kolorektal kanserin erken tespiti için hem metaloproteinaz-1 hem de septin 9'un plazma doku inhibitörleri önerilmiştir, ancak yine de tek bir test kolorektal kanser için yeterince spesifik görünmemektedir (Nielsen ve ark., 2011).

2.5. Kolorektal Kanserde Gen Ekspresyon Profillemesi

Moleküler biyoloji, tıbbi onkolojideki en ilginç konulardan birini temsil eder, çünkü tümör ilerlemesinde yer alan moleküler değişiklikler hakkında global ve detaylı bir bilgi sağlar, bu da karsinogenez sürecinin daha iyi anlaşılmasına, yeni prognostik belirteçlerin ve yeni terapötik hedeflerin keşfedilmesine yol açar. Kanser sınıflandırılması ve prognostik gruplandırılması için klinik ve patolojik parametreler bulunmasına rağmen, bu multiform hastalığın biyolojik ve genetik heterojenliği nedeniyle günlük uygulamada yetersiz kalmaktadır (Lagerstedt, 2009). Kolorektal kanser, çeşitli nedenlerden dolayı moleküler profillemeye araştırmaları için ilginç bir alandır: Öncelikle kolorektal kanser, tümörjenezin biyolojik bir modeli olarak kabul edilir, çünkü adenomdan erken evre karsinoma, oradan da ileri evre karsinoma kadar klinik ilerlemesi ayırt edici moleküler değişikliklerle paralellik göstermektedir (Vogelstein, 1988). Keza geleneksel klinik ve patolojik parametreler yüksek riskli düşük riskli kolorektal kanserden ayırmak için her zaman yeterli olmamakta, prognostik değeri olan onaylanmış moleküler belirteçler hala mevcut değildir. Kolorektal kanserde moleküler profillemeye çalışmaları esas olarak karsinogenez süreci, hastalık prognozunun tahmini, terapötik hedefler ve yanıt tahmini üzerine odaklanmıştır.

2.6. Teşhis, Prognostik Belirteçler ve Gen İfadelenme Profili

Karsinogenez çalışmalarına gen ifadenme profillerinin uygulanması, tümör gelişimine göre gen ifadesi üzerindeki spesifik değişiklikleri tanımlamayı ve moleküler özelliklere göre tümörleri teşhis ve sınıflandırılmasını amaçlamaktadır. Normal mukoza, adenom ve karsinoma ait ayırd edici genetik işaretleri belirlemek için gen ifadenmesi karşılaştırma çalışmaları yapılmaktadır. Prognozu öngörme çalışmaları, düşük riskli kolorektal kanserden yüksek riski ayırt etmek, klinik sonuca göre moleküler işaretler sağlamak, primer tümörün metastatik potansiyelini tahmin etmek için kullanışlı olabilecek gen ifadenme profilindeki spesifik değişimleri tanımlamayı amaçlar (Kheirleiseid, 2011). Tümör ve normal kolorektal dokular arasındaki gen ifadenme seviyelerindeki farkı araştırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Tamamlanan bazı çalışmalarda, kanser ile normal doku arasında farklı şekilde ifade edilen ve bu nedenle potansiyel olarak kolorektal karsinogenez gelişiminde rol oynayan bazı gen grupları bildirilmiştir (Kitahara ve ark., 2001; Lin ve ark., 2002; Zou ve ark. 2002, Kwon ve ark., 2004, Friederichs ve ark., 2005). Yine bazı çalışmalarda adenom ve normal mukoza arasındaki gen ifadenme profilinde önemli farklılıklar olduğunu bildirmiştir ve bu prekanseröz lezyonlar farklı gelişim mekanizmalarının mevcut olabileceğini düşündürmektedir (Kita ve ark., 2006; Kim ve ark., 2008). Ayrıca metastaz gelişiminin altında yatan moleküler modifikasyonları açıklığa kavuşturmak için, primer tümörlerin gen ifadenme profilleri kendilerine ait metastazlarla karşılaştırılmıştır (Yanagawa ve ark. 2001; Agrawal ve ark., 2002; Koehler ve ark. 2004; Ki ve ark., 2007; Lin ve ark. 2007). Agrawal ve ark. (2002), hastalık ilerlemesiyle ilişkili tüm genler arasında osteopontin ifadenmesinin önde gelen aday gibi görüldüğünü bildirmiştir. Ayrıca Yanagawa ve ark. (2001), 10 primer kolorektal kanserde genom-boyu ifadenme profillerini ve karşılık gelen karaciğer metastazını analiz etmişler ve 40 genin ifadenmesinin metastatik lezyonlarda yaygın olarak arttığını ve 7 genin ifadenmesinin de yaygın olarak azaldığını tanımlamışlardır. Diğer yandan; Watanabe ve ark. (2009) lenf nodu metastazının karakterizasyonu ve tahmini için kullanılabilecek bir dizi ayırıcı gen setini tanımlamak için 89 kolorektal kanser hastasını çalışmış ve lenf nodu metastazı olan ve olmayan hastalar arasında 73 genin ifadenmesinin önemli ölçüde farklı

olduğunu bildirmişlerdir. Bu gen setini kullanarak, %88.4' lük bir doğrulukla lenf nodu metastazının varlığını tahmin etmek için bir model oluşturmuşlardır.

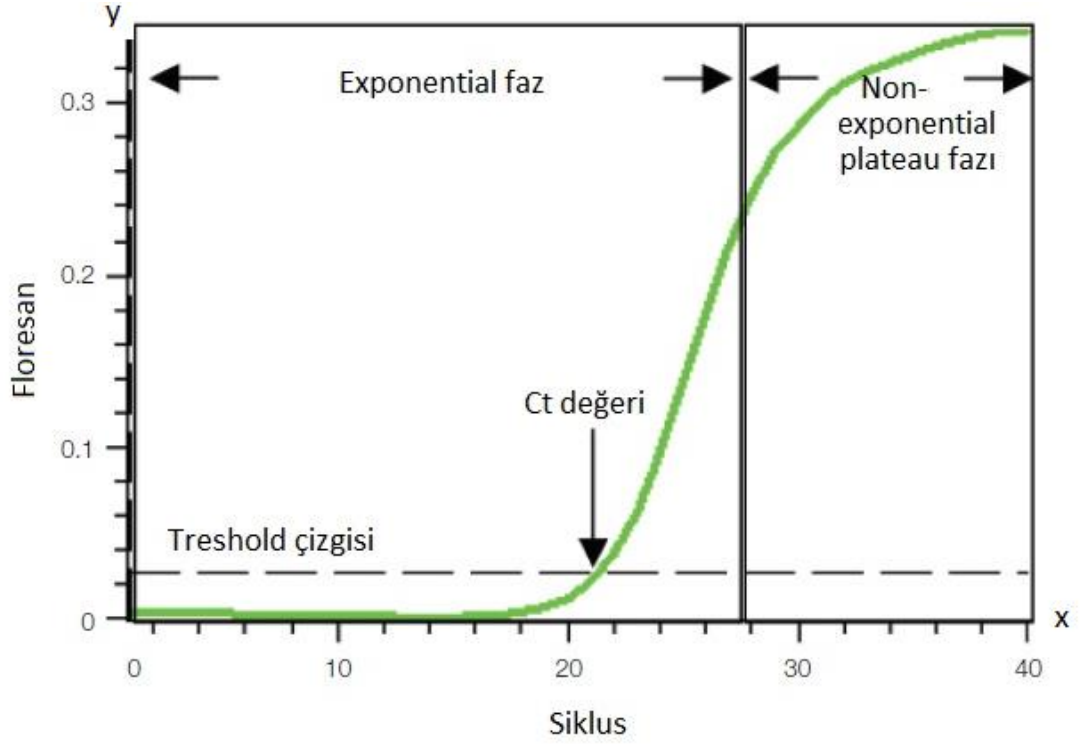
Gen ifadelenme paternlerinin analizi, tıbbi onkolojideki en ilginç konulardan birini temsil eder, çünkü tümör progresyonunda yer alan moleküler değişiklikler hakkında global ve ayrıntılı bir bakış açısı sağlar, bu da karsinogenez sürecinin daha iyi anlaşılmasına, yeni prognostik belirteçlerin ve terapötik hedeflerin keşfedilmesine yol açar.

2.7. Real-Time Polymerase Chain Reaction (Eş-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi)

Eş-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Eş-Zamanlı PZR) yöntemi araştırmalarda ve rutin uygulamalarda nükleik asitlerin miktar ve karakterizasyonunu belirlemek için altın-standart metod haline gelmiştir. Eş-zamanlı PZR'nin tipik kullanımı patojen belirlenmesi, gen ifadelenme analizleri, Tek Nükleotid Polimorfizm analizleri, kromozom aberasyon analizleri ve son zamanlarda eş-zamanlı immüno PZR ile protein belirlenmesi gibi analizleri içermektedir (Kubista ve ark., 2006).

Nasıl çalışır?

Şekil 2.2'de PZR siklus (döngü) sayısı x ekseninde, reaksiyon tüpü içindeki amplifiye olan ürünün oransal miktarı ile oluşan floresan sinyal y ekseninde gösterilmiştir. Amplifikasyon grafiği iki fazı göstermektedir. Eksponential faz sırasında her siklusta PZR ürün miktarı hemen hemen iki katına çıkmaktadır. Reaksiyon sürerken reaksiyon ürünleri azalmaya başlar. Bir veya iki ürün sınırı yaklaşır. Bu noktada reaksiyon yavaşlar ve plato fazına girer (siklus 28-40). Başlangıçta floresan seviyesi düşüktür (1-18 siklus) ve floresandaki artış tespit edilemez. Amplifiye olan ürün biriktikçe tespit edilebilir floresan sinyal üretilir. Bunun gerçekleştiği siklus Treshold cycle (Ct: treshold siklus) olarak isimlendirilir (Bio-Rad, 2006)



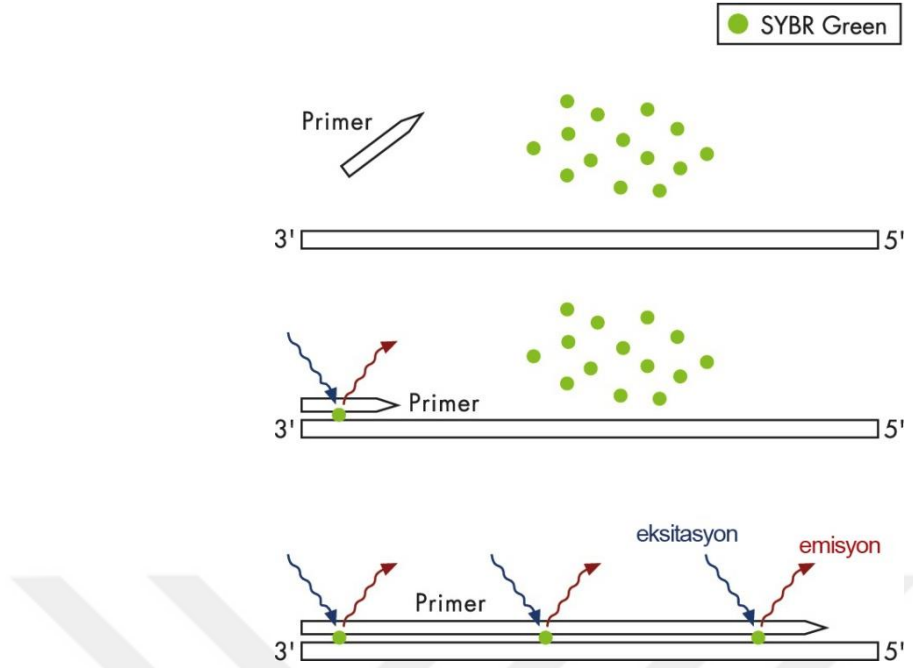
Şekil 2.2. Amplifikasyon grafiği.

mRNA'dan üretilmiş cDNA'nın amplifikasyonunda kullanılan Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu düşük miktardaki gen ifadenmesinin çalışılmasında rutin bir araç olarak önem kazanmıştır. Reverse transkripsiyonu (RT) takip eden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çok çeşitli kaynaklardan elde edilen mRNA ekspresyonunun analiz edilmesinde kullanılmaktadır (Pfaffl, 2001).

Eş Zamanlı PZR'de yeni sentezlenen PZR ürünlerinin basit bir şekilde belirlenmesinde SYBR Green I floresan boyası kullanılmaktadır.

2.7.1. SYBR Green PZR Nedir?

Floresan bir boya olan SYBR Green I tüm çift dallı DNA molekülüne bağlanır, bağlandığı noktada belirli bir dalga boyunda floresan bir sinyal yayar (Şekil 2.2).



Şekil 2.3. SYBR Green PZR prensibi (Qiagen, 2014)

SYBR Green I'in emilimi ve yayılması sırasıyla 494 nm ve 521 nm'de olur ve tüm Eş Zamanlı PZR teknolojilerinde kullanılabilir. SYBR Green I kullanıldığında belirleme Eş Zamanlı PZR'nin ekstansiyon (elongation: taq DNA polimerazın primerleri ekleme aşaması) basamağında olmaktadır. Sinyal yoğunluğu PZR ürününün artmasıyla her siklusta artmaktadır. SYBR Green boyasının kullanılması hedefe spesifik etiketli prob sentezlenmesine gerek kalmadan çok farklı sayıda hedefin analiz edilmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, spesifik olmayan PZR ürünleri ve primer dimerleri floresan sinyali etkilemektedir. Bu nedenle, SYBR Green boyaları kullanılırken yüksek PZR özgüllüğü gereklidir (Qiagen, 2014).

Ekspresyon/ İfadelenme analizlerinde tercih edilen kuantifikasyon (belirleme) yöntemi, hedef diziye, dokuda mevcut olan mRNA miktarının beklenen aralığına, gereken doğruluk derecesine ve nicemelemenin rölatif (göreceli) veya absölü olması gerekip gerekmediğine bağlıdır.

Genel olarak Eş zamanlı PZR için **iki tip kuantifikasyon** yöntemi mevcuttur:

(i) Hedef genin referans gene olan rölatif ekspresyonunu temel alan **rölatif kuantifikasyon**. Gen ekspresyonundaki fizyolojik değişikliklerin araştırılmasında kullanılmaktadır.

(ii) **Absolü kuantifikasyon** ise içsel veya dışsal kalibrasyon eğrisini temel almaktadır (Morrison ve ark., 1998; Pfaffl, 2001).

Housekeeping gen, endojen standart veya referans gen ile hedef genin normalizasyonu tavsiye edilmektedir. Housekeeping genler tüm temel hücre yaşamı için gerekli olmalarından dolayı tüm çekirdekli hücre tiplerinde mevcuttur. Bu genlerin mRNA sentezlerinin deneysel koşullarda dahi stabil olduğu düşünülmektedir. *GAPDH* (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz), albümin, aktinler, tubulinler, siklofilin, 18S rRNA veya 28S rRNA çok sıklıkla kullanılan referans genlerdir (Marten ve ark.,1994; Foss ve ark., 1998; Thellin ve ark., 1999).

2.8. Kolorektal Kanser ile İlişkili Aday Genler

2.8.1. *CPEB4* (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 4) Geni

CPEB ailesinin tipik bir üyesi olan sitoplazmik poliadenilasyon elemanı bağlayıcı protein 4 (*CPEB4*), çeşitli malignitelerde seçici olarak aşırı ifade edildiği gösterilmiş olan sekansa özgü RNA bağlayıcı protein ve translasyon düzenleyicisidir (Chen ve ark., 2016). Özellikle, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, *CPEB4*'ün, glioma ve meme kanserleri gibi belirli kanser türlerinde kanser hücrelerinin göçü ve istilasında önemli bir rol oynadığını ve kanser teşhisinde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Ortiz-Zapater ve ark., 2012; Xu ve ark., 2013; Zhijun ve ark., 2017; Lu ve ark., 2017).

Metastatik bir hastalığın prognostik belirteçlerinin ve tedavi hedeflerinin belirlenmesi, kanser hastalarının yönetimi için kritik öneme sahiptir. *CPEB4*, translasyona uğramamış mRNA'nın 3' bölgelerindeki spesifik dizilerle birleşir ve sitoplazmik poliadenilasyonu indükleyerek translasyonu teşvik eder. *CPEB4*'ün anormal ifadenmesi, belirli kanser türleri ile ilişkilidir, bu da *CPEB4*'ün kanser

proliferasyonu ve metastazının kontrolünde kritik bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

CPEB4'ün seçici olarak invaziv veya metastatik kanserlerde ifadenmesinin arttığı ve kanser alt tiplerinin tanımlanmasında bir potansiyel barındırdığı, TGF- β sinyal yolu üzerinde bir etki yaratarak invazyon ve metastazı yönettiği ve buna istinaden *CPEB4*'ün terapilerin yönlendirilmesinde ve metastatik kanserlerin tanımlanmasında aday bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür (Cao ve ark., 2018).

Cao ve ark. (2018) normal dokulara kıyasla gastrik kanser dokularında *CPEB4* gen ifadenmesinin belirgin bir şekilde yükseldiğini ve metastatik dokularda önemli derecede arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca, klinikopatolojik bağlantı analizleri ile *CPEB4*'ün tümör boyutu, T seviyesi, TNM sınıflandırması ve lenf nodu metastazıyla önemli derecede ilişkili olduğu rapor edilmiştir ($P,0.05$). Gastrik kanser hücre hatları (AGS, BGC823, MGC803, MKN45, and SGC7901) ve gastrik epitelium GES-1 hücre hatlarında *CPEB4* protein ifadenme düzeyleri incelenmiş, *CPEB4*'ün sadece primer tümörlerde değil gastrik kanser hücre hatlarında da kontrole göre arttığı rapor edilmiştir.

CPEB4 ile ilişkili mRNA'lar, RAS ile ilişkili moleküller, hücre sinyal bileşenleri, kromatin yeniden modelleme proteinleri, siklinler, apoptoza bağlı moleküller, stres ve inflamasyon faktörleri, metabolik hücre göçü ve metastazı ile ilgili enzimler ve genlerin dahil olduğu tümöröenez ilişkili çoklu hücre fonksiyonlarla zengin bir yelpazede ifade edilir (Ortiz-Zapater ve ark. 2012). Ayrıca, *CPEB4*'ün invaziv duktal meme kanserinde, kolorektal kanserde, pankreatik duktal adenokarsinomda, metastatik prostat kanserinde ve glioblastomada, invazyon, tümör büyümesi, vaskülarizasyon ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Ortiz-Zapater ve ark. 2012; Xu ve ark. 2013; Zhong ve ark. 2013; Sun ve ark. 2015; Chen ve ark. 2016).

İnvaziv duktal meme kanseri örneklerinin %48,6'sında *CPEB4*'ün ifadesinin arttığı ve artmış histolojik derece ve N evresi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Sun ve ark., 2015). Yine, primer kanser örneklerine kıyasla metastatik prostat kanserinde *CPEB4* mRNA ekspresyonunun yüksek olduğu bildirilmiştir (Xu ve Liu, 2013). Kolorektal kanser dokularının yüksek seviyede *CPEB4*'ü ifade ve yüksek mRNA ekspresyonunun ilerlemiş tümör evresi, lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve kolorektal kanserli hastalarda zayıf prognozla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Zhong ve ark., 2015). *CPEB4*'ün ayrıca kolorektal kanserli hastaların periferik kanlarında yüksek derecede ifade edildiği (Chang ve ark., 2014) ve bu yüksek ifade seviyesinin proliferatif kanser hücreleri için bir markör olan ki-67 ekspresyonuyla pozitif olarak korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Zhong ve ark., 2015).

CPEB4'ün ayrıca astrositler ve paratümör dokularda değil, glioblastomalarda ifadesinin arttığı bildirilmiştir (Ortiz-Zapater ve ark., 2012; Chen ve ark. 2016). *CPEB4*'ün glioma kök hücrelerini düzenlediği, ifadesinin baskılanmasının ise glioma kök hücrelerinin büyüme, proliferasyon ve invazyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2015).

125 hepatosüler Karsinoma olgusundan alınan karaciğer örnekleri 49 kontrolle kıyaslandığında *CPEB4*'ün protein seviyesinin erken evre hepatoselüler karsinomda arttığı, geç evre hepatoselüler karsinomda azaldığı bildirilmiştir. Muhtemelen *CPEB4*'ün ifadesindeki azalmanın ileri evre hepatoselüler karsinomda ortaya çıkmasının, hepatoselüler karsinomun ilerlemesini kolaylaştırdığı öne sürülmüştür (Tsai ve ark., 2016). Hepatoselüler karsinom ilerlemesi esnasında *CPEB4*'ün ifadesindeki bu değişimler, tümörögenizde karmaşık bir rolü olduğunu göstermektedir. *CPEB4*'ün pankreatik duktal karsinomda ifadesinin arttığı (Ortiz-Zapater ve ark., 2012) fakat hepatoselüler karsinomda azaldığı rapor edilmiştir (Tian ve ark., 2012).

Ortiz-Zapater ve ark. (2012) *CPEB4*'ün ifadesinin pankreatik duktal adenokarsinomlarda arttığını, pankreatik kanser ilerlemesinde post-transkripsiyonel gen regülasyonu için önemli bir role sahip olduğunu ve bu artışın tümör gelişiminde genel bir mekanizma olabileceğini ve *CPEB4*'ün muhtemel yeni bir terapötik hedef olabileceğini öne sürmüşlerdir. Hatta, *CPEB4* gen ifadesinin susturulmasının, kanser metastazını kontrol etmek için iyi bir yol olduğu öne sürülmüştür.

Xu ve Liu (2013) *CPEB4*'ün ifadesinin prostat kanseri ve bitişik dokularda kontrole göre azaldığını bildirmişlerdir. *CPEB4* gen ifadesinin gliomanın patolojik derecesiyle doğru orantılı olduğu, primer tümörlerde artmış *CPEB4* ifadesinin hastalarda kötü sonuçların tahmin edilmesinde ve baskılanmış *CPEB4* ifadesinin tümör hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, bu nedenle glioblastoma için potansiyel bir terapötik hedef olduğu öne sürülmüştür (Wang ve ark., 2018).

Hu ve ark. (2015) *CPEB4*'ün gen ifadesinin gliomada önemi derecede arttığını ve artışın ilerlemiş kanser evresiyle doğru orantılı olduğu rapor edilmiştir. Glioma hastaları için, *CPEB4*'ün yüksek derecede hassas prognostik bir indikatör olabileceğini bildirilmiştir.

CPEB4, kolorektal kanser, cilt kanseri ve böbrek kanseri de dahil olmak üzere çok çeşitli tümörlerde aşırı ifade edildiği, *CPEB4*'ün yüksek ifadesinin de tümör gelişiminde genel bir fenomen olabileceği düşünülmektedir (He ve ark., 2017). *CPEB4*'ün yüksek ifadesi TNM evresi ile yakından ilişkilidir. *CPEB4*'ün tümör invazyonu ve metastaz süreçlerinde önemli olduğu ve yüksek ifade seviyesinin kolorektal kanser hastalarında kötü sonuç için bir gösterge olduğu öne sürülmüştür (He ve ark., 2017). İlaveten, Xu ve Liu (2013) invaziv ve metastatik kanserlerde benzer sonucu bildirmiştir.

CPEB4'ün anormal yüksek seviyede ifadesinin çok çeşitli malignansilerde tanımlanmış olmasından dolayı, *CPEB4*'ün preonkogenik etkiler uygulayarak tümör büyümesi, invazyonu ve vaskülarizasyonu etkilediği düşünülmektedir (Ortiz-Zapater ve ark., 2012). *CPEB4* gen ifadesinin NSCLC örneklerinde kanserli

olmayan komşu dokulara kıyasla göreceli olarak daha az olduğu bildirilmiştir (Huang ve ark., 2015). Bu tip ifade değişikliklerinin farklı tip hücrelerde *CPEB4* ile düzenlenen farklı hedeflerle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Huang ve ark., 2015). Elbette, bu konuları açıklığa kavuşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.8.2. APC (APC Regulator Of WNT Signaling Pathway) Geni

Adenomatöz polipozis koli (APC) geni, oligomerleşmeye aracılık eden ve ayrıca β -katenin, γ -katenin, glikojen sentaz kinaz (GSK)-3 β , aksin, tübülün, EB1 ve hDLG'yi içeren çeşitli hücre içi proteinlere bağlanan çok sayıda fonksiyonel alana sahip bir proteini kodlar (Kinzler ve Vogelstein, 1996). APC'deki germ hattı mutasyonları Familial Adenomatöz Polipozi koli (FAP) veya varyantlarından biriyle, Gardner sendromu, zayıflatılmış FAP, Turcott sendromu veya düz adenom sendromu ile sonuçlanır (Foulkes, 1995; Soravia ve ark., 1998). Yine çalışmalar APC'nin kolorektal kanserlere özgü yüksek APC mutasyon sıklığı olan sporadik kolon adenokarsinomlarının %70'inde mutasyona uğradığını göstermiştir (Miyaki ve ark., 1994; Chung, 2000). Bu mutasyonlar, kolon kanseri oluşumunun en erken aşamalarında başlar ve kolon kanseri oluşumu sırasında gözlenen diğer değişikliklerden önce gelir (Powell ve ark., 1992; Vogelstein ve ark., 1988). Bu mutasyonların tümörü teşvik eden temel etkilerinden biri, Wingless/Wnt sinyal yolunun aşırı aktivasyonu ile sonuçlanır ve daha sonra hücre büyümesini destekleyen genlerin ifadesi ile sonuçlanır. APC mutasyonları, APC'nin β -katenin ile ilişkisini bozarak aşırı miktarda β -katenin birikmesine ve Wnt sinyal yolunun aşırı aktivasyonuna yol açar. Sonuç olarak, tümör oluşumunu destekleyen genler transkripsiyona uğrar. Wnt sinyal yolunun aşırı aktivasyonu gerçekleşir ki normalde GSK-3 β , APC, β -katenin ve axin ile bir kompleks oluşturarak ve bu proteinleri fosforile eder. Öreğin β -kateninin fosforilasyonu ubikutin aracılı proteozomal degradasyonu hedefler. Trunkate APC mutasyonları, bu sürecin gerçekleşmesini önler ve daha sonra çekirdeğe yerleşebilen ve diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşebilen sitoplazmik β -katenin miktarında bir artışa neden olur (Kheirleiseid, 2011).

APC genindeki mutasyonlar, FAP'ta kolorektal kansere kalıtsal yatkınlığın temelidir ve aynı zamanda sporadik kolorektal tümörlerin oluşmasında birincil olaydır. *APC* mutasyonlarının diğer kanser tümör tiplerinde neden daha az bulunduğu hala bir muammadır. *APC*'nin wnt- sinyalizasyonundaki rolünün kolorektal karsinogenezdeki rolünden sorumlu olması muhtemeldir. Mutant *APC* ayrıca, her ikisi de kanser ilerlemesinde rol oynayan hücre iskeleti yapışmasını ve stabilitesini bozabilir. Düşük penetranslı *APC* mutasyonlarının veya missens varyantlarının kalıtsal kolorektal kanser riskine katkısı hakkında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. *APC*'nin hem genetik hem de biyolojisinin daha iyi anlaşılması, zaman içinde, özellikle kolorektal kanser yükünü azaltmayı hedefleyen önleyici veya terapötik stratejilerle sonuçlanabilir (Nicola ve ark., 2001).

APC geninin keşfinden kısa bir süre sonra, gen ürününün işlevleriyle ilgili yoğun çalışmalar başlatılmış, *APC* ile β -katenin regülasyonu arasındaki ilişkiyi tanımlayan çalışmalar tamamlanmıştır (Su ve ark., 1993; Rubinfeld ve ark., 1993). Artık hem kalıtsal hem de sporadik kolon tümörlerindeki merkezi lezyonların Wnt sinyal yolunun aktivasyonu ile sonuçlandığı bilinmektedir. Tümörlerin çok önemli bir kısmında *APC* veya *GSK3* mutasyonlarının deaktif edilmesi veya *CTNNB1* mutasyonları mevcuttur (Fearnhead ve ark., 2002). *APC* fonksiyon kaybı, çekirdeğe yerleşen ve siklin D1, c-myc ve CRD-BP dahil olmak üzere çok sayıda hedef genin transkripsiyonunu aktive etmek için Tcf/Lef transkripsiyon faktörü kompleksine bağlanan β -katenin birikimi ile sonuçlanır. Regüle edilmemiş β -katenin aktivitesinin tümörojenik sonuçları, hem hücresel büyüme ve proliferasyonun doğrudan uyarılması hem de farklılaşma programlarının bozulması ile ilişkili olabilir (Kwong ve Dove, 2009).

Birnbaum ve ark. (2012), *APC* geninin ifadesi, mutasyon, allelik kaybı ve promotor metilasyonu ve metastaz oluşumunun birleşik analizi yoluyla, 183 kolon adenokarsinomu serisindeki rolünü araştırmışlardır. Olguların %73'ünde nokta mutasyonları ve %39'unda allelik kayıplar tespit edilmişken; tümörlerin %59'u bialelik inaktivasyon göstermiştir. *APC* gen ifadesi değişikliklerinin sayısı ve tipi ile metastatik dönüşüm arasında bir ilişki bulunmamıştır. Sonuçlar, *APC* durumunun

belirlenmesinin metastaz öngörüsünde yardımcı olamayacağını ve evre II kolon kanserlerini sınıflamak için kullanılamayacağını göstermektedir.

NIH3T3 fibroblast hücrelerinde serumla indüklenen G0/G1'den S fazına hücre döngüsü ilerlemesi bloke etmek için *APC* geninin aşırı ifade edildiği, oysa ki mutant *APC*'de böyle olmadığı öne sürülmüştür (Baeg ve ark., 1995). Bu verilerle tutarlı olarak kolorektal kanser hücre hatlarında G1 fazına geçişin engellenmesi için *APC* geninin aşırı ifade edildiği öne sürülmüştür (Heinen ve ark., 2002). Bu fonksiyon, siklik D1 ve c-myc gibi S-fazı düzenleyicilerinin b-katenin/Tcf aracılı transkripsiyonunun düzenlenmesiyle kısmen ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, *APC*'nin bir β -kateninden bağımsız olarak da proliferasyonu etkileyebileceği öne sürülmüştür (Heinen ve ark., 2002). Böylece, mutant *APC*'nin G1/S kontrol noktasında deaktif olması aberant hücre proliferasyonuna katkı sağlayabilir.

APC gen ifadesinde, *APC* germ hattı mutasyonu olmayan hastalarda kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenirken ($P < 0.05$) mutasyon taşıyıcı hastalarda, kontrol bireylerine göre daha düşük olmasına rağmen, istatistiksel anlamlılık göstermemiştir. Mutasyon negatif vakalarda, *APC* gen ifadesinin azaldığı ve bu FAP yatkınlığının umut verici bir göstergesi gibi görüldüğü rapor edilmiştir (Aceto ve ark., 2015).

Polipoz ailelerinin %50'sinde germ hattı mutasyonu saptanmaz ve FAP hastalarının yaklaşık %10-15'inde kesik *APC* mutasyonu olan hastalara benzer fenotip ile azalmış *APC* gen ifadesi olabilir (Laken ve ark., 1999; Kanter-Smoler, 2008). Germline alele spesifik ekspresyon (ASE) genetik dengesizliklerin bir göstergesidir ve polipozis ve/veya kolorektal kansere yatkınlığın yararlı bir göstergesidir (Renkonen ve ark., 2005; Castellví-Bel ve Castells, 2009; Castellsagué ve ark., 2010; Curia ve ark., 2012; Liv ve ark., 2013). *APC* transkriptlerinin dozajı, patojenik mutasyonları olan ve olmayan olgularda klasik veya atenüe fenotip ile sonuçlanan hastalığı modüle edebilir (Powell ve ark., 1993; Curia ve ark., 1998; Yan ve ark., 2002; Renkonen ve ark., 2005; Castellsagué ve ark., 2010).

2.8.3. *CTNNB1* (Catenin Beta 1) Geni

CTNNB1 geni, beta-katenin adı verilen bir proteinin yapımından sorumludur. Beta-katenin, hücrelerin birbirine yapışmasında ve hücreler arasındaki iletişimde önemli bir rol oynar (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1#>).

CTNNB1 genindeki somatik mutasyonlar, birçok kanser türünde tanımlanmıştır. Bunlar arasında kolorektal, karaciğer, tiroid, yumurtalık, endometriyal ve cilt kanserleri ile medulloblastom adı verilen bir beyin tümörü bulunur. Çalışmalar, *CTNNB1* genindeki fonksiyon kazancı mutasyonlarının, artık ihtiyaç duyulmadığında beta-katenin parçalanmasını önlediğini ve proteinin hücreler içinde birikmesine izin verdiğini göstermektedir. Fazla beta-katenin hücre çekirdeğine geçer ve kanserli tümörlerin gelişmesine izin vererek hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını destekler. *CTNNB1* genindeki mutasyonlar normal hücrelerin kanserli hale gelmesine neden olabileceğinden, *CTNNB1* onkogenler olarak bilinen bir gen sınıfına aittir. Bazen, diğer onkogenlerdeki mutasyonlar, kansere neden olmak için *CTNNB1* gen mutasyonları ile birlikte ortaya çıkar (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1#>). Eğer β -katenin fosforile olmaz ve bu nedenle parçalanmazsa, hücresel sitoplazma ve çekirdek içinde birikir (Kobayashi ve ark., 2000). B-katenin birikimi, wnt-sinyali sonucu (Miller ve ark., 1999; Akiyama ve ark., 2000), APC'nin inaktivasyonu veya β -katenin'in kendisinin doğrudan mutasyonu ile meydana gelebilir (Polakis, 1999).

Wnt sinyal yolları embriyonik gelişim sırasında hücre çoğalmasını, yer değiştirmesini ve kaderini kontrol eder. Yetişkinlikte, Wnt sinyali, homeostazı ve dokuların kendini yenilemesini düzenlemede kritik bir rol oynar. Özellikle, bağırsak epitelinde Wnt sinyali, bu mekanizmalar tam olarak anlaşılmamasına rağmen, bağırsak kriptlerindeki kök hücrelerin proliferasyonunu ve/veya farklılaşmasını teşvik eder. Wnt'nin bağırsak homeostazındaki bu kritik rolü, Wnt yolu deregülasyonunun kolorektal karsinogeneze neden önemli bir katkıda bulunduğunu anlamak için temel oluşturur. Bilinen Wnt sinyal kaskadlarından Wnt /b-katenin (kanonik yol) kolorektal kanserlerin yaklaşık %90'ında mutasyona uğrar. Bu

mutasyonlar esas olarak APC ve β -katenin genlerinde bulunur ve her ikisi de yolak aktivasyonuna yol açar, ancak diğer yol bileşenleri de mutasyonları barındırabilir (Bray ve ark., 2018). Wnt- β -katenin sinyal aktivasyonu, nükleusta kolorektal kanser tümörlerinin >%80'inde tespit edilebilen β -katenin birikmesine yol açar (Cross ve ark., 2010). Ayrıca, yüksek nükleer β -katenin düzeyleri, kolorektal kanser hastalarında kötü prognoz ile korele edilmiştir (Brenner ve ark., 2012).

2.8.4. *TRIP13* (Thyroid Hormone Receptor Interactor 13) Geni

AAA + ATPase süper ailesinin bir üyesi olan *TRIP13*, 5p15.33'te bulunur ve 432 amino asitli bir proteini kodlar. *TRIP13*'ün mayotik rekombinasyon, iğ kontrol noktası ve kromozom sinapslarında anahtar rol oynadığı bulunmuştur (Vader, 2015). Yapılan çalışmalar *TRIP13*'ün çoklu neoplazmlarda aşırı ifade edildiğini göstermiştir (Banerjee ve ark., 2014; Tao ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2017).

TRIP13'ün, hücre bölünmesinin doğru ilerlemesini sağlayan kinetokorda lokalize bir protein olduğu gösterilmiştir (Farmer ve ark., 2012). Bir dizi kinetokorda-lokalize protein, çeşitli kanserlerde yüksek oranda sentezlenmektedir ve bunların sentezlenmesi, kanser hücrelerinin genomik dengesizliği ya da habis dönüşümü ile ilişkilidir (Rao ve ark., 2009). Japonya'da yapılan bir çalışma, *TRIP13*'ün kolorektal kanser hücrelerinde onkogen olarak hareket edebileceğini, ancak mekanizmanın netleştirilmediğini göstermiştir (Kurita ve ark., 2016). (Sheng ve ark., 2018), *TRIP13*'ün in vitroda kolorektal kanser hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve istilasını ve deri altı implante edilmiş tümör oluşumunu destekleyebileceğini göstermek için birçok yöntem kullanmışlar ve sonuçlara göre kolorektal kanser hastalarının hayatta kalma sürelerinin düşük olduğunu rapor etmişlerdir (Sheng ve ark., 2018).

Mayotik düzenlemede önemli bir rol oynamasına rağmen, *TRIP13*'ün aşırı ifadesi veya amplifikasyonu birden fazla insan kanserinde bulunmuştur (Rhodes ve ark., 2004; Carter ve ark., 2006). *TRIP13* ilk olarak 2014 yılında baş ve boyun kanserinde onkogen olarak bildirilmiştir ve sonraki birkaç çalışmada *TRIP13*'ün

diğer neoplazmlarda onkojenik bir rol oynadığı ortaya çıkmıştır (Banerjee ve ark., 2014; Kurita ve ark., 2016; Tao ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2017). Kurita ve ark. (2016) *TRIP13*'ün mRNA seviyesini normal ve tümör dokular arasında analiz etmişler ve *TRIP13*'ün kolorektal kanser hücre proliferasyonu ve invazyonuna dahil olduğunu ve kolorektal kanser tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca Sheng ve ark. (2018) 200 kolorektal hastasında *TRIP13* mRNA'sını analiz etmişler ve *TRIP13*'ün pTNM evresi, CEA ve CA19-9 ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Dahası, çok değişkenli analizler *TRIP13*'ün genel olarak kolorektal kanser hastalarının hayatta kalma oranının tahmininde pTNM ve CEA ile birlikte bir gösterge olabileceği ve bu nedenle, *TRIP13*, kolorektal kanserin gelecek vaat eden bir biyomarkeri olarak işlev görebileceği öne sürülmüştür.

Sheng ve ark. (2018) *TRIP13*'ün kolorektal kanserdeki ifadenin profilini belirlemek için, Oncomine'den temin edilebilen çoklu kolorektal kanser veri setlerini analiz etmişler ve *TRIP13*'ün gen ifadesinin, normal dokuya kıyasla tümör dokusunda arttığını tespit etmişlerdir. Sonuçları doğrulamak için, 41 çift kolorektal kanser ve TCGA (Kanser Genom Atlası) veri setinden karşılık gelen normal dokularda *TRIP13*'ün mRNA seviyesini incelemişler, *TRIP13*'ün tümör dokusunda yüksek oranda ifade edildiğini rapor etmişlerdir ($p < 0.001$). Ayrıca, *TRIP13*'ün kolorektal kanserdeki protein seviyesini değerlendirmek için, 45 kolorektal tümör dokusu ve bitişik normal dokularda western blotlama yapılmış ve normal dokulara kıyasla *TRIP13*'ün tümörlerde belirgin şekilde aşırı ifade edildiği rapor edilmiştir ($p < 0.001$) (Sheng ve ark., 2018). Bu veriler *TRIP13*'ün gen ifadesinin kolorektal kanserde arttığını gösterir. Ayrıca yüksek *TRIP13* gen ifadesinin ileri pTNM evresi ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu da rapor edilmiş, *TRIP13* ile etkileşen genlerin G2-M hücre döngüsü geçişinde rol oynadığını gösterilmiştir (Sheng ve ark., 2018).

Hücre döngüsünün dört ardışık fazı vardır, G1 (DNA sentezi için hazırlık), S (DNA replikasyonu), G2 (mitoz için hazırlık) ve M (mitoz) ve her faz mitoz girmeden önce hasarlı DNA'yı onararak genomik bütünlüğü korumayı amaçlayan kontrol noktaları tarafından düzenlenir. Hasarlı DNA doğru şekilde tamir

edilemezse, hücre döngüsü durdurulur. G1-S geçişi ve G2-M geçişindeki kontrol noktaları en önemli hücre döngüsü kontrol noktalarıdır (Kastan, ve Bartek, 2004). Bununla birlikte, kanser hücresi gelişimi sırasında, bu mekanizma mutasyona uğramış kontrol noktaları nedeniyle ortadan kaldırılır ve daha sonra hasarlı DNA, kontrolsüz çoğalmaya ve malign bir fenotipe yol açan mitotik girebilir. Özetle, *TRIP13* in vivo ve in vitro'da kolorektal kanser hücresi ilerlemesini destekler ve kötü hasta sağkalımı gösterir (Williams ve Stoeber, 2012).

Daha önceki çalışmalar, kinetokorda-lokalize proteinlerin kanser ilerlemesindeki önemini göstermektedir. Kurita ve ark. (2016) *TRIP13*'ün kolorektal kanser tümör dokularında ve çeşitli kolorektal kanser hücre hatlarında yüksek oranda ifade edildiğini ortaya koymuştur. *TRIP13*'ün baş ve boyun kanserinde ve prostat kanserinde (Larkin ve ark., 2012; Benerjee ve ark., 2014) yüksek ifadesi bildirilmiştir, bu da *TRIP13*'ün diğer kinetokol lokalize proteinlere benzer şekilde çeşitli kanserlerde aşırı ifade edilebileceğini gösterir (Huang ve ark., 2014; Kao ve ark., 2014; Maachani ve ark., 2015). Mevcut sonuçlarla birlikte, bu çalışmalar *TRIP13*'ün çoklu kanserlerin ilerlemesinde önemli olduğunu göstermektedir.

TRIP13'ün aşırı ifadesi, kanser hücrelerinde kromozomal dengesizliği artırabilir ve malign özelliklerin daha fazla edinilmesine izin verebilir (Kurita ve ark. 2016).

CIN, önemli bir kanser belirtisi olduğundan, *TRIP13* tümör duyarlılık lokusu olarak işlev görebilir. *TRIP13*'ün amplifikasyonu çeşitli insan kanserlerinde gözlenmiştir ve kanser hücresi çoğalması, ilaç direnci ve tümör ilerlemesi dahil olmak üzere habis dönüşümünün çeşitli yönlerinde rol oynamıştır. İlgili kontrol noktası proteinleri tümör hücrelerinde sıklıkla anormal şekilde eksprese edilir. Ekspresyonlarındaki sapmalar potansiyel olarak tümör oluşumuna katkıda bulunan CIN ve aneuploidi ile sonuçlanabilir (Sotillo ve ark., 2010; Bachoum ve Compton, 2012; Bargiela-Iparraguirre ve ark., 2014). *TRIP13*'ün RT-PZR, Western blot ve Microarray analizi ile tespit edilen çeşitli tümör hücrelerinde anormal şekilde ifade

edildiği bildirilmiştir (Lu ve ark., 2019). *TRIP13* aşırı ifadesinin, primer tümörlerde ve kanser hücre dizilerinde yaygın bir fenotip olabileceği görülmektedir.

Yine, Total Survival (OS:Overall Survival) analizi, yüksek *TRIP13* gen ifadesinin, böbrek renal berrak hücreli karsinom, böbrek renal papiller hücre karsinomu, beyin düşük dereceli glioma, karaciğer hepatosellüler karsinom ve benzeri gibi diğer karsinomlarda kötü gidişatı ortaya koyduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, *TRIP13* geninin anormal ifadesi kanser hücrelerinde sık görülen bir olaydır ve *TRIP13*'ün kanser gelişiminde potansiyel bir onkojenik rolünü göstermektedir (Lu ve ark., 2019).

Yukarıda belirtilen gerekçe göz önüne alındığında, *TRIP13*'ün çeşitli insan kanserlerinde tümör oluşumuna, tümör ilerlemesine ve ilaç direncine katkıda bulunmaktadır ve kanserde tedavi için ideal bir hedef olabilir. *TRIP13*'ün insan meme duktal karsinom ilerlemesindeki rollerini araştırmak için araştırmacılar, *TRIP13*'ün gen ifadesini insan meme duktal karsinomundaki bazı patolojik özelliklerle ilişkilendirmiştir. Yüksek *TRIP13* gen ifadesi olan meme kanseri hastaları, düşük *TRIP13* gen ifadesi olan hastalara göre daha yüksek mortalite ve nüks oranı gösterdiği rapor edilmiştir (Rhodes ve ark., 2004; Martin ve ark., 2008). İnsan Mikoiz Fungoides Tümöründe, *TRIP13* gen ifadesi kontrol biyopsilerine kıyasla artmıştır (van Kester ve ark., 2012). Benzer şekilde, Larkin ve ark. (2012) *TRIP13* gen ifadesinin Gleason skoru ve preoperatif prostat spesifik antijen (PSA) düzeyi ile kombinasyon halinde olduğunu ve olguların %85.7'sinde rekürrenslerini doğru şekilde tahmin edebildiğini göstermiştir.

Özet olarak, doğru bir şekilde kromozom segregasyonu için *TRIP13*'ün ifadesi ve aktivitesi gereklidir. *TRIP13*'ün, kromozom segregasyonunun uygunluğunu çeşitli yollarla izleyebilmesine ve hücre fizyolojisi üzerindeki etkilerine bakıldığında bir onkogen olduğu şiddetle önermektedir (Kurita ve ark., 2016).

2.8.5. *IF γ* (Interferon Gamma) Geni

İnterferonlar (IFN'ler), antiviral, antitümör ve immünomodülatör özelliklere sahip, immün yanıtın merkezi koordinatörleri olan pleiotropik sitokinlerdir (Gresser, 1990). “İnterferonlar” terimi, viral enfeksiyona “müdahale ederek” hücreleri koruyan moleküllerin tanımından gelir (Nagano ve Kojima, 1954; Isaacs ve Lindermann, 1957).

IF γ , viral ve hücre içi bakteriyel enfeksiyonlara ve tümör kontrolüne karşı doğal ve adaptif bağışıklık için kritik öneme sahip bir proinflamatuvar sitokindir. CD4 Th1 hücreleri ve CD8 hücreleri *IF γ* üretmektedir. *IF γ* ayrıca enfeksiyon üzerine hızlı indüksiyona izin veren *IF γ* mRNA'yı yapısal olarak ifade eden natural killer hücreler ve natural killer T hücreleri tarafından üretilir. *IF γ* , MHC sınıf I ve II moleküllerinin yüzey ekspresyonunu düzenleyerek antijen sunumunu artırır. IFN γ , hücre içi bakteri ve virüslere yanıt olarak makrofajların aktivasyonu için de önemlidir. Azalan *IF γ* indüksiyonu veya sinyali, hücre içi bakterilere, bazı virüslere ve tümör başlangıcına karşı artan duyarlılık ile ilişkilidir (Akdis ve ark., 2011).

Tip I ve II IFN'lerin, kolorektal kanser ve melanomda olduğu gibi tümörlerin immüno-düzenlenmesi için gereklidir. IFN'ler ayrıca, kanser hücresi davranışı üzerinde proliferasyonu teşvik etme veya büyüme inhibisyonu gibi çift yönlü etkiye de sahip olabilir. Gerçekten de, birkaç çalışmada, IFN'lerin melanoma ve kolorektal kanserde tümör ilerletici veya tümör baskılayıcıları olarak işlev gördüğüyle ilgili çelişkili sonuçlar ortaya konmuştur. Farklılıklar mikroçevrenin etkisi, bağışıklık infiltratının miktarı ve kalitesi ve kanser hücrelerinin mutasyon durumu gibi farklı deneysel ortamlardan kaynaklanabilir. Bu nedenle, kanserdeki IFN'lerin biyolojisini daha iyi anlamaya ve koşullara bağlı olarak verileri analiz etmeye ihtiyaç vardır (Di Franco ve ark., 2017).

2.8.6. *PIK3CA* (Phosphatidylinositol - 4,5 - Bisphosphate 3 - Kinase Catalytic Subunit Alpha) Geni

PIK3CA geni, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) adı verilen bir enzimin tek bir parçası (alt birimi) olan p110 α proteininin oluşumundan sorumludur. P110 α proteini katalitik alt birim olarak adlandırılır, çünkü PI3K'nın etkisini gerçekleştirir, farklı bir gen tarafından üretilen diğer alt birim enzimin aktivitesini düzenler (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PIK3CA>.)

Diğer kinazlar gibi PI3K da diğer proteinlere fosforilasyon adı verilen bir işlemle bir oksijen ve fosfat grubu ekler. PI3K, hücreler içinde kimyasal sinyaller ileten bir dizi ek reaksiyonu tetikleyen bazı sinyal moleküllerini fosforile eder. PI3K sinyali, hücre büyümesi ve bölünmesi (proliferasyonu), hücrelerin hareketi (göçü), yeni proteinlerin üretimi, hücrelerin içindeki materyallerin taşınması ve hücre hayatta kalması gibi birçok hücre aktivitesi için önemlidir. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PIK3CA>).

Fosfoinositol-3-kinaz (PI3K) yolağı, insan kanserlerinde bir viral onkoprotein ile ilişkili bir enzimatik aktivite olarak keşfedilmiştir. Bu yolak, insan kanser çalışmalarında çok dikkat çekmiştir, çünkü hücre döngüsü, proliferasyon, büyüme, hayatta kalma, protein sentezi ve glikoz metabolizması için önemlidir (Vivanco ve Sawyers, 2002). PI3K yolağındaki düzensizlik tüm kanserlerin yaklaşık %30'unda görülmektedir. Bu deregülasyon çeşitli genetik ve epigenetik mekanizmalar yoluyla gerçekleşir ve çok çeşitli tümör tiplerine yol açar (Pal ve Mandal, 2012)

Yan-long ve ark. (2018), kolorektal kanser kemoterapisinde *PIK3CA* mutasyonunun potansiyel değeri ve mekanizmasını araştırmışlardır. Birinci basamak kemoterapi yanıtı ve *PIK3CA* mutasyonu korelasyonu takip ve tıbbi kayıtlara 440 kolorektal kanser hastasında değerlendirilmiştir. Kolorektal kanser hastalarında *PIK3CA* gen mutasyon sıklığı % 9.55 olarak bulunmuş ve bu, geç TNM evrelemesi ve düşük histolojik derece ile korele olduğu rapor edilmiştir. *PIK3CA* mutasyonu olan kolorektal kanser hastalarında, birinci basamak kemoterapiye *PIK3CA*

mutasyonu olmayanlara göre daha kötü yanıt verdiği rapor edilmiştir. *PIK3CA* mutasyon tümör hücreleri, in vitro ve in vivo birinci basamak kemoterapiye zayıf duyarlılık göstermiştir. Bulgular, *PIK3CA* mutasyonunun indüklediği PI3K/Akt aktivasyonunun, hücrelerin kemoterapiye daha fazla direnç gösterdiği kolorektal kanser kök hücrelerinin hayatta kalmasına ve çoğalmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir (Yan-long ve ark., 2018).

PIK3CA hot spot mutasyonları ekson 9 ve 20'de lokalize olmuş beş bölgede bulunur ve birçok solid tümörlerin karsinogenez, hücresel büyüme, proliferasyon ve hayatta kalmasına katkıda bulunmak için PI3K/AKT sinyal yolunu aktive eder (Zhou ve ark., 2016; Xu ve ark., 2017; Wang ve ark., 2017). Bununla birlikte, hala *PIK3CA* mutasyonları ve kolorektal kanser hastalarının prognozu arasındaki korelasyon tartışmalıdır (Mei ve ark., 2016; Paleari ve ark., 2016).

PI3K'nin katalitik alt birimi olan *PIK3CA*, kolorektal kanser de dahil olmak üzere birçok farklı tümörde mutasyon geçirir (Campbell ve ark., 2004; Samuels ve ark., 2004). Kolorektal kanserlerin %10-20'sinde, ekson 9 ve ekson 20'de iki sıcak noktada bulunan mutasyonların yaklaşık %80'inde *PIK3CA* mutasyonları bildirilmiştir (Samuels. vd, 2004). RAS yabanıl tip kolorektal kanserde, *PIK3CA* mutasyonları daha kötü bir klinik sonuç verir ve anti-EGFR monoklonal antikorlar tarafından hedefe yönelik tedaviye olumsuz tahminlere neden olur. Bununla birlikte, bu bulgular tüm çalışmalarda doğrulanmamıştır ve daha ayrıntılı analizler, bu etkilerin Ekson 20'deki mutasyonlarla sınırlı olabileceğini ortaya koymuştur. *PIK3CA* mutasyonlarının, kolorektal kanser hastalarında aspirin ile başarılı adjuvan tedavi için uzun zamandır aranan biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür. Bu nedenle, *PIK3CA* mutasyonlarının umut verici bir biyobelirteç gibi görüldüğü; bununla birlikte, *PIK3CA* genindeki somatik mutasyonların kolorektal kanser hastalarının tedavisindeki etkisini kesin olarak tanımlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunduğunu rapor etmişlerdir (Cathomas, 2014).

2.8.7. *EIF2S3* (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Subunit Gamma) Geni

EIF2S3 geni, metiyonil-tRNA (i)'nin 40S ribozomal alt birimine dahil edilmesinde rol oynayan bir heterotrimerik GTP bağlayıcı protein olan ökaryotik çeviri başlatma faktörü-2'nin (eIF2) çekirdek alt birimini kodlar. EIF2 kompleksi protein sentezi için gereklidir (Moortgat ve ark., 2016).

Chen ve ark. (2010) yaptıkları PM-33 çoklu moleküler markör modeli analizlerine göre kolorektal kanser teşhisi için *EIF2S3* geninin de dahil olduğu bazı genlerin ifadesinde azalma rapor etmişlerdir.

2.8.8. *EIF4A1* (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A1) Geni

EIF4A, DEAD kutusu protein ailesinin bir üyesidir ve 5'UTR'de mRNA sekonder yapısının çözülmesini katalize etmek için ATP'ye bağlı bir RNA helikaz olarak işlev görür (Rogers Jr ve ark., 2002).

Boussemart ve ark. (2014), eIF4E cap-bağlayıcı protein, eIF4G skaffold-proteini ve eIF4A RNA helisazını içeren eIF4F kompleksinin kalıcı oluşumunun BRAF (V600) mutant melanom, kolon ve tiroid kanseri hücre hatlarında, anti-BRAF, anti-MEK ve anti-BRAF plus anti-MEK ilaç kombinasyonlarına direnç ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Malignant fenotip, büyük ölçüde düzensiz gen ifadesinin sonucudur. Transforme hücreler sadece protein sentezindeki global bir artışa değil, pro-onkojenik mRNA'ların translasyonel olarak arttığı bir duruma da bağlıdır. Bu tür mRNA'ların, etkili bir transkripsiyon için yüksek seviyelerde ökaryotik başlatma faktörü 4A (EIF4A) helikaz aktivitesi gerektiren daha uzun ve daha yapılandırılmış 5p-UTR'lere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, *EIF4A*'yı bir kanser terapisi olarak hedeflemeye odaklanılmıştır. Bu tür tedavilerin başarılı olması için, spesifik

mRNA'ları eIF4A aktivitesine diğerlerinden daha bağımlı hale getiren mekanizmalar hakkında ayrıntılı çalışmalar geliştirilmelidir (Raza ve ark., 2015).

2.8.9. Kolorektal Kanserle İlişkisi Olduğu Düşünülen Genlerle İlgili Yapılan Bazı Çalışma Örnekleri

Kheirelseid (2011) *CDH17* gen ifadesinin kolorektal kanserde tümörle ilişkili normal kolorektal dokulara göre anlamlı olarak daha düşük olduğunu rapor etmiştir ($p < 0.001$).

Kolorektal kanserde periferik kandaki *CEA*, *CK20* ve *CK19* genlerine ait mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek için Eş Zamanlı PZR kullanılmıştır ve Eş Zamanlı PZR'nin kanser evrelemesi ve hastalık izlemesi için değerli bir araç olduğu gösterilmiştir (Wharton ve ark. 1999; Wong ve ark., 2001; Schuster ve ark., 2004).

Tümör ile ilişkili normal kolorektal dokulara kıyasla *CEACAM5* geninin tümörde anlamlı olmayan aşırı ifadesi belirlenmiştir. *CEACAM5*'in aşırı ifadesinin, orta derecede diferansiye tümörler ve tümör invazyonu ile anlamlı derecede ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Kheirelseid, 2011).

Kolorektal gen ifadesi veri setlerinde, düzensiz *FABP1* gen ifadesi bildirilmiştir (Lee ve ark., 2006; Chan ve ark., 2008) bununla birlikte klinik verilere ilişkin gen ifadenme profilleri hakkında çok az şey bilinmektedir.

Kolorektal kanserde yüksek *IL8* gen ifadesi daha önce rapor edilmiş olmasına rağmen (Baier ve ark., 2005; Erreni ve ark., 2009), klinikopatolojik değişkenlerde in vivo korelasyon tanımlanmamıştır.

Kolorektal kanserin evrelendirilmesi ve prognozu için biyobelirteç mRNA analizinin yararını araştırmak için, karsinoembriyonik antijen (CEA), kallikrein 6 (KLK6), sitokeratin 20 (CK20), guanilil siklaz C (GCC), *CEACAM1-S*, *CEACAM6*

ve müsin 2 (MUC2), Eş Zamanlı-PZR ile belirlenmiştir. Sonuçlar rutin H&E analizi ile karşılaştırılmıştır. Biyobelirteçler, lenf nodu cinsinden yayılan tümör hücrelerini saptama kapasitesi açısından analiz edilmiştir. mRNA düzeyleri kolorektal kanser ve kontrol lenf nodları, primer tümör, normal kolon, bağışıklık hücreleri ve fibroblastlarda belirlenmiştir. İmmün hücrelerde ve fibroblastlarda ifade eksikliği ve primer tümörlerde yüksek ve homojen ifadelenme, belirleyici faktörler olarak gösterilmiştir. CEA kriterleri en iyi karşılamış, bunu *KLK6*, *CK20*, *GCC* ve *MUC2* izlemiştir. *KLK6* mRNA'sı, gen ifadesinin genom çapında mikrodizi analizi ile potansiyel bir ilerleme markeri olarak tanımlanmıştır. Kolorektal kanserin tümör hücrelerinde ektopik olarak ifade edildiği bulunmuştur. *KLK6* (+) lenf nodları kötü prognozun bir göstergesi olarak bildirilmiştir. Özellikle, gerçek seviye sonuç için önemlidir. *KLK6* mRNA seviyeleri arttıkça tekrarlama riski artar. Düşük *CEA* mRNA seviyeleri ile gösterildiği gibi, düşük sayıda tümör hücresi bulunan lenf nodlarındaki *KLK6* pozitifliğinin kötü prognoz gösterdiği ve *CEA* mRNA'sının, evreleme ve hastalıksız sağkalım süresinin tahmini ve ameliyat sonrası nüks riski için en iyi tek biyobelirteç olduğu rapor edilmiştir. *CEA*'ya ek olarak *KLK6* pozitifliği ve düşük *MUC2/CEA* oranı kötü prognoz ile ilişkilidir. Böylece, *CEA*, *MUC2* ve *KLK6* mRNA'ları, kolorektal kanser hastalarının evrelemesi ve sonuç tahmini için güçlü bir "üçlü" oluşturduğu bildirilmiştir. Biyobelirteçler prognostik faktörler olarak yararlı olabilir (Ohlsson, 2001).

CEA, kolorektal kanserde iyi bilinen ve yerleşik bir serum markörüdür, ancak şimdiye kadar tedavi seçimi için bir prognostik faktör ve rehber olarak yararlı bulunmamıştır. *CEA*'nın ameliyat sonrası hastalığın izlenmesi için yararlı olduğu kanıtlanmıştır ((Sturgeon, 2002). *CA19-9*, *CA242*, *CA72-4*, *CA50* ve metaloproteinaz 1'in doku inhibitörü (*TIMP-1*), kolorektal kanser için önerilen diğer potansiyel serum belirteçleridir (Duffy ve ark., 2007). Normal mukozadan malign dokuya dönüşüm sırasında, birçok aday biyobelirteç sağlayan çoklu moleküler değişiklikler meydana gelir. *KRAS*, tümör baskılayıcı genler (*p53* ve *APC*) ve *MSI* gibi onkogenlerin tümü genellikle kolorektal kanserde değiştirilir (Harrison ve Benziger, 2011). Hücre ve doku bazlı biyobelirteçleri kullanan ön veriler erken

kolorektal kanser tanısına yardımcı olmak için umut vericidir, ancak yine de klinik kullanım için önerilmemektedir (Duffy ve ark., 2007).

Kolorektal kanserde *KLK6* mRNA'sının primer tümörlerde normal kolon dokusuna kıyasla yüksek seviyelerde ortaya çıktığı, karaciğer metastazı ve zayıf prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ogawa ve ark., 2005; Kim ve ark., 2011). *KLK6*, *KRAS*'a bağlı göçün aracısı olarak işlev görmektedir (Henkhaus ve ark., 2008).

Matris metaloproteinaz 7 (matrilisin olarak da bilinen MMP7), kolorektal tümörlerin invaziv cephesinde eksprese edilir. Tümörün kendisi tarafından sadece MMP7 ve membran tip-1 MMP salgılanabilir (Adachi ve ark., 2001). MMP7 gen ifadesi azalmış sağkalım ile ilişkilidir ve yüksek MMP7 seviyesi kolorektal kanser hastalarında hastalık rekürrensi ve karaciğer metastazının bir belirleyicisi olarak önerilmiştir (Fang ve ark., 2009).

Guanilil siklaz C (*GUCY2C* olarak da bilinen GCC), GTP'nin cGMP'ye dönüşümünü katalize eden bir enzim ailesi olan guanilil siklaz ailesinin bir üyesidir. GCC, bağırsakta mukozal homeostazın korunmasında merkezi bir rol oynar. Kolon karsinogenezi sırasında, GCC hormon ligandları, yani parakrin hormonları sıklıkla kaybolur. GCC'nin parakrin hormonu ekspresyonu kaybı ile birlikte düzensizliği neoplastik oluşumu ve tümör ilerlemesini başlatır (Pitari ve ark., 2007). GCC'nin gen ifadesi kolorektal kanser ve metastatik hastalık sırasında korunur. GCC'nin kolorektal kanserli hastaların lenf nodlarındaki yaygın tümör hücrelerini saptamak için kolona özgü bir biyobelirteç olduğu bildirilmiştir (Schulz ve ark., 2006; Waldman ve ark., 2009; Haince ve ark., 2010). Lenf düğümlerinde GCC mRNA'nın saptanması, düğüm negatif (pN0) kolorektal kanser hastalarında rekürrens riski ile ilişkilendirilmiştir (Schulz ve ark., 2006; Waldman ve ark., 2009; Haince ve ark., 2010; Sargent ve ark., 2011). Son zamanlarda, Previstage™ GCC Kolorektal Kanser Evreleme Testi adı verilen yeni bir moleküler test kullanıma sunulmuştur. Bu test lenf nodlarındaki yayılmış tümör hücrelerini tanımlamakta ve kolorektal kanser

hastalarının evrelendirilmesi hakkında daha doğru bilgi sağlamaktadır (Carlson ve ark., 2009).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnek Toplanması

Çalışma kapsamında, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda gerçekleşen kolonoskopi/kolorektomi işlemi sırasında herhangi bir ek müdahale gerekmeden ve/veya herhangi bir ek medikal ajan uygulanmadan **rutin ameliyatı sırasında çıkartılan ve patolojik tanısı için kullanılmayan kolorektal tümör dokusundan arta kalan benzer özellikteki kısımlar RNA izolasyonu için kullanılmıştır.**

Dokularından histopatolojik inceleme sonucunda Kolorektal **kanser teşhisi konmuş** 45 olguya ait **tümör dokusu örnekleri** ile Genel Cerrahi polikliniğine kabızlık ve bağırsak düzensizliği ile başvurup, kolonoskopi planlanmış ve kolonoskopi sonucunda alınan örneklerde **patoloji sonucu normal çıkmış** 5 bireye **ait doku örnekleri** kullanılmıştır.

Yine kolorektal tanılı her olgu ile kontrol grubunda yer alan her bireyin, Cerrahi girişim sırasında açılmış olan venöz damar yolundan da 5cc EDTA'lı tüpe RNA izolasyonu için kan örneği alınmıştır.

Kolorektal kanser nedeniyle kemoterapi ya da immunoterapi almış hastalar çalışma dışı bırakılmıştır.

Amerika Birleşik Devletleri Kanser Komitesi'nin (AJCC) 2003 yılında güncellediği kolon kanseri TNM sınıflandırmasına göre 4 evre vardır. Hastalara ait dokular bu evreleme sistemine göre sınıflandırılmıştır.

Evreleme basit olarak;

Evre 0 : Çıkarılan bağırsakta kanser bulunmamıştır.

Evre I : Kanser bağırsak duvarı içinde sınırlıdır.

Evre II : Kanser bağırsak duvarını aşmıştır.

Evre III : Kanser çevre lenf bezlerine yayılmıştır.

Evre IV : Kanser uzak organlara yayılmıştır.

3.2. Dokulardan Total RNA İzolasyonu

Kolorektal tümör dokularından Trizol RNA Ekstraksiyon Metodu kullanılarak aşağıdaki basamaklara göre EZ-RNA Total RNA izolasyon kiti (BI, İsrail, Kat. No: 20-400-100) ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir:

1. Ependorf tüplere tartılarak alınmış her bir 50 mg tümör dokusu üzerine 500 µl denatürasyon solüsyonu eklendi.
2. Homojenizatör ile 30-60 saniye süreyle dokular homojenize edildi. Her bir uygulama sonrasında homojenizatör ucu sırasıyla 8 ml DEPC su, 8 ml %70 EtOH, 8 ml 0,1 M NaOH ve 8ml DEPC (BI, İsrail, Kat. No: 01-852-1) sudan geçirilerek temizlenmesi sağlanarak bir sonraki dokuya geçildi.
3. Homojenatlar 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon süresi sonunda üzerlerine 500µl ekstraksiyon solüsyonu eklendi. 15 saniye hızlı bir şekilde elde çalkalanarak 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
5. 10 dakikalık inkübasyon sonrasında, homojenatlar 4°C’de 12.000 x g’de 15 dakika santrifüj edildi.
6. Üst kısımdaki şeffaf faz temiz ependorf tüplere aktarıldı. Şeffaf faz içindeki RNA’nın presipite olması için üzerlerine 500µl izopropanol eklendi.
7. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra 4°C’de 12.000 x g’de 8 dakika santrifüj edildi.

8. Santrifüjden sonra süpernatantlar atıldı ve RNA ependorf tüplerin dibinde beyaz pellet olarak gözlemlendi.
9. RNA pelletini yıkamak amacıyla üzerine 1'er ml DEPC su ile hazırlanmış %75'lik etanol eklendi ve vortexlendi.
10. Tüpler 7500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı.
11. Pelletler belirli süre kurumaya bırakıldı ve 30-50µl DEPC su eklendi.
12. RNA pelletinin tamamen çözülmesi için kuru ısıtıcıda 55°C'de 10 dakika inkübe edildi.
13. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND-1000 V.3.7 Spektrofotometre cihazında ölçülerek kullanılıncaya kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.3. Kandan Total RNA İzolasyonu

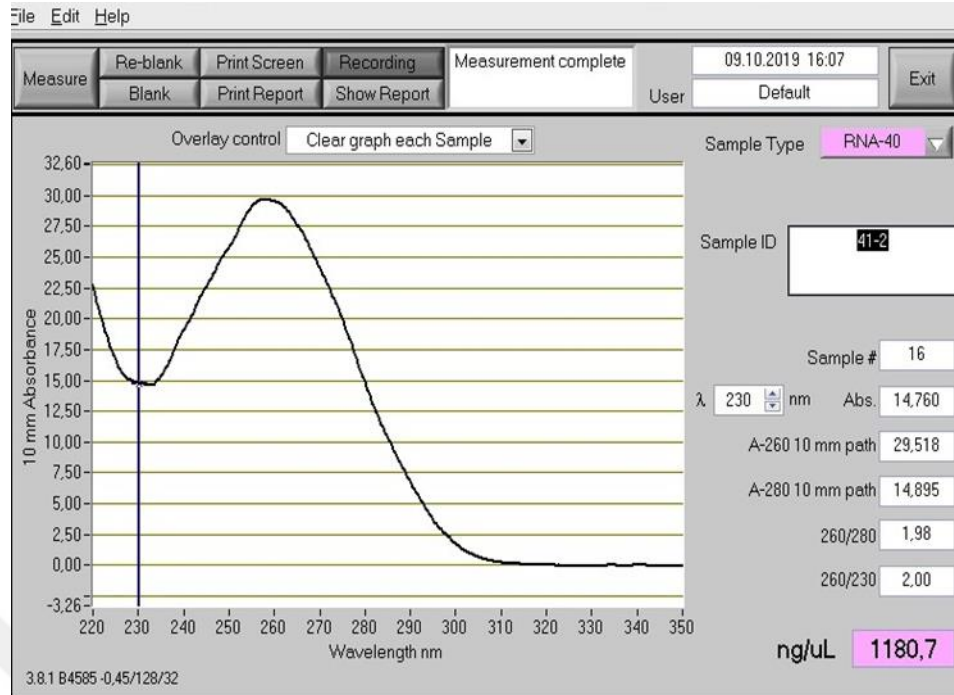
Kolorektal tümör dokularının alındığı olgulara ait periferik kanlardan, Trizol RNA Ekstraksiyon Metodu kullanılarak aşağıdaki basamaklara göre EZ-RNA Total RNA izolasyon kiti (BI, İsrail, Kat. No: 20-400-100) ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

1. 500µl periferik kanın üzerine 1ml RBC Lysis Solution (BI, İsrail, Kat. No: 01-888-1) eklendi.
2. 10 dakika oda sıcaklığında arada sırada pipetaj yapılarak inkübe edildi.
3. İnkübasyon süresinin sonunda 300 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant atılarak üzerine 500 µl denatürasyon solüsyonu eklendi ve pipetaj yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon süresi sonunda üzerlerine 500µl ekstraksiyon solüsyonu eklendi. 15 saniye hızlı bir şekilde elde çalkalanarak 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
6. 10 dakikalık inkübasyon sonrasında, homojenatlar 4°C'de 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi.
7. Üst kısımdaki şeffaf faz temiz ependorf tüplere aktarıldı. Şeffaf faz içindeki RNA'nın presipite olması için üzerlerine 500µl izopropanol eklendi.

8. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra 4°C’de 12.000 x g’de 8 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüjden sonra süpernatantlar atıldı ve RNA ependorf tüplerin dibinde beyaz pellet olarak gözlendi.
10. RNA pelletini yıkamak amacıyla üzerine 1’er ml DEPC su ile hazırlanmış %75’lik etanol eklendi ve vortexlendi.
11. Tüpler 7500 x g’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı.
12. Pelletler belirli süre kurumaya bırakıldı ve 30-50µl DEPC su eklendi.
13. RNA pelletinin tamamen çözülmesi için kuru ısıtıcıda 55°C’de 10 dakika inkübe edildi.
14. Elde edilen RNA’ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND-1000 V.3.7 Spektrofotometre cihazında ölçülerek kullanılıncaya kadar -80°C’lik derin dondurucuda saklandı.

3.4. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA’lar NanoDrop ND-1000 V.3.7. spektrofotometre cihazında ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi (Şekil 3.1). cDNA eldesi iScript Reverse Transcription Supermix cDNA sentez kiti (Biorad, USA, Kat. No:1708841) kullanılarak (Tablo 3.1), 1µg total RNA’dan Tablo 3.2’deki protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA’lar Eş Zamanlı PZR’de kullanılıncaya kadar -20°C’lik derin dondurucuda saklandı.



Şekil 3.1. Çalışmaya aldığımız bir olguya ait RNA ölçüm bilgileri

Tablo 3.1. cDNA sentez reaksiyon karışımı

iScript RT Supermix	4 µl
RNA Template (1µg-1pg total RNA)	Her örnek için farklı miktarda
Nuclease free water	Her örnek için farklı miktarda
Toplam	20 µl

Tablo 3.2. cDNA sentezi reaksiyon protokolü

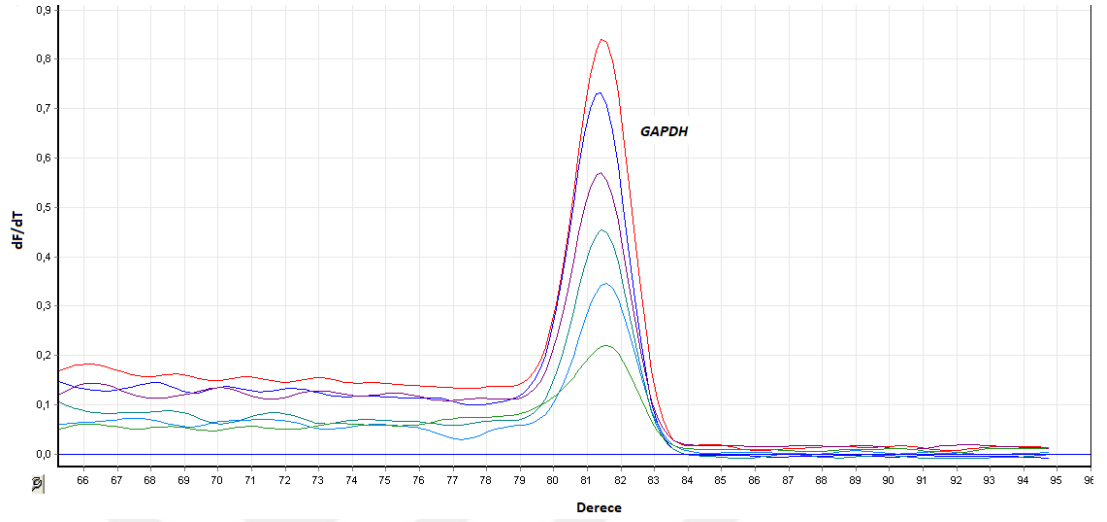
Priming	5 dakika 25°C
Reverse Trankripsiyon	20 dakika 46°C
RT inaktivasyon	1 dakika 95°C

3.5. Hedef genler ve GAPDH için Reaksiyon Etkinliklerinin Belirlenmesi

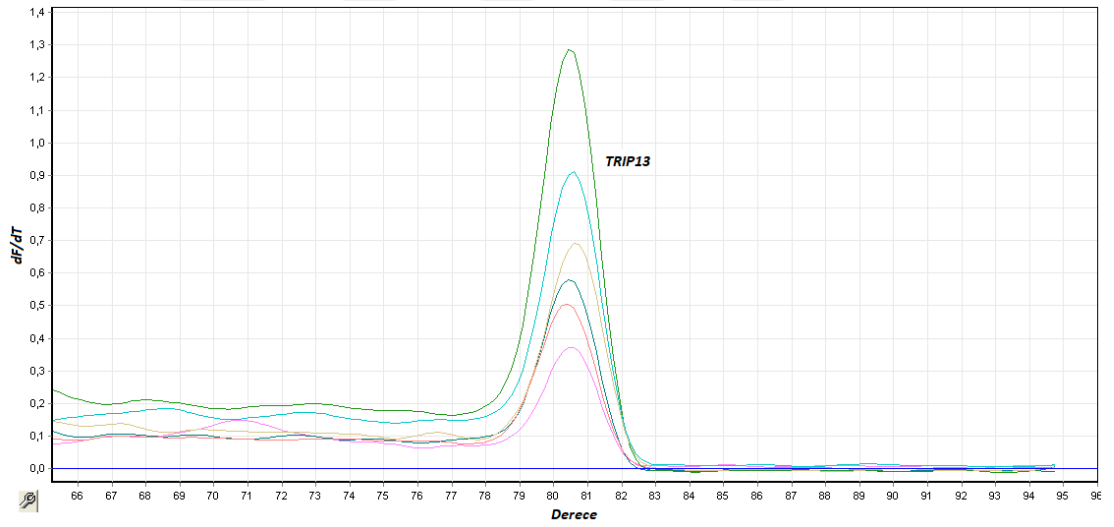
Her bir hedef genin ve housekeeping genin reaksiyon etkinliklerinin belirlenebilmesi için 6 tüpte 1:10 cDNA dilüsyonu hazırlandı. Her bir gen ve housekeeping gen, ilgili konsantrasyonlarda aynı Eş Zamanlı PZR reaksiyonunda amplifiye edildi (Şekil 3.2).

Reaksiyon sonunda elde edilen slope değerlerine göre reaksiyon etkinlikleri belirlendi. Amplifikasyon Etkinliği (E) = $(10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$

a)



b)



Şekil 3.2. Farklı cDNA dilüsyonlarıyla amplifiye edilen genler için örnek erime eğrileri (a: *GAPDH*, b: *TRIP13*).

3.6. *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine Ait mRNA seviyelerinin Eş Zamanlı PZR İle Ölçülmesi

CPEB4, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerinin mRNA düzeyleri, Eş-Zamanlı PZR yöntemi ile RotorGeneQ cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 10 μ L toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, bölgeye özgü primerler (Oligomer, Ankara) (Tablo 3.3), iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, USA, Kat. No: 1725122) ve nuklease free su kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3.4). Her bir gene ait analizlerin yapılması için, Eş Zamanlı PZR reaksiyon karışımları hazırlandıktan sonra 0.2 ml'lik PZR tüplerine dağıtıldı, üzerine ilgili cDNA'lar eklendi ve cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 3.5 ve Tablo 3.6'da belirtilen amplifikasyon programları kullanılarak PZR reaksiyonları gerçekleştirildi. Reaksiyonlar sonucunda, ilgili genlere ait mRNA düzeylerini gösteren threshold Cycle (Ct) değerleri belirlendi. İlgili genlere ait ifade düzeyleri *GAPDH* gen ifade düzeylerine göre normalize edildi.

Tablo 3.3. Hedef genlere ve referans gene ait baz dizileri

Gen Adı	Baz dizisi 5→3'	Baz Uzunluğu	Tm Derecesi
<i>CPEB4-F</i>	CATATTCAGCTCCAGAAGTATGCTC	25	61°C
<i>CPEB4-R</i>	AGTGCATGT CG AATGTCCTG	20	57°C
<i>APC-F</i>	AAAATGTCCCTCCGTTCTTATGG	23	59°C
<i>APC-R</i>	CTGAAGTTGAGCGTAATACCAGT	23	59°C
<i>TRIP13-F</i>	ACTGTTGCACTTCACATTTTCCA	23	57°C
<i>TRIP13-R</i>	TCGAGGAGATGGGATTGACT	21	58°C
<i>EIF2S3-F</i>	GTATCACTTTTTGCGGAGCAT	21	56°C
<i>EIF2S3-R</i>	GGGGTCAATTTTGTTCCTCA	20	53°C
<i>IFNγ-F</i>	TCAGCTCTGCATCGTTTTGG	20	57°C
<i>IFNγ-R</i>	GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA	24	59°C
<i>PIK3CA-F</i>	CCTGATCTTCCTCGTGCTGCTC	22	64°C
<i>PIK3CA-R</i>	ATGCCAATGGACAGTGTCCTCTT	24	61°C
<i>CTNNB1-F</i>	CTTGCTCAGGACAAGGAAGC	20	57°C
<i>CTNNB1-R</i>	CATATGTCGCCACACCTTCA	20	53°C
<i>GAPDH-F</i>	CATTGCCCTCAACGACCACTTT	22	64°C
<i>GAPDH-R</i>	GGTGGTCCAGGGGTCTTACTCC	22	64°C

Tablo 3.4. Eş Zamanlı PZR reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim
iTaq Universal SYBR Green Supermix	5 µl
cDNA	1 µl
Forward ve Reverse primerler (250-500nm her bir primer)	1+1 toplam 2 µl
Nuclease free water	2µl
Total Hacim	10 µl

Tablo 3.5. *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *CTNNB1* ve *GAPDH* amplifikasyon protokolü

	Basamak	Süre	Sıcaklık
	Enzim Aktivasyonu/ Denatürasyon	30sn	95°C
40 döngü	Denatürasyon	5 sn	95°C
	Annealing/Ekstensiyon (Veri Toplanması)	30 sn	60°C
	+Melting Curve Analizi	65-95°C, 0,5°C/5 sn	

Tablo 3.6. *IFN γ* , *PIK3CA* ve *GAPDH* amplifikasyon protokolü

	Basamak	Süre	Sıcaklık
	Enzim Aktivasyonu/ Denatürasyon	30sn	95°C
40 döngü	Denatürasyon	5 sn	95°C
	Annealing/Ekstensiyon (Veri Toplanması)	30 sn	63°C
	+Melting Curve Analizi	65-95°C, 0,5°C/ 5 sn	

4. BULGULAR

4.1. Olgulara Ait Klinik ve Demografik Özellikler

Çalışmamızda, dokularından histopatolojik inceleme sonucunda Kolorektal kanser teşhisi konmuş 45 olgu ile patoloji raporu sonucu normal çıkan ve kontrol grubunda yer alan 5 bireye ait patolojik/normal doku ve kan örneklerinde *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Olgulara ait klinik ve demografik özellikler Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Olgulara ait klinik ve demografik özellikler

Klinik Özellikler	Kolorektal Kanser Hasta Sayısı N=45	
Cinsiyet		
Erkek	26/45	%57,8
Kadın	19/45	%42,2
Ortalama Yaş (SD)	66,6 ($\pm 12,66$)	
27-65	21/45	%48,8
66-90	24/45	%51,2
Tümör Yerleşimi		
Kolon	28/45	%62,2
Rektum	17/45	%37,8
Patolojik Evreleme		
Evre I	8/45	%17,8
Evre II	17/45	%37,8
Evre III	15/45	%33,3
Evre IV	5/45	%11,1

4.2. *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine İlişkin mRNA Analizleri

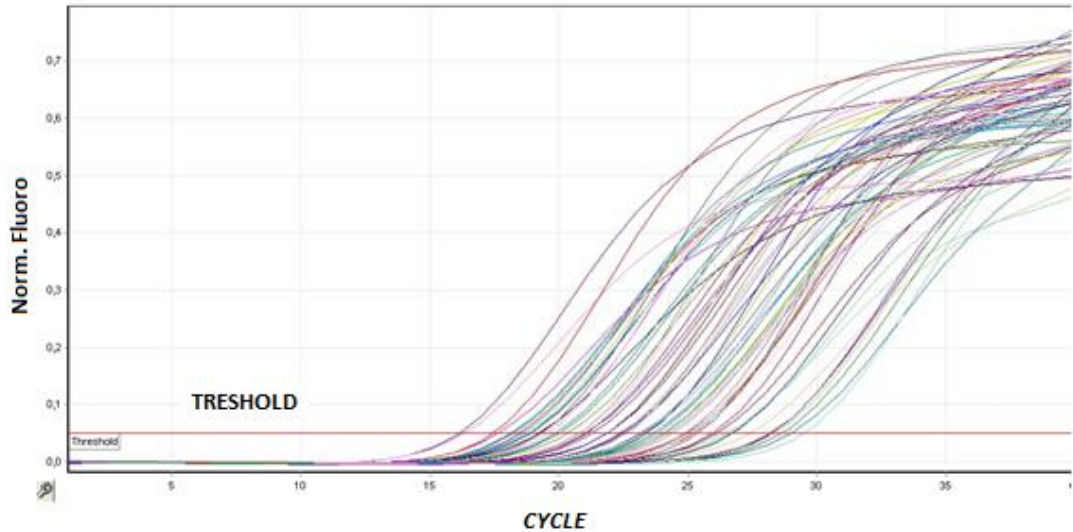
Çalışmamızda yer alan olgular ile kontrol grubu bireylerden izole edilen RNA moleküllerinden sentez edilen cDNA moleküllerinin, ilgili protokoller doğrultusunda amplifikasyonları yapılmıştır (Şekil 4.1). Her reaksiyon sonunda **melting curve (erime eğrisi)** analizleri yapılarak, primerlerde dimerleşme olmadığı ve alınan

floresans değerlerin ilgili gen bölgesine ait olduğu teyid edilmiştir (Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9). Kontrole ait hedef genler ve referans gene ait Ct değerleri ile hastalara ait hedef genler ve referans gene ait Ct değerleri Rotor gene-Q Software programından elde edilmiştir. Her bir analiz 3 tekrarlı olarak hem intraassay hem de interassay olarak yapılmıştır.

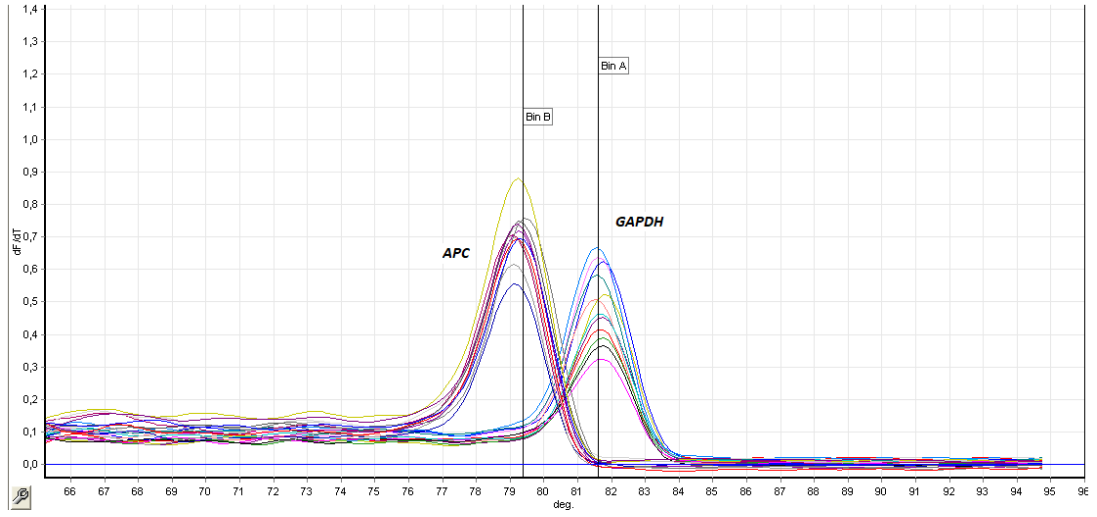
Olgular ile kontrol grubu bireyleri arasında, hedef genlere ait izole edilen mRNA miktarlarındaki rölatif kat değişimlerini hesaplamak için, her bir gene ait amplifikasyon etkinlik değeri ile ortalama Ct değerleri REST 2009 software programına girilmiştir. Program Pfaffl ve ark., (2002) yöntemi temelinde Qiagen tarafından geliştirilmiştir.

Analiz edilecek genlerin ifadenme oranları anlamlılık açısından **Pair Wise Fixed Reallocation Randomizasyon testi** © ile test edilmiştir (Pfaffl ve ark., 2002).

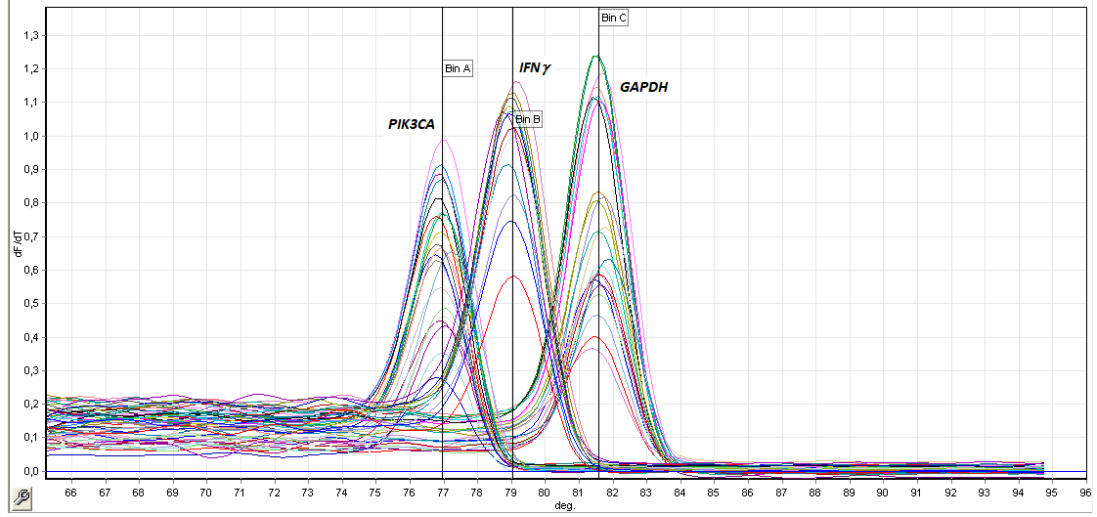
Elde edilen kat değişim değerleri logaritmik olarak hesaplanarak, artış veya azalışları grafik halinde hazırlanmıştır



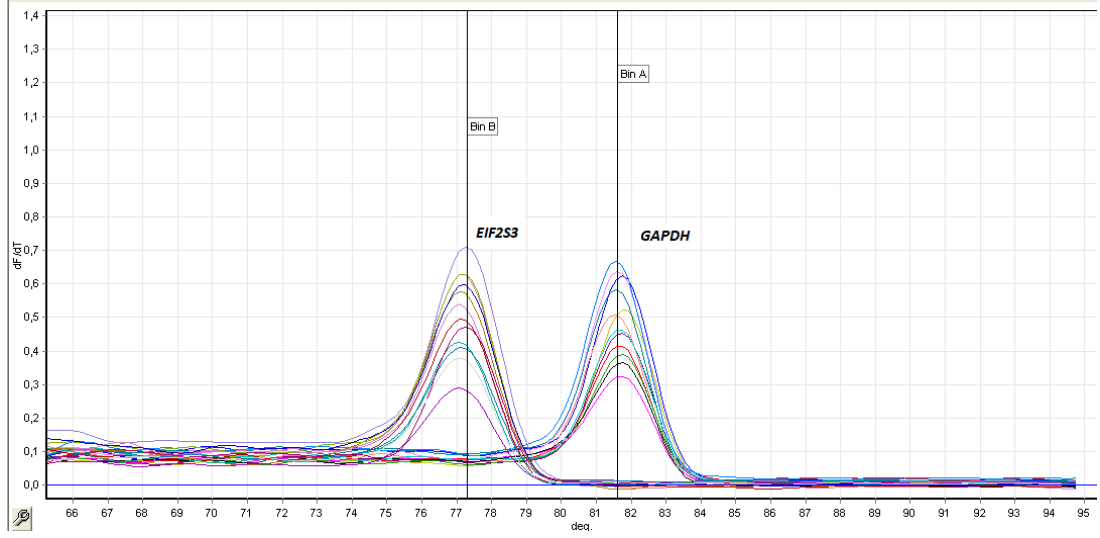
Şekil 4.1. Eş Zamanlı PZR ekspresyon reaksiyon örneği



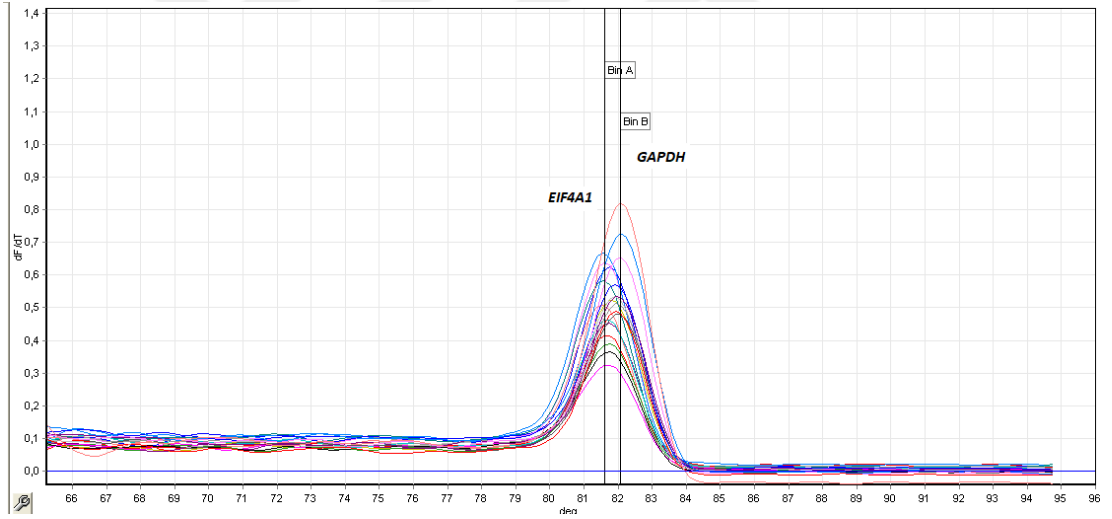
Şekil 4.2. APC ve GAPDH erime eğrisi örneği



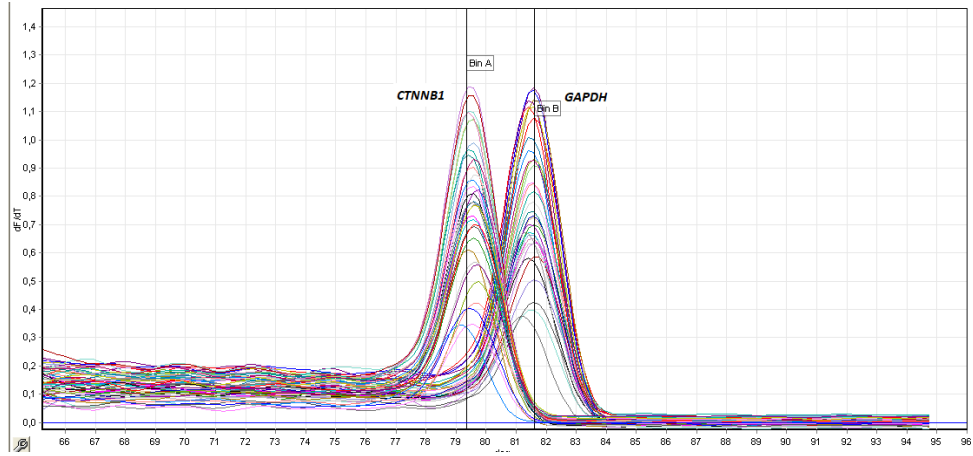
Şekil 4.3. PIK3CA, IFN γ ve GAPDH erime eğrisi örneği



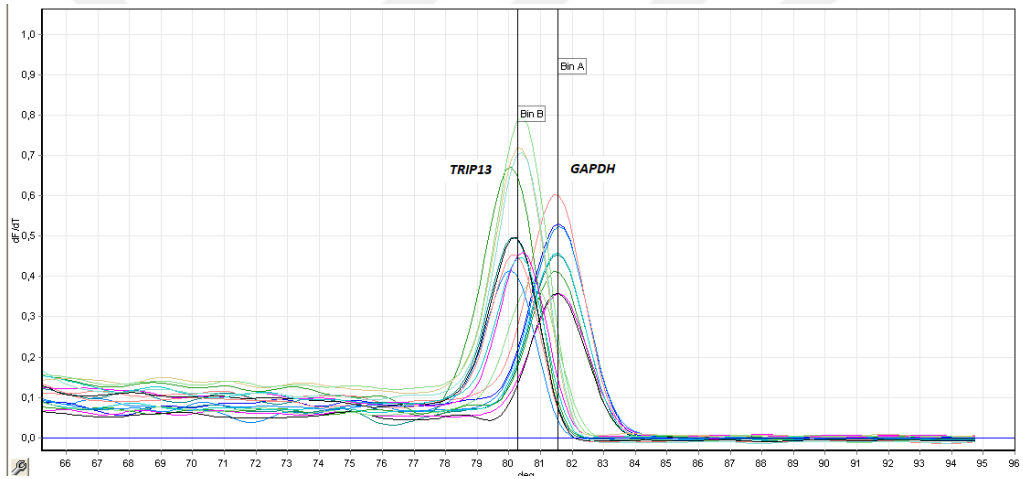
Şekil 4.4. *EIF2S3* ve *GAPDH* erime eğrisi örneği



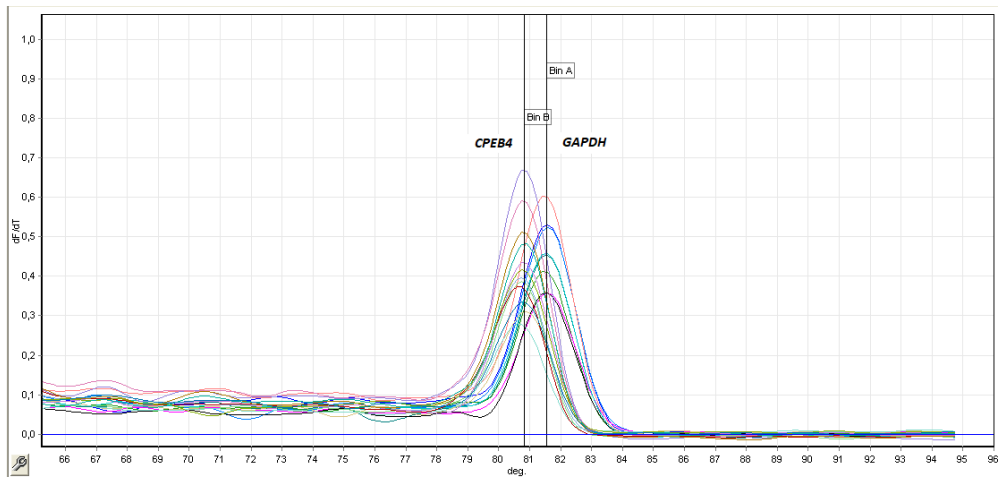
Şekil 4.5. *EIF2S3* ve *GAPDH* erime eğrisi örneği



Şekil 4.6. *CTNNB1* ve *GAPDH* erime eğrisi örneği



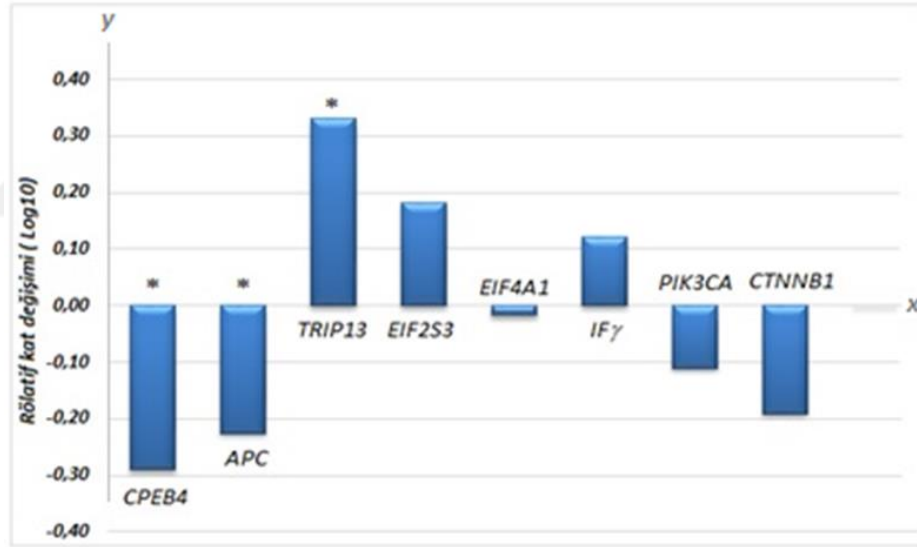
Şekil 4.7. *TRIP13* ve *GAPDH* erime eğrisi örneği



Şekil 4.8. *CPEB4* ve *GAPDH* erime eğrisi örneği

4.3. Dokularda İfade Edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine İlişkin mRNA Analizleri

Kolorektal kanserli olguların tümör dokularında ifade edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerinin kontrol grubu bireylerin dokularına göre mRNA düzeylerindeki değişimler belirlenmiştir. *CPEB4* ve *APC* genlerinin mRNA düzeyi, kontrole göre **önemli derecede azalmışken** (Sırasıyla 0,512 ve 0,594 kat) ($P<0,05$), *TRIP13* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre **önemli derecede artmıştır** (2,139) ($P<0,05$). *EIF2S3* ve *IFN γ* genlerinin mRNA düzeyi, kontrole göre artmışken, *EIF4A1*, *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerinin mRNA düzeyi, kontrole göre azalmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak önemli değildir ($P>0,05$), (Grafik 4.1).

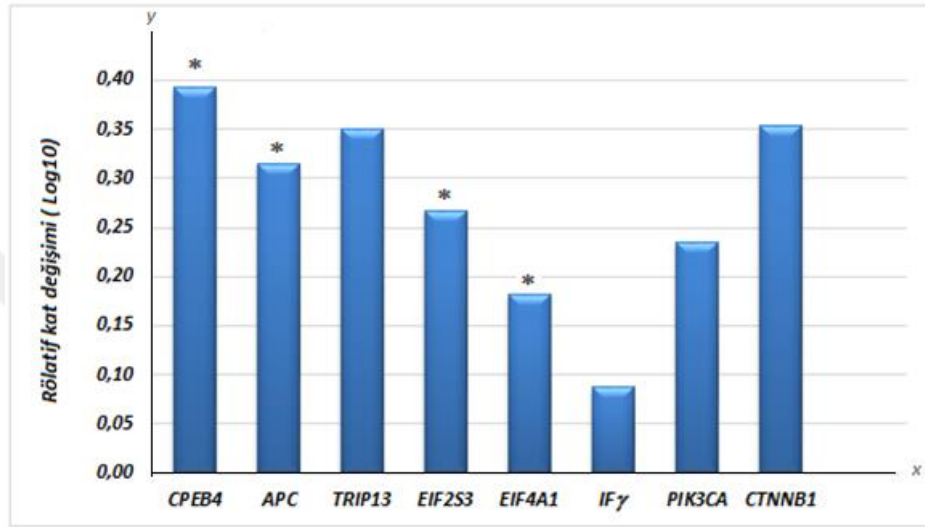


Grafik 4.1. Tümör dokularının, kontrol dokularına göre gen ifade düzeylerindeki değişimler ($*P<0,05$) Rölatif kat değişimleri y düzlemi temelinde artma ve azalma olarak gösterilmiştir. $x=0$ noktası kontrol grubunu temsil etmektedir. y =Gen ifade düzeyindeki artış/azalış

4.4. Periferik Kan Örneklerinde İfade Edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine İlişkin mRNA Analizleri

Olguların periferik kan örneklerinde ifade edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA'ların kontrol grubu

bireylerin periferik kan örneklerindeki ifade düzeylerindeki değişimler belirlenmiştir. *CPEB4*, *APC*, *EIF2S3* ve *EIF4A1* genlerinin mRNA düzeyleri, kontrole göre önemli derecede artmıştır (Sırasıyla; 2,467; 2,066; 1,852; 1,522 kat) ($P<0,05$). *TRIP13*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA düzeyleri de, kontrole göre artmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel düzeyde anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$), (Grafik 4.2).

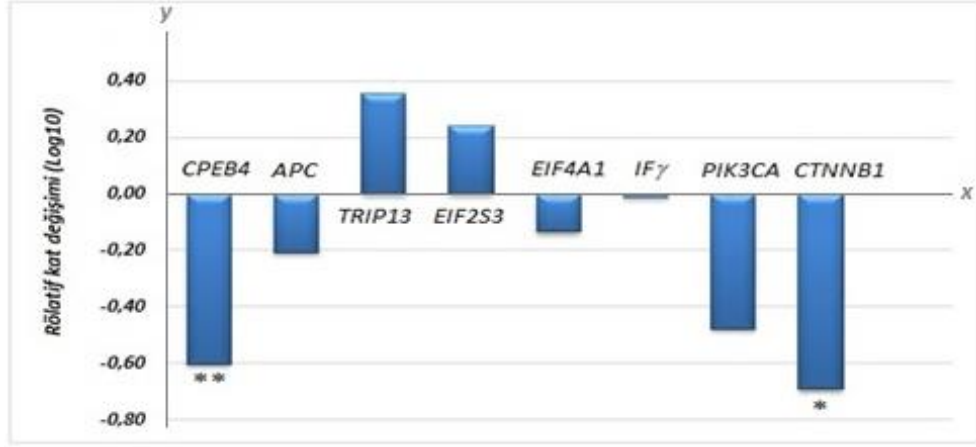


Grafik 4.2. Çalışmamızda yer alan genlerin, hasta olguların periferik kan örneklerindeki kontrole göre ifade değişimleri (* $P<0,05$). Rölatif kat değişimleri y düzlemi temelinde artma ve azalma olarak gösterilmiştir. $x=0$ noktası kontrol grubunu temsil etmektedir. y =Gen ifade düzeyindeki artış/azalış.

4.5. Evre I Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Tümör Dokularında İfade Edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine İlişkin mRNA Analizleri

Evre I kolorektal kanser tümör dokularında ifade edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA'ların kontrol dokularına göre ifade düzeylerindeki değişimler belirlenmiştir. *CPEB4* ve *CTNNB1* genlerinin mRNA düzeyleri, kontrole göre önemli derecede azalmıştır [Sırasıyla; 0,250 kat ($P<0,001$); 0,204 kat ($P<0,05$)]. *APC*, *TRIP13* ve *EIF2S3* mRNA düzeyleri, kontrole göre artmışken, *EIF4A1*, *IFN γ* ve *PIK3CA* genlerine ait mRNA

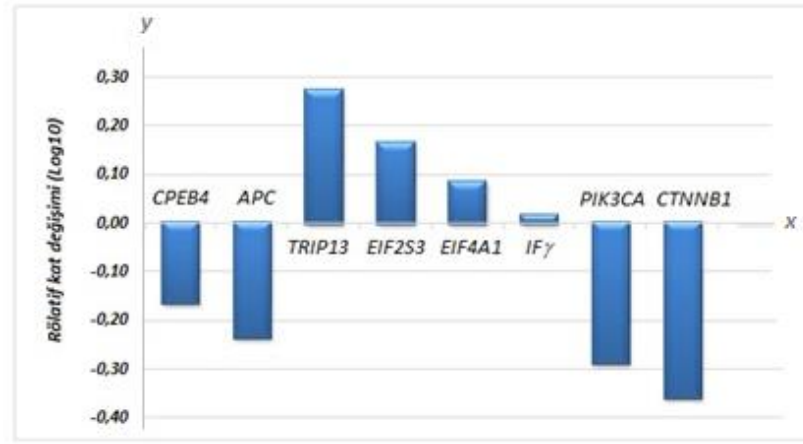
düzeyleri kontrole göre azalmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel düzeyde anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$), (Grafik 4.3).



Grafik 4.3. Evre I kolorektal tümörlerde çalışmamızda yer alan genlerin kontrole göre mRNA düzeyindeki değişimleri (* $P<0,05$; ** $P<0,001$). Rölatif kat değişimleri y düzlemi temelinde artma ve azalma olarak gösterilmiştir. $x=0$ noktası kontrol grubunu temsil etmektedir. y =Gen ifade düzeyindeki artış/azalış

4.6. Evre II Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Dokularda İfade Edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine İlişkin mRNA Analizleri

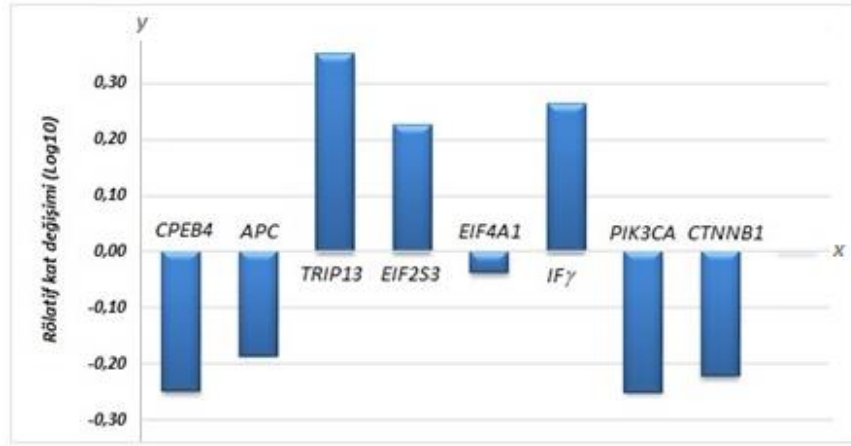
Evre II kolorektal kanser tümör dokularında ifade edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA'ların kontrol dokularına göre değişim düzeyleri belirlenmiştir. *CPEB4*, *APC*, *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerinin mRNA düzeyleri, kontrole göre azalmışken, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1* ve *IFN γ* mRNA düzeyleri, kontrole göre artmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel düzeyde anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$), (Grafik 4.4)



Grafik 4.4. Evre II kolorektal tümörlerde çalışmamızda yer alan genlerin kontrole göre mRNA düzeyindeki değişimleri. Rölatif kat değişimleri y düzlemi temelinde artma ve azalma olarak gösterilmiştir. $x=0$ noktası kontrol grubunu temsil etmektedir. y =Gen ifade düzeyindeki artış/azalış

4.7. Evre III Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Dokularda İfade Edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine İlişkin mRNA Analizleri

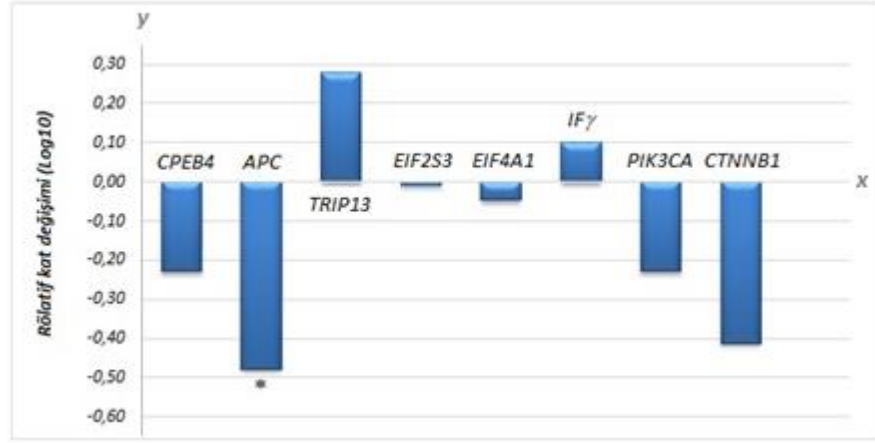
Evre II kolorektal kanser tümör dokularında ifade edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA'ların kontrol dokularına göre değişim düzeyleri belirlenmiştir. *CPEB4*, *APC*, *EIF4A1*, *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerinin mRNA düzeyleri, kontrole göre azalmışken, *TRIP13*, *EIF2S3* ve *IFN γ* mRNA düzeyleri, kontrole göre artmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel düzeyde anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$), (Grafik 4.5).



Grafik 4.5. Evre III kolorektal tümörlerde ilgili genlerin kontrole göre mRNA düzeyindeki değişimleri. Rölatif kat değişimleri y düzlemi temelinde artma ve azalma olarak gösterilmiştir. $x=0$ noktası kontrol grubunu temsil etmektedir. y =Gen ifade düzeyindeki artış/azalış

4.8. Evre IV Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Dokularda İfade Edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine İlişkin mRNA Analizleri

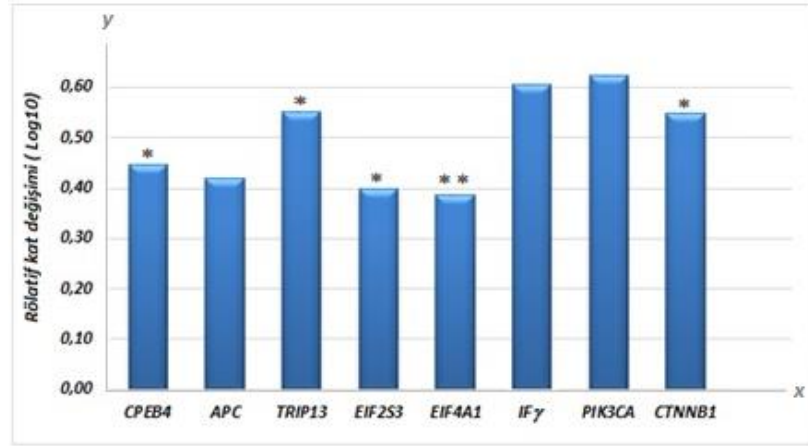
Evre II kolorektal kanser tümör dokularında ifade edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA'ların kontrol dokularına göre değişim düzeyleri belirlenmiştir. *APC* geninin mRNA düzeyi, kontrole göre önemli derecede azalmıştır. [0,333 kat, ($P<0,05$)]. İlaveten, *CPEB4*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *PIK3CA* ve *CTNNB1* ve *IFN γ* mRNA düzeyleri, kontrole göre azalmışken, *TRIP13* ve *IFN γ* mRNA düzeyleri kontrole göre artmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel düzeyde anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$), (Grafik 4.6).



Grafik 4.6. Evre IV kolorektal tümörlerde ilgili genlerin kontrole göre mRNA düzeyindeki değişimleri (* $P < 0,05$). Rölatif kat değişimleri y düzlemi temelinde artma ve azalma olarak gösterilmiştir. $x=0$ noktası kontrol grubunu temsil etmektedir. y =Gen ifade düzeyindeki artış/azalış

4.9. Evre I Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Periferik Kan Örneklerinde İfade Edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine İlişkin mRNA Analizleri

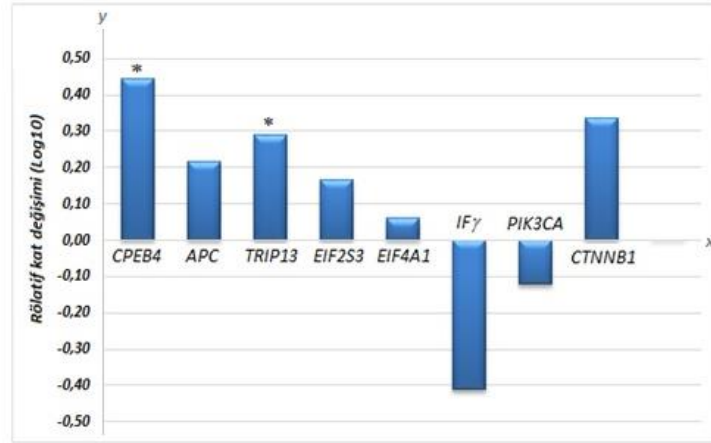
Evre I kolorektal kanser hastalarına ait periferik kan örneklerinde ifade edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA'ların kontrol kanlarına göre değişim düzeyleri belirlenmiştir. *CPEB4*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *CTNNB1* *EIF4A1* genlerinin mRNA düzeyleri, kontrole göre önemli derecede artmıştır [Sırasıyla; 2,803 kat; 3,553 kat; 2,507 kat; 3,548 kat ($P < 0,05$); 2,441 kat; ($P < 0,001$)]. *APC*, *IFN γ* ve *PIK3CA* genlerine ait mRNA düzeyleri de kontrole göre artmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak önemli değildir ($P > 0,05$) (Grafik 4.7).



Grafik 4.7. Çalışmamızda yer alan genlerin, Evre I kolorektal kanserli olguların periferik kan örneklerindeki kontrole göre ifade değişimleri (* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$). Rölatif kat değişimleri y düzlemi temelinde artma ve azalma olarak gösterilmiştir. $x=0$ noktası kontrol grubunu temsil etmektedir. y =Gen ifade düzeyindeki artış/azalış

4.10. Evre II Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Periferik Kan Örneklerinde İfade Edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine İlişkin mRNA Analizleri

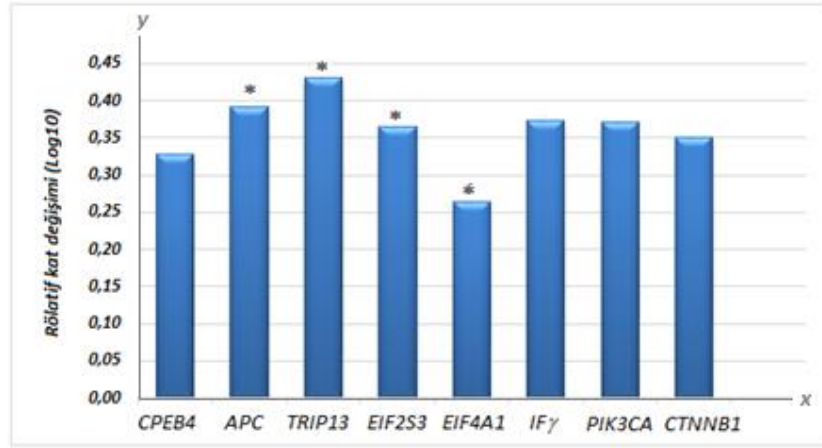
Evre II kolorektal kanser hastalarına ait periferik kan örneklerinde ifade edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA'ların kontrol kanlarına göre değişim düzeyleri belirlenmiştir. *CPEB4* ve *TRIP13* genlerinin mRNA düzeyleri, kontrole göre önemli derecede artmıştır [Sırasıyla; 2,788 kat; 1,943 kat $P < 0,05$]. *APC*, *EIF2S3*, *EIF4A1* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA düzeyleri de kontrole göre artmışken, *IFN γ* ve *PIK3CA* genlerine ait mRNA düzeyleri kontrole göre azalmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak önemli değildir ($P > 0,05$) (Grafik 4.8).



Grafik 4.8. Çalışmamızda yer alan genlerin, Evre II kolorektal kanserli olguların periferik kan örneklerindeki kontrole göre ifade değişimleri (* $P < 0,05$). Rölatif kat değişimleri y düzlemi temelinde artma ve azalma olarak gösterilmiştir. $x=0$ noktası kontrol grubunu temsil etmektedir. y =Gen ifade düzeyindeki artış/azalış

4.11. Evre III Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Periferik Kan Örneklerinde İfade Edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine İlişkin mRNA Analizleri

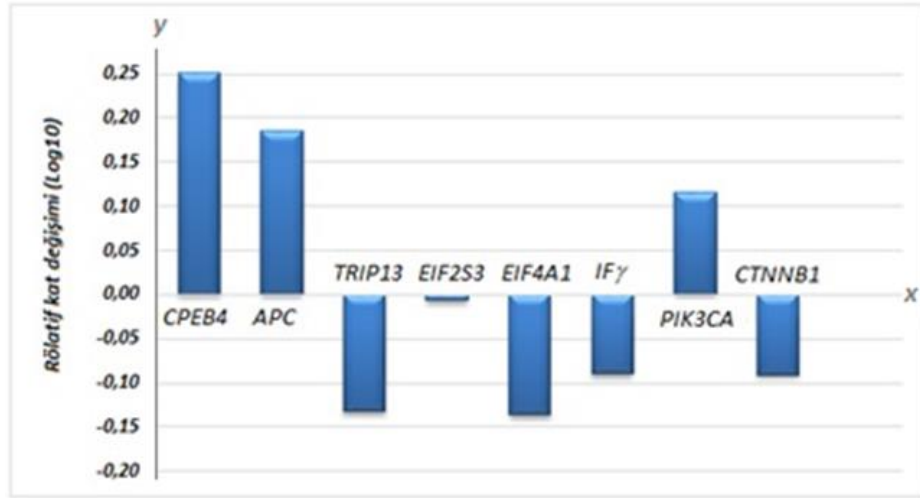
Evre III kolorektal kanser hastalarına ait periferik kan örneklerinde ifade edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA'ların kontrol kanlarına göre değişim düzeyleri belirlenmiştir. *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3* ve *EIF4A1* genlerinin mRNA düzeyleri, kontrole göre önemli derecede artmıştır [Sırasıyla; 2,47 kat; 2,696 kat 2,32 kat, 1,838 kat $P < 0,05$]. *CPEB4*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA düzeyleri de kontrole göre artmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak önemli değildir ($P > 0,05$) (Grafik 4.9).



Grafik 4.9. Çalışmamızda yer alan genlerin, Evre III kolorektal kanserli olguların periferik kan örneklerindeki kontrole göre ifade değişimleri (* $P < 0,05$). Rölatif kat değişimleri y düzlemi temelinde artma ve azalma olarak gösterilmiştir. $x=0$ noktası kontrol grubunu temsil etmektedir. y =Gen ifade düzeyindeki artış/azalış

4.12. Evre IV Kolorektal Kanser Hastalarına Ait Periferik Kan Örneklerinde İfade Edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* Genlerine İlişkin mRNA Analizleri

Evre IV kolorektal kanser hastalarına ait periferik kan örneklerinde ifade edilen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerine ait mRNA'ların kontrol dokularına göre değişim düzeyleri belirlenmiştir. *CPEB4*, *APC* ve *PIK3CA* genlerinin mRNA düzeyleri, kontrole göre artmışken, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A1*, *IFN γ* ve *CTNNB1* mRNA düzeyleri, kontrole göre azalmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak önemli değildir ($P > 0,05$), (Grafik 4.10).



Grafik 4.10. Çalışmamızda yer alan genlerin, Evre IV kolorektal kanserli olguların periferik kan örneklerindeki kontrole göre ifade değişimleri. Rölatif kat değişimleri y düzlemi temelinde artma ve azalma olarak gösterilmiştir. $x=0$ noktası kontrol grubunu temsil etmektedir. y =Gen ifade düzeyindeki artış/azalış

5. TARTIŞMA

Moleküler biyoloji ve genetik, tıbbi onkolojideki en ilginç konulardan birini temsil eder, çünkü tümör ilerlemesinde yer alan moleküler değişiklikler hakkında global ve detaylı bir bilgi sağlar, bu da karsinogenez sürecinin daha iyi anlaşılmasına, yeni prognostik belirteçlerin ve yeni terapötik hedeflerin keşfedilmesine yol açar. Kanserin sınıflandırılması ve prognostik gruplandırılması için klinik ve patolojik parametreler bulunmasına rağmen, bu multiform hastalığın biyolojik ve genetik heterojenliği nedeniyle günlük uygulamada yetersiz kalabilir (Lagerstedt, 2009).

Fearon ve Vogelstein (1990), adenomakarsinom dönüşümü prensibini geliştirerek, adenomdan karsinoma geçişin, düzenleyici onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen ve klonal popülasyona büyüme avantajı sağlayan genetik olayların birikimi ile ilişkili olduğunu varsayar. 1990 yılından bu yana, APC, p53 ve KRAS gen mutasyon tayinine dayanan moleküler belirleme yöntemleri gerçekleştirilmiştir. APC yolağının kolorektal tümörlerin yaklaşık %95'inde değiştiği belgelenmiştir (Powell ve ark., 1992). Aynı oran p53 yolağında mutasyona sahip tümörler için de geçerlidir (Ohue ve ark., 1992). Şimdiye kadar tümörlerin yaklaşık %70'inde Ras/Raf yolunda değişikliğe yol açan somatik mutasyonlar bulunmuştur. Kolorektal kanserlerde somatik mutasyonları olan başka genler de vardır, ancak bunların rolleri ve yolakları daha az incelenmiştir. Bu moleküler belirteçlerin kullanılabilirliğine rağmen, uygulamalar kolorektal kanserli olgular için sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle belirleyici gen listelerinin tanımlanması için yeni moleküler belirteçler gereklidir (Paik ve ark., 2004).

Kolorektal kanserli olguların tümörlerinin evrenmesi için, tümörle ilişkili proteinlerin immünohistokimyasal boyanması, bölgesel lenf nodlarındaki moleküler belirteçlerin eş zamanlı PZR yöntemi ve kandaki tümör hücrelerinin tespiti gibi alternatif teknikler önerilmiştir. Spesifik biyobelirteçlerle eş zamanlı PZR uygulamasının geleneksel mikroskopiden daha duyarlı olduğu ve her bir lenf nodunun eş zamanlı olarak test edilebileceği önerilmiştir (Oberg ve ark., 2004; Schulz ve ark., 2006; Nordgard ve ark., 2009; Sargent ve ark., 2011).

Gen ekspresyon analizi, kanserdeki global gen dozajı hassasiyetini tanımlamaktadır. Şimdiye kadar binlerce genetik varyant; kanser, diğer hastalıklar ve karmaşık özellikler ile ilişkilendirilmiştir. Hastalıkla ilişkili tek nükleotid polimorfizmlerinin ve somatik kopya sayısı değişimlerinin, gen ifade seviyelerini sıklıkla etkilediği açıklığa kavuşturulmuştur (Stranger ve ark., 2007; Fehrmann ve ark., 2011; Westra ve ark., 2013; Ciriello, ve ark., 2013). Bu sonuçlar, gen ifadesindeki değişikliklerin, genetik varyantların ortaya çıkardığı fenotip üzerindeki etkilerini göstermeleri için önemli bir ara mekanizma olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, genlerin ifade düzeylerinin somatik kopya sayısı değişimlerinden ne ölçüde etkilendiği henüz tam belli değildir.

Kanserin sınıflandırılması ve prognostik gruplandırılması için klinik ve patolojik parametreler bulunmasına rağmen, bu multiform hastalığın biyolojik ve genetik heterojenliği nedeniyle bu parametreler günlük uygulamada yetersiz kalmaktadır (Kheirleiseid, 2011).

Kolorektal kanserde, hastaların takip ve tedavi stratejilerindeki mevcut histopatolojik faktörleri tamamlamak için moleküler belirteçler olarak kullanılabilecek oldukça farklı ekspresyon paternlerine sahip kapsamlı bir biyobelirteç listesi oluşturulmalıdır. Mezenterik lenf nodu metastazı kolorektal kanserde en önemli prognostik özelliktir. Lenf nodu durumu evreleme için kullanılmakta olup, postoperatif adjuvan tedavi için belirleyici bir seçim kriteridir. Bununla birlikte, rutin histopatoloji (**H&E:Hematoksilen ve Eozin**) ile lenf nodu durumunu doğru bir şekilde belirlemek zordur. Bu nedenle, H&E tarafından lenf nodlarında tümör hücreleri olmadığı düşünülen kolorektal kanserli hastaları ~%25'i, örneğin evre I-II, kolorektal kanserden ölür (Ohlsson, 2011).

Tarama testleri giderek daha fazla önem arz etse de, kolon kanseri vakaları genellikle sağ kalım şansının büyük ölçüde azaldığı tümörün ileri bir aşamasında teşhis edilir. Dünyada, kolorektal kanser son derece yüksek insidans ve mortalite ile karakterizedir. Bugüne kadar yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmasına rağmen kolorektal tümörlerin gelişimi sırasında moleküler değişiklikler henüz kısmen rapor

edilmiştir. Kolon kanseri gelişimi sırasında çeşitli gen ifadesi farklılıklarının tespit edilebileceği iyi bilinmektedir. Tüm genom ekspresyon çalışmaları temelinde, klinik olarak kullanışlı biyobelirteçlerin tanımlanması ve daha sonra geliştirilerek tümör sınıflandırılmasında rutin teşhisin bir parçası olarak kullanılması amaçlanmaktadır (Alexandra, 2015).

Bu çalışmada *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerinin mRNA düzeyleri; hem kolorektal kanser tanısı alan olguların tümör dokuları ile sağlıklı bireylerin kolon dokularında hem de aynı olgular ile sağlıklı bireylerin periferik kanlarında belirlenmiştir.

5.1. Kolorektal Kanser ile *CPEB4* Gen İfadesinin İlişkisi

CPEB ailesinin tipik bir üyesi olan sitoplazmik poliadenilasyon elemanı bağlayıcı protein 4 (*CPEB4*), çeşitli malignitelerde seçici olarak aşırı ifade edildiği gösterilmiş olan diziye özgü RNA bağlayıcı protein ve translasyon düzenleyicisidir (Chen ve ark., 2016). Bugüne kadar, çoğu kolorektal kanser çalışmasında transkripsiyon sonrası süreçler göz ardı edilerek, DNA ile ilişkili düzensizliklere (aberasyonlara) odaklanılmıştır. Ancak, transkripsiyon sonrası değişikliklerin kanser sürecinin yönetilmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. RNA bağlayıcı proteinler, her kanser işaretinin kritik düzenleyicileri olarak öne çıkmakla birlikte altta yatan mekanizmalar ve onkogenik hedefler hakkında çok az şey bilinmektedir (Chian ve ark., 2016). *CPEB4*, translasyona uğramamış mRNA'nın 3' bölgelerindeki spesifik dizilerle birleşir ve sitoplazmik poliadenilasyonu indükleyerek translasyonu teşvik eder. *CPEB4*'ün anormal ifadesi, belirli kanser türleri ile ilişkilidir, bu da *CPEB4*'ün kanser proliferasyonu ve metastazının kontrolünde kritik roller oynayabileceğini gösterir. Özellikle, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, *CPEB4*'ün, glioma ve meme kanserleri gibi belirli kanser türlerinde kanser hücrelerinin göçü ve istilasında önemli bir rol oynadığını ve kanser tedavisi için bir hedef olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Ortiz-Zapater ve ark., 2012; Xu ve ark., 2013; Zhijun ve ark., 2017; Lu ve ark., 2017). Bunun yanı sıra kanserle ilişkili RNA bağlayıcı proteinlerin

tanımlanması, kolorektal kanser biyolojisini anlamak ve potansiyel olarak kanser tedavisi ve prognostik biyobelirteçler ile yeni hedefler ortaya koymak açısından büyük ilgi görmektedir (Chian ve ark., 2016).

CPEB4 ile ilişkili mRNA molekülleri, RAS gen ailesi ile ilişkili moleküller, hücre sinyal bileşenleri, kromatin yeniden modelleme proteinleri, siklinler, apoptoza bağlı moleküller, stres ve inflamasyon faktörleri, metabolik hücre göçü ve metastazı ile ilgili enzimler ve genlerin dahil olduğu tümörögenез ilişkili çoklu hücresel fonksiyonlarla zengin bir yelpazede ifade edilir (Ortiz-Zapater ve ark., 2012). Ayrıca, *CPEB4*'ün invaziv duktal meme kanserinde, kolorektal kanserde, pankreatik duktal adenokarsinomda, metastatik prostat kanserinde ve glioblastomada, invazyon, tümör büyümesi, vaskülarizasyon ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Ortiz-Zapater ve ark. 2012; Xu ve ark., 2013; Zhong ve ark., 2013; Chen ve ark., 2016; Sun ve ark., 2015).

Kolorektal kanser dokularının yüksek seviyede *CPEB4*'ü ifade ettiği ve yüksek mRNA düzeyinin ilerlemiş tümör evresi, lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve kolorektal kanserli hastalarda zayıf prognozla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Zhong ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda tüm kolorektal tümör dokularında *CPEB4* mRNA düzeyi önemli derecede azalmıştı. Ancak bizim çalışmamızla benzer olarak, Xu ve Liu (2013) *CPEB4*'ün mRNA düzeyinin prostat kanseri ve bitişik dokularda kontrole göre azaldığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalara bakıldığında farklı tip tümör dokularında *CPEB4* ile ilişkili farklı sonuçlar mevcuttur. *CPEB4*'ün yüksek seviyede ifadesinin çok çeşitli malignansilerde tanımlanmış olmasından dolayı, *CPEB4*'ün preonkogenik etkiler uygulayarak tümör büyümesi, invazyonu ve vaskülarizasyonu etkilediği düşünülmektedir (Ortiz-Zapater ve ark., 2012). Bunun yanı sıra *CPEB4* gen ifadesinin NSCLC örneklerinde kanserli olmayan komşu dokulara kıyasla göreceli olarak daha az olduğu bildirilmiştir (Huang ve ark., 2015). Bir başka çalışmada, *CPEB4* gen ifadesinin pankreatik duktal karsinomda arttığı (Ortiz-Zapater ve ark., 2012) fakat hepatoselüler karsinomda azaldığı rapor edilmiştir (Tian ve ark., 2012). 125 hepatoselüler karsinoma hastasından alınan karaciğer örnekleri 49 kontrole karşılaştırıldığında *CPEB4*'ün protein seviyesinin erken evre

hepatoselüler karsinomda arttığı, geç evre hepatoselüler karsinomda azaldığı bildirilmiştir (Tsai ve ark. 2016). Hepatoselüler karsinom ilerlemesi esnasında *CPEB4*'ün gen ifadesindeki bu değişimler, tümörögenizde karmaşık bir rolü olduğunu göstermektedir. Ortiz-Zapater ve ark. (2012) *CPEB4* gen ifadesinin pankreatik duktal adenokarsinomlarda arttığını, pankreatik kanser ilerlemesinde post-transkripsiyonel gen regülasyonu için önemli bir role sahip olduğunu, bu artışın tümör gelişiminde genel bir mekanizma olabileceğini, *CPEB4*'ün muhtemel yeni bir terapötik hedef olabileceğini ve *CPEB4* gen ifadesinin susturulmasının, kanser metastazını kontrol etmek için iyi bir yol olduğunu öne sürmüşlerdir. *CPEB4* gen ifadesinin gliomanın patolojik derecesiyle doğru orantılı olduğu, primer tümörlerde artmış *CPEB4* gen ifadesinin hastalarda kötü sonuçların tahmin edilmesinde ve baskılanmış *CPEB4* gen ifadesinin tümör hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve glioblastoma için potansiyel bir terapötik hedef olduğu öne sürülmüştür (Wang ve ark., 2018). Bununla birlikte Hu ve ark. (2015) *CPEB4* gen ifadesinin gliomada önemi derecede arttığını ve bu artışın ilerlemiş kanser evresiyle doğru orantılı olduğu rapor edilmiştir. Glioma hastaları için, *CPEB4*'ün yüksek derecede hassas prognostik bir indikatör olabileceği bildirilmiştir. *CPEB4*'ün, kolorektal kanser, cilt kanseri ve böbrek kanseri de dahil olmak üzere çok çeşitli tümörlerde aşırı ifade edildiği, *CPEB4*'ün yüksek ifadesinin de tümör gelişiminde etkin olabileceği düşünülmektedir. *CPEB4*'ün tümör invazyonu ve metastaz süreçlerinde önemli olduğu ve yüksek ifade düzeyinin kolorektal kanser hastalarında kötü sonuç için bir gösterge olduğu öne sürülmüştür (He ve ark. 2017). İlaveten, Xu ve Liu (2013) invaziv ve metastatik kanserlerde benzer sonucu bildirmiştir.

Bunun yanısıra, *CPEB4*'ün ayrıca kolorektal kanserli olguların periferik kanlarında yüksek derecede ifade edildiği (Chang ve ark., 2014) ve bu yüksek ifade düzeyinin proliferatif kanser hücreleri için bir markör olan ki-67 ekspresyonu ile pozitif olarak korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Zhong ve ark., 2015). Bu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da *CPEB4* mRNA düzeyi kolorektal kanserli hastaların periferik kanlarında önemli derecede artış göstermiştir. Evreler bakımından kıyaslama yapıldığında da Evre I ve Evre II'de bu artış önemlidir. **Bu durum kolorektal kanserin ilk aşamalarından itibaren periferik kanda *CPEB4***

gen ifadesinin kolorektal kanser için bir gösterge olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tip gen ifadesi değişikliklerinin farklı tip hücrelerde *CPEB4* ile düzenlenen farklı yollarla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Huang ve ark., 2015). Elbette, bu konuları açıklığa kavuşturmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

5.2. Kolorektal Kanser ile APC Gen İfadesinin İlişkisi

APC geni, oligomerleşmeye aracılık eden ve ayrıca β -katenin, γ -katenin, glikojen sentaz kinaz (GSK)-3 β , aktin, tübülün, EBI ve hDLG'yi içeren çeşitli hücre içi proteinlere bağlanan çok sayıda fonksiyonel alana sahip bir proteini kodlar (Kinzler ve Vogelstein, 1996). *APC'deki* germ hattı mutasyonları FAP veya varyantlarından biriyle, Gardner sendromu, zayıflatılmış FAP, Turcott sendromu veya düz adenom sendromu ile sonuçlanır (Foulkes, 1995; Soravia ve ark., 1998). Çalışmalar *APC*'nin kolorektal kanserlere özgü yüksek *APC* mutasyon sıklığı olan sporadik kolon adenokarsinomlarının %70'inde mutasyona uğradığını göstermiştir (Miyaki ve ark., 1994; Chung, 2000). Bu mutasyonlar, kolon kanseri oluşumunun en erken aşamalarında başlar ve kolon kanseri oluşumu sırasında gözlenen diğer değişikliklerden önce gelir (Vogelstein ve ark., 1988; Powell ve ark., 1992). Bu mutasyonların tümörü teşvik eden temel etkilerinden biri, Wingless/Wnt sinyal yolunun aşırı aktivasyonu ile sonuçlanır ve daha sonra hücre büyümesini destekleyen genlerin ifadesi ile sonuçlanır (Kheirlesei, 2011).

Yapılan literatür taramalarında, *APC* mutasyonlarıyla ilişkili birçok çalışma olmasına rağmen, **gen ifadesiyle ilgili fazla çalışma bulunmamaktadır**. Birnbaum ve ark., (2012), *APC* geninin gen ifadesi, mutasyon, allelik kaybı ve promotor metilasyonu ve metastaz oluşumunun birleşik analizi yoluyla, 183 kolon adenokarsinomu serisindeki rolünü araştırmışlardır. Olguların %73'ünde nokta mutasyonları ve %39'unda alelik kayıplar tespit edilmişken; tümörlerin %59'u bialelik inaktivasyon göstermiştir. *APC* gen ifadesi değişikliklerinin sayısı ve tipi ile

metastatik dönüşüm arasında bir ilişki bulunmamıştır. Sonuçlar, *APC* durumunun belirlenmesinin metastaz öngörüsünde yardımcı olamayacağını ve evre II kolon kanserlerini sınıflamak için kullanılamayacağını göstermektedir.

Bizim çalışmamızda tüm kolorektal tümör dokularında *APC* geninin mRNA düzeyi önemli derecede azalmışken, aynı olguların periferik kanlarında önemli derecede artmıştır. Evreler bakımından kıyaslama yapıldığında da Evre III'de bu artış önemlidir. Hacer (2001)'in çalışmasında 20 kolorektal karsinomlu hastadan 8'inde *APC* geninde mutasyon olduğunu geri kalanlarda ise *APC* gen ifadesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklı derecelerde azalma olduğunu rapor etmiştir. NIH3T3 fibroblast hücrelerinde serumla indüklenen G0/G1'den S fazına hücre döngüsü ilerlemesi bloke etmek için *APC*'nin aşırı ifade edildiği, oysa ki mutant *APC*'de böyle olmadığı öne sürülmüştür (Baeg ve ark., 1995). Bu verilerle tutarlı olarak kolorektal kanser hücre hatlarında G1 fazına geçişin engellenmesi için *APC*'nin aşırı ifade edildiği öne sürülmüştür (Heinen ve ark., 2002). Bu fonksiyon, siklik D1 ve c-myc gibi S-fazı düzenleyicilerinin β -katenin/Tcf aracılı transkripsiyonunun düzenlenmesiyle kısmen ilişkilendirilmiştir (Heinen ve ark., 2002). *APC*'nin bir β -kateninden bağımsız olarak da proliferasyonu etkileyebileceği öne sürülmüştür. Böylece, mutant *APC*'nin G1/S kontrol noktasında deaktif olması aberant hücre proliferasyonuna katkı sağlayabilir.

APC genindeki mutasyonlar, FAP'ta kolorektal kansere kalıtsal yatkınlığın temelidir. Aynı zamanda sporadik kolorektal tümörlerin oluşmasında birincil olaydır. *APC* mutasyonlarının diğer kanser tümör tiplerinde neden daha az bulunduğu hala bilinmemektedir. *APC*'nin wnt- sinyalizasyonundaki rolünün kolorektal karsinogenezdeki rolünden sorumlu olması muhtemeldir. Mutant *APC* ayrıca, her ikisi de kanser ilerlemesinde rol oynayan hücre iskeleti yapışmasını ve stabilitesini bozabilir. Düşük penetranslı *APC* mutasyonlarının veya missens varyantlarının kalıtsal kolorektal kanser riskine katkısı hakkında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Nicola ve ark., 2001).

Kopya sayısı değişiklikleri, regölasyondaki değişiklikler, delesyonlar, ciddi mutasyonlar ve diğer potansiyel nedenler *APC* mRNA ifade verileri yoluyla ayırt etmek zordur. Başka bir deyişle, *APC* mRNA değişimlerine göre nedensellik ile korelasyonu kanıtlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. mRNA analizleri sonucu elde edilmiş bu veriler mutasyon durumu ve diğer klinikopatolojik özellikler gibi gerekli her türlü bilgi için yeterli değildir. *APC'nin* hem genetik hem de biyolojisinin daha iyi anlaşılması sonrasında, zaman içinde, özellikle kolorektal kanser yükünü azaltmayı hedefleyen önleyici veya terapötik stratejiler belki geliştirilebilir.

5.3. Kolorektal Kanser ile *CTNNB1* Gen İfadesinin İlişkisi

CTNNB1 geni, beta-katenin adı verilen bir proteinin yapımından sorumludur. Beta-katenin, hücrelerin birbirine yapışmasında ve hücreler arasındaki iletişimde önemli bir rol oynar (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1#>). *CTNNB1* genindeki somatik mutasyonlar, birçok kanser türünde tanımlanmıştır. Bunlar arasında kolorektal, karaciğer, tiroid, yumurtalık, endometriyal ve cilt kanserleri ile medulloblastom adı verilen bir beyin tümörü bulunur.

Çalışmalar, *CTNNB1* genindeki fonksiyon kazancı mutasyonlarının, artık ihtiyaç duyulmadığında beta-katenin parçalanmasını önlediğini ve proteinin hücreler içinde birikmesine izin verdiğini göstermektedir. Fazla beta-katenin hücre çekirdeğine geçer ve kanserli tümörlerin gelişmesine izin vererek hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını destekler. *CTNNB1* genindeki mutasyonlar normal hücrelerin kanserli hale gelmesine neden olabileceğinden, *CTNNB1* onkogenler olarak bilinen bir gen sınıfına aittir. Bazen, diğer onkogenlerdeki mutasyonlar, kansere neden olmak için *CTNNB1* gen mutasyonları ile birlikte ortaya çıkar. (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1#>).

Eğer β-katenin fosforile olmaz ve bu nedenle parçalanmazsa, hücresel sitoplazma ve çekirdek içinde birikir (Kobayashi ve ark., 2000). B-katenin birikimi,

wnt-sinyali (Miller ve ark., 1999; Akiyama ve ark., 2000) sonucu, APC'nin inaktivasyonu veya β -katenin'in kendisinin doğrudan mutasyonu ile meydana gelebilir (Polakis, 1999). APC veya *CTNNB1* (β -katenin) genlerindeki mutasyonlar GSK3 β aracılı fosforilasyonu engellemekte ve bunu takiben β -katenin degradasyonu gerçekleşmekte (Munemitsu ve ark., 1996) ve β -katenin transkripsiyonunun (Rubinfeld ve ark., 1997) aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır.

Bizim çalışmamızda özellikle Evre I kolorektal kanser dokularında ve periferik kan örneklerinde önemli derecede farklı mRNA düzeyleri tespit edilmiştir. *CTNNB1* mRNA düzeyi tümör dokularında kontrole kıyasla azalmışken, periferik kanda artmıştır. APC mutasyonları, APC'nin β -katenin ile ilişkisini bozarak aşırı miktarda β -katenin birikmesine ve Wnt sinyal yolunun aşırı aktivasyonuna yol açar. Sonuç olarak, tümör oluşumunu destekleyen genler transkripsiyona uğrar. Wnt sinyal yolunun aşırı aktivasyonu gerçekleşir ki normalde GSK-3 β , APC, β -katenin ve axin ile bir kompleks oluşturarak ve bu proteinleri fosforile eder. Wnt'nin bağırsak homeostazındaki bu kritik rolü, Wnt yolu deregülasyonunun kolorektal karsinogeneze neden önemli bir katkıda bulunduğunu anlamak için temel oluşturur. Bilinen Wnt sinyal kaskadlarından Wnt/b-katenin (kanonik yol) kolorektal kanserlerin yaklaşık %90'ında mutasyona uğrar. Bu mutasyonlar esas olarak APC ve β -katenin genlerinde bulunur ve her ikisi de yolak aktivasyonuna yol açar, ancak diğer yol bileşenleri de mutasyonları barındırabilir (Bray ve ark., 2018). Wnt- β -katenin sinyal aktivasyonu, nükleusta kolorektal kanser tümörlerinin >%80'inde tespit edilebilen β -katenin birikmesine yol açar (Cross ve ark., 2010). Ayrıca, yüksek nükleer β -katenin düzeyleri, kolorektal kanser hastalarında kötü prognoz ile korele edilmiştir (Brenner ve ark., 2012). Regüle edilmemiş β -katenin aktivitesinin tümörojenik sonuçları, hem hücresel büyüme ve proliferasyonun doğrudan uyarılması hem de farklılaşma programlarının bozulması ile ilişkili olabilir (Kwong ve Dove, 2009).

5.4. Kolorektal Kanser ile *TRIP13* Gen İfadesinin İlişkisi

TRIP13'ün mayotik rekombinasyon, iğ kontrol noktası ve kromozom sinapslarında anahtar rol oynadığı bulunmuştur (Vader, 2015). Yapılan çalışmalar *TRIP13*'ün çoklu neoplazmlarda aşırı ifade edildiğini göstermiştir (Banerjee ve ark., 2014; Tao ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2017). *TRIP13* ilk olarak 2014 yılında baş ve boyun kanserinde onkogen olarak bildirilmiştir. Daha sonraki birkaç çalışmada *TRIP13*'ün diğer neoplazmlarda onkojenik bir rol oynadığı ortaya çıkmıştır (Banerjee ve ark., 2014; Kurita ve ark., 2016; Tao ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2017).

TRIP13'ün, hücre bölünmesinin doğru ilerlemesini sağlayan kinetokorda lokalize bir protein olduğu gösterilmiştir (Farmer ve ark., 2012). Bir dizi kinetokorda-lokalize protein, çeşitli kanserlerde yüksek oranda sentezlenmektedir ve bunların sentezlenmesi, kanser hücrelerinin genomik dengesizliği ya da habis dönüşümü ile ilişkilidir (Rao ve ark., 2009).

Mayotik düzenlemede önemli bir rol oynamasına rağmen, *TRIP13*'ün aşırı ifadesi veya amplifikasyonu birden fazla insan kanserinde bulunmuştur (Rhodes ve ark., 2004; Carter ve ark., 2006).

Bizim çalışmamızda, *TRIP13* mRNA düzeyi kontrollere göre hem kolorektal tümör dokuları ve hem de periferik kanda önemli düzeyde artmıştır.

Benzer olarak, Kurita ve ark. (2016) *TRIP13*'ün mRNA düzeyini normal ve tümör dokular arasında analiz etmişler ve *TRIP13*'ün kolorektal kanser hücre proliferasyonu ve invazyonuna dahil olduğunu ve kolorektal kanser tedavisi için potansiyel bir bulgu olabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca Sheng ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada 200 kolorektal olguda *TRIP13* gen ifadesi analiz edilmiş ve pTNM evresi, CEA ve CA19-9 ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu bulunmuştur. Yine yaptıkları çok değişkenli analizlerde *TRIP13*'ün genel olarak kolorektal kanser hastalarının hayatta kalma oranının değerlendirilmesinde pTNM ve

CEA ile birlikte bir gösterge olabileceğini, bu nedenle, *TRIP13*'ün, kolorektal kanseri için gelecekte bir biyobelirteç olarak işlev görebileceğini öne sürmüşlerdir. Sheng ve ark. (2018) *TRIP13*'ün kolorektal kanserdeki ifadenin profilini belirlemek için, Oncomine'den temin edilebilen çoklu kolorektal kanser veri setlerini analiz etmişler ve *TRIP13*'ün gen ifadesinin, normal dokuya kıyasla tümör dokusunda arttığını tespit etmişlerdir. Sonuçları doğrulamak için, 41 çift kolorektal kanser ve TCGA (Kanser Genom Atlası) veri setinden karşılık gelen normal dokularda *TRIP13*'ün mRNA düzeyini incelemişler, *TRIP13*'ün tümör dokusunda yüksek oranda ifade edildiğini rapor etmişlerdir ($p < 0.001$).

Bizim çalışmamızda da özellikle periferik kanda evre I-II ve III'de *TRIP13* mRNA düzeyindeki artış önemlidir. Kolorektal kanser gelişiminde erken evreden itibaren *TRIP13*'ün yüksek mRNA düzeyi gözlemlenebilir. *TRIP13*'ün kolorektal kanserdeki protein seviyesini değerlendirmek için, 45 kolorektal tümör dokusu ve bitişik normal dokularda western blotlama yapılmış ve normal dokulara kıyasla *TRIP13*'ün tümörlerde belirgin şekilde aşırı ifade edildiği rapor edilmiştir. Bu veriler *TRIP13*'ün kolorektal kanserde ifadesinin arttığını gösterir. Ayrıca yüksek *TRIP13* ifadesinin ileri pTNM evresi ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu da rapor edilmiştir (Sheng ve ark., 2018).

Kurita ve ark. (2016), *TRIP13*'ün kolorektal kanser hücrelerinde onkogen olarak hareket edebileceğini, ancak mekanizmanın henüz tam açıklanamadığını ifade etmişlerdir. Sheng ve ark. (2018) *TRIP13*'ün in vitroda kolorektal kanser hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve istilasını ve deri altı implante edilmiş tümör oluşumunu destekleyebileceğini göstermek için birçok yöntem kullanmışlar ve sonuçlara göre kolorektal kanser hastalarının hayatta kalma sürelerinin düşük olduğunu rapor etmişlerdir.

Daha önceki çalışmalar, kinetokorda lokalize proteinlerin kanser ilerlemesindeki önemini göstermektedir. Kurita ve ark. (2016), *TRIP13*'ün kolorektal kanser tümör dokularında ve çeşitli kolorektal kanser hücre hatlarında yüksek oranda ifade edildiğini ortaya koymuştur. *TRIP13*'ün baş ve boyun kanserinde ve prostat

kanserinde (Larkin ve ark., 2012; Benerjee ve ark., 2014) yüksek ifadesi bildirilmiştir, bu da *TRIP13*'ün diğer kinetokol lokalize proteinlere benzer şekilde çeşitli kanserlerde aşırı ifade edilebileceğini gösterir (Kao ve ark., 2014; Huang ve ark., 2014; Maachani ve ark., 2015). Mevcut sonuçlarla birlikte, bu çalışmalar *TRIP13* gen ifadesinin çoklu kanserlerin ilerlemesinde önemli olduğunu göstermektedir. *TRIP13*'ün aşırı ifadesi, kanser hücrelerinde kromozomal dengesizliği artırabilir ve malign özelliklerin artmasına neden olabilir (Kurita ve ark. 2016).

Yine, Total Survival (OS:Overall Survival) analizi, yüksek *TRIP13* ifadesinin, böbrek renal berrak hücreli karsinom, böbrek renal papiller hücre karsinomu, beyin düşük dereceli glioma, karaciğer hepatosellüler karsinom ve benzeri gibi diğer karsinomlarda kötü gidişatı ortaya koyduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, *TRIP13*'ün anormal ifadesi kanser hücrelerinde sık görülen bir olaydır. *TRIP13*'ün kanser gelişiminde potansiyel bir onkojenik rolünü göstermektedir (Lu ve ark., 2019).

Yukarıda belirtilen bulgular göz önüne alındığında, *TRIP13*'ün çeşitli insan kanserlerinde tümör oluşumuna ve tümör ilerlemesine katkıda bulunduğu görülmektedir. *TRIP13*'ün insan meme duktal karsinom ilerlemesindeki rollerini araştırmak için araştırmacılar, *TRIP13*'ün gen ifadesini insan meme duktal karsinomundaki bazı patolojik özelliklerle ilişkilendirmiştir. Yüksek *TRIP13* gen ifadesi olan meme kanseri hastaları, düşük *TRIP13* gen ifadesi olan hastalara göre daha yüksek mortalite ve nüks oranı gösterdiği rapor edilmiştir (Rhodes ve ark., 2004; Martin ve ark., 2008). İnsan Mikoiz Fungoides Tümöründe, *TRIP13* gen ifadesi kontrol biyopsilerine kıyasla artmıştır (van Kester ve ark., 2012). Benzer şekilde, Larkin ve ark. (2012), *TRIP13* gen ifadesinin Gleason skoru ve preoperatif prostat spesifik antijen (PSA) düzeyi ile kombinasyon halinde olduğunu ve olguların %85.7'sinde rekürrenslerini doğru şekilde tahmin edebildiğini göstermiştir.

Burada önemli olan, doğru bir kromozom segregasyonu (dağılımı) için *TRIP13* gen ifadesi ve aktivitesi gerekli olmasıdır. *TRIP13*'ün, kromozom segregasyonunun uygunluğunu çeşitli yollarla izleyebilmesine ve hücre

fizyolojisi üzerindeki etkilerine bakıldığında bir onkogen olduğu şiddetle önerilmektedir (Kurita ve ark., 2016). Bizim sonuçlarımız da bu görüşü destekler niteliktedir. *TRIP13* ün aşırı ifadelenmesinin, primer tümörlerde ve kanser hücre dizilerinde yaygın bir fenotip olabileceği görülmektedir.

5.5. Kolorektal Kanser ile *IF γ* Gen İfadesinin İlişkisi

IF γ , viral ve hücre içi bakteriyel enfeksiyonlara ve tümör kontrolüne karşı doğal ve adaptif bağışıklık için kritik öneme sahip bir proinflamatuvar sitokindir. CD4 Th1 hücreleri ve CD8 hücreleri *IF γ* üretmektedir. *IF γ* ayrıca enfeksiyon üzerine hızlı indüksiyona izin veren *IF γ* mRNA'yı yapısal olarak eksprese eden natural killer hücreler ve natural killer T hücreleri tarafından üretilir. *IF γ* , MHC sınıf I ve II moleküllerinin yüzey ekspresyonunu düzenleyerek antijen sunumunu artırır. *IF γ* , hücre içi bakteri ve virüslere yanıt olarak makrofajların aktivasyonu için de önemlidir. Azalan *IF γ* indüksiyonu veya sinyali, hücre içi bakterilere, bazı virüslere ve tümör başlangıcına karşı artan duyarlılık ile ilişkilidir (Akdis ve ark., 2011).

Bizim çalışmamızda, *IF γ* mRNA düzeyleri hem kolorektal kanser tümör dokularında hem de periferik kan örneklerinde kontrole göre artış göstermiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmamıştır. Evreler bakımından değerlendirildiğinde de kontrole göre mRNA düzeyleri bakımından farklı sonuçlar gözlenmiştir.

İnterferonlar, kanser hücresi davranışı üzerinde proliferasyonu teşvik etme veya büyüme inhibisyonu gibi çift yönlü etkiye de sahip olabilir. Gerçekten de, İnterferonların melanoma ve kolorektal kanserde tümör ilerletici veya tümör baskılayıcıları olarak işlev gördüğüyle ilgili çelişkili sonuçlar ortaya konmuştur. Farklılıklar mikroçevrenin etkisi, bağışıklık infiltratının miktarı ve kalitesi ve kanser hücrelerinin mutasyon durumu gibi farklı deneysel ortamlardan kaynaklanabilir. Bu

nedenle, kanserdeki interferonların biyolojisini daha iyi anlamaya ve koşullara bağlı olarak verileri analiz etmeye ihtiyaç vardır (Di Franco ve ark., 2017).

5.6. Kolorektal Kanser ile *PIK3CA* Gen İfadesinin İlişkisi

***PIK3CA*, EGFR tirozin-kinaz domaininde yer alan fosfatidilinositol-3-kinazları (PI3K) kodlayan bir proto-onkojendir.** AKT'nin (Protein kinaz B) fosforilasyonuna ve AKT-mTOR sinyal yolunun aktivasyonuna yol açar (Fernandes ve ark., 2018). Fosfoinositol-3-kinaz (PI3K) yolağı, insan kanserlerinde bir viral onkoprotein ile ilişkili bir enzimatik aktivite olarak keşfedilmiştir. Bu yolak, insan kanser çalışmalarında çok dikkat çekmiştir, çünkü hücre döngüsü, proliferasyon, büyüme, hayatta kalma, protein sentezi ve glikoz metabolizması için önemlidir (Vivanco ve Sawyers, 2002). PI3K yolağındaki düzensizlik tüm kanserlerin yaklaşık %30'unda görülmektedir. Bu deregülasyon çeşitli genetik ve epigenetik mekanizmalar yoluyla gerçekleşir ve çok çeşitli tümör tiplerine yol açar.

Bizim çalışmamızda, *PIK3CA* mRNA düzeyleri kolorektal tümör dokularında kontrole göre azalmışken, periferik kanda kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. Ancak bu değişimler istatistiksek olarak önemli düzeyde değildir. PI3K'nin katalitik alt birimi olan *PIK3CA*, kolorektal kanser de dahil olmak üzere birçok farklı tümörde mutasyon geçirir (Campbell ve ark., 2004; Samuels ve ark., 2004). Kolorektal kanserlerin %10-20'sinde, ekson 9 ve ekson 20'de iki sıcak noktada bulunan mutasyonların yaklaşık %80'inde *PIK3CA* mutasyonları bildirilmiştir (Samuels. vd, 2004). Bununla birlikte, bu bulgular tüm çalışmalarda doğrulanmamıştır ve daha ayrıntılı analizler, bu etkilerin Ekson 20'deki mutasyonlarla sınırlı olabileceğini ortaya koymuştur. *PIK3CA* mutasyonlarının, kolorektal kanser hastalarında aspirin ile başarılı adjuvan tedavi için uzun zamandır aranan biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür. Bu nedenle, *PIK3CA* mutasyonlarının umut verici bir biyobelirteç gibi görüldüğü; bununla birlikte, *PIK3CA* genindeki somatik mutasyonların kolorektal kanser hastalarının

tedavisindeki etkisini kesin olarak tanımlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunduğunu rapor etmişlerdir (Cathomas, 2014).

Yan-long ve ark. (2018), kolorektal kanser kemoterapisinde *PIK3CA* mutasyonunun potansiyel değeri ve mekanizmasını araştırmışlardır. Birinci basamak kemoterapi yanıtı ve *PIK3CA* mutasyonu korelasyonu takip ve tıbbi kayıtlara 440 kolorektal kanser hastasında değerlendirilmiştir. Kolorektal kanser hastalarında *PIK3CA* gen mutasyon sıklığı %9.55 olarak bulunmuş ve bu, geç TNM evrelemesi ve düşük histolojik derece ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. *PIK3CA* mutasyonu olan kolorektal kanser hastalarının birinci basamak kemoterapiye, *PIK3CA* mutasyonu olmayanlara göre daha kötü yanıt verdiği rapor edilmiştir. *PIK3CA* mutasyon tümör hücreleri, in vitro ve in vivo birinci basamak kemoterapiye zayıf duyarlılık göstermiştir. Bulgular, *PIK3CA* mutasyonunun indüklediği PI3K/Akt aktivasyonunun, hücrelerin kemoterapiye daha fazla direnç gösterdiği kolorektal kanser kök hücrelerinin hayatta kalmasına ve çoğalmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir.

PIK3CA hot spot mutasyonları ekson 9 ve 20'de lokalize olmuş beş bölgede bulunur ve birçok solid tümörlerin karsinogenez, hücrel büyüme, proliferasyon ve hayatta kalmasına katkıda bulunmak için PI3K/AKT sinyal yolunu aktive eder (Xu ve ark., 2017; Wang ve ark., 2017; Karlsson ve ark., 2017).

Yapılan kolorektal kanser çalışmalarında, tedavi için prediktif bir belirteç olabilecek *PIK3CA* kullanımı konusunda çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. Son meta-analizler, *PIK3CA* ekson 20'deki mutasyonların anti-EGFR tedavisine direnç için bir belirteç olabileceğini göstermiştir (Yang ve ark., 2013; Huang ve ark., 2014)

Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, *PIK3CA* mRNA ekspresyon analizlerinden ziyade, mutasyon analizleri ön plana çıkmaktadır. Bununla birlikte, hala *PIK3CA* mutasyonları ile kolorektal kanser hastalarının prognozu arasındaki ilişki tam açıklanamamıştır.

5.7. Kolorektal Kanser ile *EIF2S3* Gen İfadesinin İlişkisi

EIF2S3 geni, metiyonil-tRNA (i)'nin 40S ribozomal alt birimine dahil edilmesinde rol oynayan bir heterotrimerik GTP bağlayıcı protein olan ökaryotik çeviri başlatma faktörü-2'nin (eIF2), çekirdek alt birimini kodlar. EIF2 kompleksi protein sentezi için gereklidir (Moortgat ve ark., 2016).

Chen ve ark. (2010), yaptıkları PM-33 çoklu moleküler markör modeli analizlerine göre kolorektal kanser teşhisi için *EIF2S3* geninin de dahil olduğu bazı genlerin ifadelerinde azalma rapor etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise, *EIF2S3* mRNA düzeyleri hem kolorektal tümör dokularında hem de periferik kan örneklerinde kontrollere göre artmıştır. Bu artış sadece olguların periferik kanlarında ifade edilen *EIF2S3* mRNA düzeyindeki değişim için önemlidir. Evre I ve III periferik kan örneklerinde de özellikle bu artış önemlidir. Literatürde *EIF2S3* mRNA analizi için fazla çalışma bulunmamaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmalarla, özellikle kolorektal kanser tanılı olguların periferik kan örneklerindeki *EIF2S3* mRNA değişimleriyle ilgili yeni çalışmalar rapor edildiğinde bu gen için değerlendirmeler yapılabilecektir.

5.8. Kolorektal Kanser ile *EIF4A1* Gen İfadesinin İlişkisi

Boussemart ve ark. (2014), **EIF4E cap-bağlayıcı protein, EIF4G skaffold-proteini ve EIF4A RNA helisazını içeren EIF4F kompleksinin, kalıcı oluşumunun, BRAF (V600) mutant melanom, kolon ve tiroid kanseri hücre hatlarında, anti-BRAF, anti-MEK ve anti-BRAF plus anti-MEK ilaç kombinasyonlarına direnç ile ilişkili olduğunu göstermiştir.**

EIF4A1 mRNA gen ekspresyon değişimleriyle ilgili literatürde fazla çalışma bulunmamaktadır.

Bizim çalışmamızda, kolorektal tümör dokularında *EIF4A1* mRNA seviyesi kontrollere göre azalmışken, periferik kanda kontrollere göre artmıştır.

Bu artış hem genel periferik kandaki ifadede, hem de özellikle periferik kan Evre I ve III'de önemlidir. Malignant fenotip, büyük ölçüde düzensiz gen ifadesinin sonucudur. Transforme hücreler sadece protein sentezindeki global bir artışa değil, pro-onkogenik mRNA'ların translasyonel olarak arttığı bir duruma da bağlıdır. Bu tür mRNA'ların, etkili bir transkripsiyon için yüksek seviyelerde ökaryotik başlatma faktörü 4A (*EIF4A1*) helikaz aktivitesi gerektiren daha uzun ve daha yapılandırılmış 5p-UTR'lere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, kanser terapisi için *EIF4A* dikkat çekmeye başlamıştır. Erken tanıda bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için, spesifik mRNA'ları *EIF4A1* aktivitesine bağımlı hale getiren mekanizmalar hakkında ayrıntılı çalışmalar geliştirilmelidir (Vaklavas ve ark., 2017).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, kolorektal kanserle ilişkisi olabileceği düşünülen *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A*, *IFN γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerinin;

- Kolorektal kanser tümörlerinde ve normal kolon dokusundaki mRNA düzeyleri,
- Farklı evre kolon kanseri tümörlerinde ve normal kolon dokusundaki mRNA düzeyleri,
- Kolorektal kanser tanılı olgular ile kontrol grubu bireylere ait periferik kan örneklerindeki mRNA düzeyleri,
- Farklı evre kolorektal kanser hastaları ile kontrol grubu bireylerin periferik kan örneklerindeki mRNA düzeyleri belirlenmiş,
- Periferik kan ve dokulardaki mRNA düzeyleri arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir.

Yapılan bu değerlendirmeler sonucunda;

- Çalışmamızda, incelenen mRNA değişimleri değerlendirilmesi sonucuna göre; *CPEB4*, *APC*, *EIF4A1*, *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerinin **mRNA düzeyleri**, olgularda, kontrol grubuna göre azalırken, periferik kan örneklerinde arttığı görülmüştür.
- *TRIP13*, *EIF2S3* ve *IF γ* genlerinin mRNA düzeyleri ise, kontrol grubu bireylere göre, hem tümör dokularında hem de periferik kan örneklerinde artmıştır.
- Çalışmamızda **olgulara ait tüm kolorektal tümör dokularında *CPEB4* geninin mRNA düzeyi önemli derecede azalırken, aynı olguların periferik kan örneklerinde önemli derecede arttığı** görülmüştür.
- Evreler bakımından karşılaştırmalı olarak değerlendirme yapıldığında da kolorektal kanser Evre I ve Evre II'deki olguların periferik kan örneklerinde *CPEB4* geninin mRNA düzeyindeki artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

- Bu durum kolorektal kanserin ilk evrelerinden itibaren periferik kanda *CPEB4* mRNA düzeyindeki **artışın kolorektal kanser için bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir.**
- Çalışmamızda tüm kolorektal tümör dokularında *APC* geninin mRNA düzeyinin önemli derecede azaldığı, bu olguların periferik kan örneklerinde ise önemli derecede arttığı gözlenmiştir.
- Evreler bakımından değerlendirme yapıldığında da kolorektal kanser Evre III'deki olguların periferik kan örneklerinde *APC* geninin mRNA düzeyindeki artış önemliyken, evre IV tümör dokularında azalma önemliydi.
- *APC* gen ekspresyonu değişikliklerinin sayısı ve tipi ile metastatik dönüşüm arasında bir ilişki bulunmamıştır. Bu veriler, *APC* mRNA düzeylerinin belirlenmesinin kolorektal kanser öngörüsünde yardımcı olamayacağını ve kolon kanserleri evrelerini sınıflamak için kullanılamayacağını göstermektedir.
- Çalışmamızda, *TRIP13* mRNA düzeyleri hem **kolorektal tümör dokuları** hem de **periferik kan örneklerinde** kontrollere göre **önemli düzeyde artmıştır.** Özellikle kolorektal kanser evre I-II ve III'deki olguların periferik kan örneklerindeki bu artış önemli görülmektedir. Kolorektal kanser gelişiminde erken evreden itibaren *TRIP13*'ün mRNA düzeyindeki artış gözlenebilir. ***TRIP13* aşırı ifadenmesinin, kolorektal kanserde yaygın bir fenotip olabileceği ve erken evre kolorektal kanser teşhisinde potansiyel bir bulgu/biyobelirteç olabileceğini kuvvetle düşündürmektedir.**
- Çalışmamızda, *EIF2S3* mRNA düzeyleri hem kolorektal tümör dokularında hem de periferik kan örneklerinde arttığı görülmüştür. Bu artış, periferik kan örneklerinde istatistiksel düzeyde önemli bulunmuştur. **Yapılan literatür taramasında *EIF2S3* mRNA analizi için çok sayıda çalışmaya rastlanmamıştır.**
- Çalışmamızda elde edilen verilere göre, periferik kan örneklerindeki ***EIF2S3* mRNA düzeyindeki artış kolorektal kanser olgularında öne çıkmakta, verilerimiz bu sınırlı çalışmalara katkıda bulunmaktadır.**

Gelecekte yapılacak çalışmalarla, özellikle kolorektal hastaların periferik kan örneklerindeki *EIF2S3* mRNA değişimlerine ilişkin sonuçlar rapor edildiğinde bu gen için kesin değerlendirmeler yapılacaktır.

- Çalışmamızda, *PIK3CA* mRNA düzeyleri kolorektal tümör dokularında kontrole göre azalmışken, periferik kan örneklerinde kontrole göre artmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmamıştır. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, *PIK3CA*'da; mRNA analizlerinden ziyade mutasyon analizleri ön plana çıkmaktadır. Bununla birlikte, hala *PIK3CA* mutasyonları ve kolorektal kanser hastalarının prognozu arasındaki ilişki tartışmalıdır. Kolorektal kanserli hastalarının erken evre teşhisinde *PIK3CA* etkisini kesin olarak tanımlamak için mutasyon analizleriyle ilişkili mRNA analizlerine ihtiyaç bulunmaktadır.
- Çalışmamızda, olguların kolorektal tümör dokularında *EIF4A1* mRNA düzeyleri kontrol grubuna göre azalmışken, periferik kan örneklerinde kontrol grubuna göre artmıştır. Bu artış hem genel periferik kan örneklerinde hem de özellikle periferik kan Evre I ve III'de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Literatürde *EIF4A1* mRNA analizi için fazla çalışma bulunmamaktadır.
- **Sonuçlarımıza göre, periferik kan örneklerinde *EIF4A1* mRNA düzeyindeki artış kolorektal kanser olgularında öne çıkmakta, verilerimiz bu sınırlı çalışmalara katkıda bulunmaktadır.** Gelecekte yapılacak çalışmalarla, özellikle kolorektal kanserli hastaların periferik kan örneklerindeki *EIF4A1* mRNA değişimlerine ilişkin sonuçlar rapor edildiğinde bu gen için kesin değerlendirmeler yapılacaktır.
- Çalışmamızda *CTNNB1* mRNA düzeyi tümör dokularında kontrol grubuna göre azalırken, periferik kan örneklerinde artmıştır. Özellikle Evre I kolorektal kanser dokuları ile periferik kan örneklerinde farklı mRNA düzeyleri bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu farklı sonuçlar, kolorektal kanser teşhisinde *CTNNB1* mRNA düzeyindeki değişimlerin tanıda yararlı olamayacağı görüşünü desteklemektedir.

- Çalışmamızda *IF γ* mRNA düzeyleri; hem kolorektal kanser tümör dokularında hem de periferik kan örneklerinde kontrole göre artmıştır. Ancak bu artış istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmamıştır. Veriler evreler bakımından değerlendirildiğinde mRNA düzeylerinde kontrol grubu bireylerin verilerine göre farklı değişimler gözlenmiştir. *IF γ* 'nın kolorektal kanser sürecindeki etkisini netleştirmek için çalışmalar çok yeni olup, gelecekte yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Özet olarak;

Bu çalışmada, kolorektal kanser tanılı olgularda çalışılan genlerin ifadesindeki değişimler, hem tümör dokularında hem de periferik kan örneklerinde belirlenmiş bulunmaktadır.

- 1) Kolorektal kanserli olguların periferik kan örneklerinde *TRIP13* ve *CPEB4* mRNA düzeylerindeki artışın, kolorektal kanser erken evre teşhisinde potansiyel bir bulgu/biyobelirteç olabileceğini düşünmekteyiz.
- 2) Kolorektal kanserli olgularda *EIF2S3* ve *EIF4A1* mRNA değişimleriyle ilgili sonuçlara bakıldığında, periferik kan örneklerinde mRNA düzeylerindeki artış dikkat çekmektedir. Bu veriler ileride yapılacak çalışmalara önemli düzeyde katkıda bulunacaktır.
- 3) Periferik kan örnekleri ile tümör doku örneklerinde mRNA düzeylerindeki majör farklılıklar, muhtemelen bu gen için dokuya özgü spesifik düzenleyici mekanizmaların olduğunu yansıtmaktadır.
- 4) Kolorektal kanserin erken evresinde gözlenen mRNA düzeyindeki artışlar, ilgili genlerin karsinogenezde rol oynadığını düşündürmektedir.
- 5) Verilerimiz, kolorektal kanser tanılı olgularda tanı ve prognoz açısından mevcut prosedürlere katkı sağlayabilecek genetik bilgiyi içermektedir. Bu veriler bu alanda yeni yapılacak çalışmalara önemli düzeyde katkıda bulunacaktır.

Kolorektal kanserin moleküler ve biyolojik karakteristiklerinin yoğun biçimde araştırılması sayesinde, son yıllarda kanser patogenezinin anlaşılmasında aydınlatıcı bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışmalara rağmen, kolorektal tümörogenezi için genetik ve genomik değişiklikler ve bunların önemleri hakkında kesinleşmiş bir görüş oluşmamıştır. Bu değişikliklerle ilgili yeni yapılacak çalışmalar, kolorektal kanser patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Genetik ve çevresel faktörlerin etkisi altında uzun bir süreç sonucu gelişen kolorektal kanserin daha erken evrede yakalanmasıyla, hastanın tanı, prognoz ve tedavileri açısından daha da olumlu sonuçlar doğuracağı kanısına varılmıştır. Erken evre tanıda moleküler biyobelirteçlerin önemi ortaya çıkmış bulunmaktadır.

ÖZET

Farklı Evre Kolorektal Tümörlerde Bazı Genlerin İfadeleme Düzeylerinin Araştırılması

Kolorektal kanser dünyada en çok gözlenen kanserlerdendir. Dünya çapında tahmini 1.8 milyon yeni vaka ile önemli bir sağlık sorunudur. Kolorektal kanser, kolon, rektum ve/veya devamında kanserli büyümelerle tanımlanır. Kolorektal kanserin kaynağı, kolorektal epitelyumda adenom adı verilen, yavaş yavaş büyüyerek malign bir fenotipe dönüşene kadar hücre içi organizasyonunda gittikçe daha düzensiz hale gelen küçük, iyi huylu bir tümör veya poliptir. Kolon kanseri gelişimi sırasında çeşitli gen ekspresyonu farklılıklarının tespit edilebileceği iyi bilinmektedir. Tüm genom ekspresyon çalışmaları temelinde, klinik olarak kullanışlı biyobelirteçlerin tanımlanması ve daha sonra geliştirilerek tümör sınıflandırılmasında rutin teşhisin bir parçası olarak kullanılması amaçlanmaktadır.

Çalışmamızda, *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A*, *IF γ* , *PIK3CA* ve *CTNNB1* genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri, kolorektal kanser tanısı alan 45 olgunun tümör dokuları ve periferik kan örnekleri ile 5 sağlıklı bireye ait kolon dokuları ile periferik kan örneklerinde belirlendi. Analizler için Eş-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, REST 2009 software programıyla değerlendirilmiştir. Çalışmamızda tüm kolorektal tümör dokularında *CPEB4* geninin mRNA düzeyi kontrol grubu verilerine göre önemli derecede azalmışken (down regülasyon) ($P<0,05$), kolorektal kanserli olguların periferik kanlarında önemli derecede artmıştı (up regülasyon) ($P<0,05$). Evreler bakımından karşılaştırma yapıldığında da periferik kanda Evre I ve Evre II'de bu artış önemliyken ($P<0,05$), evre I tümör dokularında azalma önemliydi ($P<0,001$). Tüm kolorektal tümör dokularında *APC* geninin mRNA düzeyi kontrol grubu verilerine göre önemli derecede azalmışken ($P<0,05$), kolorektal kanserli olguların periferik kanlarında önemli derecede artmıştı ($P<0,05$). Evreler bakımından karşılaştırma yapıldığında da Evre III periferik kanda bu artış önemliyken ($P<0,05$),

evre IV tümör dokularında azalma önemliydi ($P<0,05$). *TRIP13* mRNA düzeyi kontrol grubu verilerine göre hem kolorektal tümör dokuları ve hem de periferik kanda önemli seviyede artmıştır ($P<0,05$). Özellikle periferik kanda evre I-II ve III'de bu artış önemlidir ($P<0,05$). *EIF2S3* mRNA düzeyi hem kolorektal tümör dokularında hem de periferik kanda kontrol grubu verilerine göre artmıştır. Bu artış sadece periferik kanda ifade (ekspres) edilen *EIF2S3* düzeyi için önemlidir ($P<0,05$). Evre I ve III periferik kanda da özellikle bu artış önemlidir ($P<0,05$). *PIK3CA* mRNA düzeyi kolorektal kanser tümör dokularında kontrol grubu verilerine göre azalmışken, periferik kanda kontrole göre artmıştır. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak önemli değildir ($P>0,05$). Kolorektal kanser tümör dokularında *EIF4A1* mRNA düzeyi kontrol grubu verilerine göre azalmışken ($P>0,05$), periferik kanda kontrollere göre artmıştır ($P<0,05$). Bu artış periferik kan Evre I ve III'de önemlidir ($P<0,05$). *CTNNB1* mRNA düzeyi tümör dokularında kontrol grubu verilerine göre azalmışken ($P>0,05$), periferik kanda artmıştır ($P>0,05$). Özellikle Evre I kolorektal kanser dokularında azalmışken ($P<0,05$) periferik kan Evre I'de artmıştır ($P<0,05$). *IF γ* mRNA düzeyi hem kolorektal kanser tümör dokularında hem de periferik kanda kontrol grubu verilerine göre artmıştır. Ancak bu artış önemli değildir ($P>0,05$). Evreler bakımından değerlendirildiğinde de mRNA düzeylerinde farklı sonuçlar gözlenmiştir.

Genel olarak sonuçlarımız değerlendirildiğinde ve literatürle karşılaştırıldığında, kolorektal kanserli olguların periferik kanında *TRIP13* ve *CPEB4* mRNA düzeylerindeki artışın, erken evre teşhisinde potansiyel bir bulgu olabileceğini düşünmekteyiz. Bu değerlendirmeye ek olarak, kolorektal kanserli olgularda *EIF2S3* ve *EIF4A1* mRNA değişimleriyle ilgili fazla çalışma olmamasına rağmen, sonuçlarımız değerlendirildiğinde periferik kanda *EIF4A1* mRNA artışı dikkat çekmektedir. Bu veriler yeni geniş kapsamlı çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Biyobelirteç, farklı evre, gen ekspresyonu, kolorektal tümör

ABSTRACT

Investigation of the Expression Levels of Some Genes in Different Stage Colorectal Tumors

Colorectal cancer is one of the most observed cancers. It is a major health problem with an estimated 1.8 million new cases worldwide. Colorectal cancer is defined by cancerous growths colon, rectum and/or subsequent. The source of colorectal cancer is a small benign tumor or polyp called adenoma in the colorectal epithelium, which gradually grows into an malignant phenotype, gradually becoming more irregular in its intracellular organization. It is well known that various gene expression differences can be detected during colon cancer development. On the basis of all genome expression studies, it is intended to identify clinically useful biomarkers and then be developed and used as part of routine diagnosis in tumor classification.

In our study, the mRNA levels of the *CPEB4*, *APC*, *TRIP13*, *EIF2S3*, *EIF4A*, *IF γ* , *PIK3CA* and *CTNNB1* genes were determined in tumor tissues and peripheral blood samples of 45 patients with colorectal cancer and colon tissues belonging to 5 healthy individuals and peripheral blood samples. Real Time Polymerase Chain Reaction method was used for the analysis. The results were evaluated with the REST 2009 software program. In our study, the mRNA level of the *CPEB4* gene was significantly down regulated in all colorectal tumor tissues relative to the controls ($P<0,05$), while it was significantly up regulated in the peripheral blood of patients with colorectal cancer ($P<0,05$). When compared in terms of stages, up regulation was important in stage I and stage II in peripheral blood ($P<0,05$) while down regulation was important in stage I tumor tissues ($P<0,001$). The mRNA level of the *APC* gene was significantly down regulated in all colorectal tumor tissues relative to the controls ($P<0,05$), while it was significantly up regulated in the peripheral blood of patients with colorectal cancer ($P<0,05$). When comparing in terms of stages, up regulation was important in Stage III peripheral blood ($P<0,05$), while down

regulation was important in stage IV tumor tissues ($P < 0.05$). *TRIP13* mRNA level was significantly up regulated in both colorectal tumor tissues and peripheral blood relative to the controls ($P < 0.05$). Especially this up regulation is important in stages I-II and III in peripheral blood ($P < 0.05$). *EIF2S3* mRNA level was up regulated in both colorectal tumor tissues and peripheral blood relative to the controls. This up regulation is important only for *EIF2S3* mRNA expressed in peripheral blood ($P < 0.05$). This up regulation is also important in stage I and III peripheral blood ($P < 0.05$). While, *PIK3CA* mRNA level was down regulated in colorectal tumor tissues relative to the controls, it was up regulated in peripheral blood. However, these changes are not important ($P > 0.05$). While *EIF4A1* mRNA level was down regulated relative to controls in colorectal tumor tissues ($P > 0.05$), it was up regulated in peripheral blood ($P < 0.05$). This up regulation was important in peripheral blood stages I and III ($P < 0.05$). *CTNNB1* mRNA level was down regulated in tumor tissues relative to the controls ($P > 0.05$), while it was up regulated in peripheral blood ($P > 0.05$). Especially it was down regulated in Stage I colorectal cancer tissues ($P < 0.05$), while it was upregulated in Stage I peripheral blood ($P < 0.05$). *IF γ* mRNA level was up regulated in both colorectal cancer tumor tissues and peripheral blood relative to the control. However, this up regulation was not important. When evaluated in terms of stages, different results were observed in mRNA levels.

In general, when our results are evaluated and compared with the literature, we think that *TRIP13* and *CPEB4* mRNA up regulation in the peripheral blood of patients with colorectal cancer may be a potential target for early stage diagnosis. In addition to this evaluation, although there is not much study on *EIF2S3* and *EIF4A1* mRNA changes in cases with colorectal cancer, upregulation in peripheral blood draws attention in our study. These data will shed light on the these data will shed light on the new comprehensive studies.

Keywords: Biomarker, colorectal tumor, different stage, gene expression.

KAYNAKLAR

- ACETO G. M., FANTINI F., IURE D.S., NİCOLA D.M., PALKA G., &VALANZANO R. (2015). Correlation between mutations and mRNA expression of APC and MUTYH genes: new insight into here ditary colorectal polyposis predisposition. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **Volume 34**, Article number: 131.
- ADACHI Y., YAMAMOTO H., ITOH F., ARİMURA Y., NİSHİ M., ENDO T., IMAI K. (2001). Clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancers. *Int J Cancer*; **95**:290-94.
- AGRAWAL D., CHEN T., IRBY R., QUACKENBUSH J., CHAMBERS A.F., SZABO M., CANTOR A., COPPOLA D., YEATMAN T.J. (2002). Osteopontin identified as lead marker of coloncancer progression, using pooled sample expression profiling. *Journal of the NationalCancerInstitute*. **94(7)**: p. 513-521.
- AHMED E., KHEIRELSEİD H.(2011). Clinical Applications of Molecular Profiling in Colorectal Cancer, Dicipline of Surgery College of Medicine, Nursing&Health Sciences National University of Ireland, Galway,
- AKDIS M., BURGLER S., CRAMERI R., EİWEGGER T., FUJITA H., & GOMEZ E.(2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*;**127**:701-21.
- AKIYAMA T. (2000). Cytokine Growth Factor Rev. Wnt/beta-catenin signaling. *Dec*; **11(4)**:273-82.
- ALEXANDRA K. NAGYB.Z., GALAMB O., CSABAİİ., BODORA., WİCHMANNB.,VALCZG., BARTÁK B.K., TULASSAY Z.,IGAZ P., AND MOLNÁR B. (2015). Analysis of genes with altered expression along colorectal tumor formation and and their regulatory processes Semmelweis University Clinical Medicine Doctoral School.
- BAEG G.H, MATSUMINE A., KURODA T., BHATTACHARJEE R.N., MIYASHIRO I., TOYOSHIMA K., & AKIYAMA T. (1995). The tumour suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase. *EMBOJ* **14(22)**:5618–5625.
- BANERJEE R., RUSSO N., LIU M., BASRUR V., BELLILE E., PALANISAMY N.,& SCANLON CS. (2014). TRIP13 promotes error-prone nonhomologous end joining and induces chemoresistance in head and neck cancer. *Nat. Commun.* **5**, 4527
- BAIER, P.K.,EGGSTEN S., WOLFF-VORBECK G., BAUMGARTNER U., HOPT U.T. (2005). Chemokines in human colorectal carcinoma. *Anticancer Research*,. **25(5)**: p. 3581-3584.
- BIO-RAD (2006). A mplications Guide, Bulletin 5279.

- BIRNBAUM D. J., LAIBE S., FERRARI A., LAGARDE A., FABRE A.J., MONGES G., BIRNBAUM D., OLSCHWANG S. (2012). Expression Profiles in Stage II Colon Cancer According to APC Gene Status. *Transl Oncol.* 2012 Apr; **5**(2): 72–76. Published online Apr 1. doi:10.1593/tlo.11325
- BRAY F., FERLAY J., SOERJOMATARAM I., SIEGEL R.L., TORRE L.A., JEMAL A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality world wide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.*
- BRENNER H., BOUVIER A.M., FOSCHI R., HACKL M., LARSEN I.K., LEMMENS V., MANGONE L., FRANCISCI S., GROUP E.W. (2012). Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: the EURO CARE study, *International journal of cancer, Int. J. Cancer Suppl.* **131** (7) 1649–1658.
- CARLSON M. (2009). Previstage TM GCC Colorectal Cancer Staging Test A new molecular test to identify lymph node metastases and provide more accurate information about the stage of patients with colorectal cancer. *Mol Diag Ther*; **13**:11-14.
- CASTELLSAGUÉ E., GONZÁLEZ S., GUINÓ E., STEVENS K.N., BORRÀS E., RAYMOND V.M., LÁZARO C., BLANCO I., GRUBER S.B., CAPELLÀ G. (2010). Allele-specific expression of APC in adenomatous polyposis families. *Gastroenterology.* **139**:439–47.
- CASTELLVI-BEL S., CASTELLS A. (2009). Allele-specific expression as a new genetic susceptibility mechanism for colorectal cancer. *Gastroenterology.* **136**:2397–9.
- CAO G., CHEN D., LIU G., PAN Y., LIU Q. (2018). *CPEB4* promotes growth and metastasis of gastric cancer cells via ZEB1-mediated epithelial–mesenchymal transition *Onco Target sand Therapy*; **11** 6153–6165
- CHAN, S.K., GRIFFITH O.L, TAI I.T, JONES S.J. (2008). Meta-analysis of colorectal cancer gene expression profiling studies identifies consistently reported candidate biomarkers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **17**(3): p. 543-552.
- CHANG Y.T., HUANG C.S., YAO C.T., SU S.L., TERNG H.J., CHOU H.L., CHOU Y.C., CHEN K.H., SHIH Y.W., LU C.Y., LAI C.H., JIAN C.E., LIN C.H., CHEN C.T., WU Y.S., LIN K.S., WETTER T., CHANG C.W. & CHU C.M. (2014). Gene expression profile of peripheral blood in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **20**: 14463-14471.
- CHEN Y., TSAI Y.H., TSENG S.H. (2016). Regulation of the expression of cytoplasmic polyadenylation element binding proteins for the treatment of cancer. *Anticancer Res.* **36**(11):5673–5680.
- CHEN W., HU Z., LI X.Z., LI J.L., XU X.K., LI H.G., LIU Y., LIU B.H., JIA W.H. & LI F.C. (2016). *CPEB4* interacts with Vimentin and involves in progressive features and poor prognosis of patients with astrocytic tumors. *Tumour Biol* **37**: 5075-5087.
- CHIANG F., HWANG Y.T., TERNG H.J., LEES C., CHAO T.Y, CHANG H., HO C.L., WU Y.Y., PERNG W.C. (2016). Panels of tumor-derived RNA markers in peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer: their dependence on age, gender and

clinical stages *Oncotarget*. Aug 2; **7(31)**: 50582–50595. Published online 2016 Jul 13. doi: 10.18632/oncotarget.10558

CHUNG D.C. (2000). The genetic basis of colorectal cancer: Insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology*. **119(3)**: p. 854-865.

CIRIELLO G., MILLER M.L., AKSOY B.A., SENBABA OGLU Y., SCHULTZ N., SANDER C. (2013). Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat. Genet.* **45**, 1127–1133.

COMBER H., & WALSH P.M. (2008). Patterns of care and survival of cancer patients in Ireland 1994 to 2004. Summary report. National Cancer Registry. Cork, Ireland.

CROSS A.J., FERRUCCI L.M., RISCH A., GRAUBARD B.I., WARD M.H., PARK Y., HOLLENBECK A.R., SCHATZKIN A., SÍNHA R. (2010). A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanism underlying this association. *Cancer Res.* **70(6)** 2406–2414.

CURIA M.C., IURE D. S., LELLIS D. L., VESCHI S., MAMMARELLA S., WHITE M.J., BARTLETT J., IORIO D.A., AMATETTI C., LOMBARDO M., GREGORIO D. P., BATTISTA P., MARIANI-COSTANTINI R., WILLIAMS S.M., CAMA A. (2012). Increased variance in germ line allele-specific expression of APC associates with colorectal cancer. *Gastroenterology*. **142**:71–7.

CURIA M.C., ESPOSITO D.L., ACETO G., PALMIROTTA R., CROGNALE S., VALANZANO R., FICARI F., TONELLI F., BATTISTA P., MARIANI-COSTANTINI R., CAMA A. (1998). Transcript dosage effect in familial adenomatous polyposis: model offered by two kindreds with exon 9 APC gene mutations. *Hum Mutat.* **11**:197–201.

DUFFY M.J., VAN DALEN A., HAGLUND C., HANSSON .L, HOLINSKI-FEDER E., & KLAPDOR R. (2007). Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer*; **43**:1348-60.

EDGE S.B., Compton C.C. (2010). *AJCC. Cancer staging manual*, 7th edition, New York, Springer, **69**

ERRENI, M., BIANCHI P., LAGHI L., MIROLO M., FABBRI M., LOCATI M., MANTOVANI A., ALLAVENA P. (2009). Expression of Chemokines and Chemokine Receptors in Human Colon Cancer. *Chemokines, Pt A*, 460: p. 105-121.

FANG Y.J., LU Z.H., WANG G.Q., PAN Z.Z., ZHOU Z.W., YUN J.P., ZHANG M.F., WAN D.S. (2009). Elevated expressions of MMP7, TROP2, and survivin are associated with survival, disease recurrence, and liver metastasis of colon cancer. *Int J Colorectal Dis*; **24**:875-84.

FAVORITI, P., CARBONE, G., GRECO, M., PIROZZI, F., PIROZZI R.E.M., CORCIONE, F. (2016). Worldwide burden of colorectal cancer: a review *Updates in Surgery* **Volume 68**, pages 7–11.

FEARON E.R., & VOGELSTEIN B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61(5)**: p. 759-767.

- FEARNHEAD N.S., BRITTON M.P., BODMER W.F. (2001). The ABC of APC Human Molecular Genetics, Volume 10, Issue 7, 1 April, Pages 721–733, <https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.721>
- FEHRMANN R.S.N., JANSEN R.C., VELDINK J.H., WESTRA H.J., ARENDS D., BONDER M.J., FU J. (2011). Trans-eQTLs reveal that independent genetic variants associated with a complex phenotype converge on intermediate genes, with a major role for the HLA. *PLoS Genet.* 7, e1002197.
- FRIEDBERG, E.C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, **421(6921)**: p. 436-440.
- FOULKES, W.D.(1995). A tale of four syndromes. Familial adenomatous polyposis, Gardnersyndrome, attenuated APC andTurcot syndrome. *Qim-MonthlyJournal of the Association of Physicians.* **88(12)** : p. 853-863.
- FRIEDERICH S. J., ROSENBERG R., MAGES J., JANSSEN K.P., MAECKL C., NEKARDA H., HOLZMANN B., SIEWERT J.R. (2005). Gene expression profiles of different clinical stagesOf colorectal carcinoma: toward a moleculargeneticunderstanding of tumor progression. *Int J Colorectal Dis.* **20(5)** : p. 391-402.
- FOSS D.L., BAARSCH M.J., & MURTAUGH M.P. (1998). Regulation of hypoxanthine phosphoribosyl transferase, glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase and B-actin Mrna expression in porcine immune cell sand tissues. *Anim. Biotechnol.*, **9**, 67-78.
- FEARNHEAD N.S., WILDING J.L., BODMER W.F.(2002). Genetics of colorectalcancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *BrMedBull.* **64**:27–43.
- GÜLER, H. (2001). Kolorektal kanserlerde DCC onkogenlerin rolü. Yüksek Lisans Tezi. İnönü Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- HAINCE J.F., HOUDE M., BEAUDRY G., L'ESPÉRANCE S., GARON G., DESAULNIERS M., HAFFER L.J., HEALD J.I., LYLE S., GROSSMAN S.R., TÊTU B., SARGENT D.J., FRADET Y. (2010). Comparison of histopathology and RT-qPCR amplification of guanylyl cyclase C for detection of colon cancer metastases in lymph nodes. *J Clin Pathol*; **63**:530-37.
- HAMILTON S., AALTONEN L.A. (2000). Pathology and genetics of tumours of digestive system. World Health Organisation: New York.
- HARRISON S., BENZIGER H. (2011). Themolecular biology of colorectal carcinoma and it simplifications: a review. *Surgeon*; **9**:200-10.
- HE X., LIN X., CAI M., FAN D., CHEN X., WANG L., WU X., LAN P., WANG J. (2017). High expression of cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4 correlates with poor prognosis of patients with colorectal cancer. *VirchowsArch.* Jan;470(1):37-45. doi: 10.1007/s00428-016-2037-3. Epub 2016 Oct 22.
- HEINEN C.D., GOSS K.H., CORNELIUS J.R., BABCOCK G.F., KNUDSEN E.S., KOWALIK T., GRODEN J. (2002). The APC tumor suppressor controls entry into S-phases through its ability to regulate the cyclin D/RB pathway. *Gastroenterology*; **123(3)**:751–763.

- HENKHAUS R.S., GERNER E.W., IGNATENKO N.A.(2008). Kallikrein 6 is a mediator of K-RAS-dependent migration of colon carcinoma cells. *Biol Chem*; **389**:757-64.
- HU W.M.M., YANG Y.M.B., XI S.M.M., SAI K., SU D., ZHANG X.M.M, LIN S., & ZENG J. (2015). Expression of CPEB4 in Human Glioma and Its Correlations With Prognosis Medicine (Baltimore). 2015 Jul; **94**(27): e979. Published online Jul 13. doi: 10.1097/MD.0000000000000979
- HUANG L., LIU Z., DENG D., TAN A., LIAO M., MO Z. & YANG X.(2014). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodybased therapy for metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of the effect of PIK3CA mutations in KRAS wild-type patients. *Arch Med Sci* **10**: 1-9.
- HUANG W., LI H. & LUO R. (2015). The microRNA-1246 promotes metastas is in non-small cell lung cancer by targeting cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4. *DiagnPathol* **10**:127.
- IVANOVICH J.L., READ T.E., CISKE D.J., KODNER I.J., WHELAN A.J. (1999). A practical approach to familial and hereditary colorectal cancer. *Am J Med*, **107**(1): p. 68-77.
- KANTER-SMOLER G., FRITZELL K., ROHLIN A., ENGWALL Y., HALLBERG B., BERGMAN A., MEULLER J., GRÖNBERG H., KARLSSON P., BJÖRK J., NORDLING M.(2008). Clinical characteriz ation and the mutation spectrum in Swedish adenomatous polyposis families. *BMC Med*.**6**:10.
- KARLSSON T., KRAKSTAD C., TANGEN I.L., HOIVIK E.A, POLLOCK P.M., SALVESEN H.B., LEWIS A.E. (2017). Endometrial cancer cells exhibit high expression of p110betaand its selective inhibition induces variable responses on PI3K signaling, cell survival and proliferation. *Oncotarget* **8**, 3881–3894.
- KI D.H.,JEUNG H.C., PARK C.H., KANG S.H., LEE G.Y., LEE W.S., KIM N.K., CHUNG H.C., RHA S.Y.(2007). Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures incolorectal cancer. *Int J Cancer*,. **121**(9): p. 2005-2012.
- KIM K.,PARK U., WANG J., LEE J., PARK S., KIM S., CHOI D., KIM C., PARK J. (2008). Gene profiling of colonic serrated adenomas by using Oligonucleotide microarray. *International Journal of ColorectalDisease*. **23**(6): p. 569-580.
- KIM J.T., SONG E.Y., CHUNG K.S., KANG M.A., KIM J.W., KIM S.J., YEOM Y.I., KIM J.H., KIM K.H., LEE H.G. (2011). Up-regulation and clinical significance of serine protease kallikrein 6 in colon cancer. *Cancer*;**117**:2608-19.
- KINZLER K.W., VOGELSTEIN B.(1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**(2): p. 159-170.
- KITA H.,HIKICHI Y., HIKAMI K., TSUNEYAMA K., CUI Z.G., OSAWA H., OHNISHI H., MUTOH H., HOSHINO H., BOWLUS C.L., YAMAMOTO H., SUGANO K. (2006). Differential gene expression between flat adenoma and normal mucosa in the colon in a microarray analysis. *Journal of Gastroenterology*. **41**(11): p. 1053-1063.
- KITAHARA O., FURUKAWA Y., TANAKA T., KIHARA C., ONO K., YANAGAWA R., NITA ME., TAKAGI T., NAKAMURA Y., TSUNODA T.(2001). Alterations of

gene expression during colorectal Carcino genesis revealed by cDNA microarray safterlaser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res.* **61(9)**: p. 3544-3549.

KOBAYASHI M.,T HONMA., Y MATSUDA., Y SUZUKI., R NARISAWA., Y AJIOKA, &H ASAKURA. (2000). Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, **82**, 1689

KOEHLER, A., FRAUKE B., CORNELIA S., PETRA R., ANNETTE W., HAGEN B., ARNDT H., FERDINAND H.,WOLFGANG D. (2004). Gene expression profiling of colorectal cancer and Metastases divide stumours according to their clinicopathological stage. *Journal of Pathology*. **204(1)**: p. 65-74.

KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A., ZORIĆ, N. (2006).The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* **27(2-3)**:95-125.

KURITA K., MAEDA M., MANSOUR M.A., KOKURYO T., UEHARA K., YOKOYAMA Y., NAGINO M., HAMAGUCHI M., SENG T. (2016). TRIP13 is expressed in colorectal cancer and promotes cancer cell invasion. *Oncol. Lett.* **12**, 5240–5246. 1693.

KUZU, I., KUZU, M.A. (2010). KOLOREKTAL KANSER PATOLOJİSİ HİSTOPATOLOJİK RAPOR, EVRELEME ve PROGNOSTİK FAKTÖRLER. BÖLÜM 7. Sy. **140**. KOLON ve REKTUM KANSERLERİ, BAYKAN, A., ZORLUOĞLU, A., GEÇİM, E., TERZİ, C. 1. Baskı.

KWON H.C., KIM S.H., ROH M.S., KIM J.S., LEE H.S., CHOI H.J., JEONG J.S., KIM H.J., HWANG T.H. D.D.S. (2004). Gene expression profiling in lymphnode-positive and lymphnode-negative colorectal cancer. *Diseases of the Colon&Rectum*. **47(2)**: p. 141-152.

KWONG L.N., DOVE W.F. (2009). APC and its modifiers in colon cancer. *Adv Exp Med Biol.* ;**656**:85-106.

LAGERSTED K. (2009). Genetic Analyses of Tumor Progressionin Colorectal Cancer, ISBN 978-91-628-7817-7, Department of Surgery/Institute of Clinical Sciences Department of Chemistry/Institute of Biomedicine The Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg Sweden.

LAKEN S.J., PAPADOPOULOS N., PETERSEN G.M., GRUBER S.B., HAMILTON S.R., GIARDIELLO F.M, BRENSINGER J.D., VOGELSTEIN B., KINZLER K.W. (1999). Analysis of masked mutations in familial adenomatous polyposis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:**2322**–6.

LEE S., BANG S., SONG K., LEE I. (2006). Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. *Oncology Reports*, **16(4)**: p. 747-754.

LENGAUER C., KINZLER K.W., VOGELSTEIN B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396(6712)**: p. 643-649.

- LI L., SUN R., LIANG Y., PAN X., LI Z., BAI P., ZENG X., ZHANG D., ZHANG L., GAO L. (2013). Association between polymorphisms in long non-coding RNA PRNCR1 in 8q24 and risk of colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.***32**:104.
- LIN YM., FURUKAWA Y., TSUNODA T., YUE CT., YANG KC., NAKAMURA Y. (2002). Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene.* **21(26)**: p4120-4128.
- LIN, H.M., WANG D., ZHANG C., ZHANG Z., CHEN X., LIAN J., LIU J. (2007). Genome wide expression profiling identifies genes associated with colorectal liver metastasis. *Oncology Reports.* **17(6)**: p. 1541-1549.
- LIU H.L., HUO J.F., LIU Z.J. & CHEN X.B. (2015). Interference on cytoplasmic polyadenylation element-binding proteins affects their viability of glioma stem cells. *Genet Mol Res* **14**: 13504-13510.
- LU R., ZHOU Z., YU W., XIA Y., ZHI X. (2017). CPEB4 promotes cell migration and invasion via upregulating vimentin expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* **489(2)**:135–141.
- MATTAR M.C., LOUGH D., PISHVAIAN M.J., CHARABATY A. (2011). Current management of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Gastro Intest Cancer Res*; **4**:53-61.
- MESSIAS M.C F., MECATTI G.C., FIGUEIREDO ANGOLINI C.F., EBERLIN M.N., CREDIDIO L., & REAL MARTINEZ C.A. (2017). Plasma lipidomic signature of rectal adenocarcinoma reveal potential biomarkers. *Front Oncol.* (2018) **7**:325. doi: 10.3389/fonc.00325
- MILLER J.R., HOCKING A.M., BROWN J.D., MOON R.T. (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene.* Dec 20; **18(55)**:7860-72.
- MIYAKI, M., KONISHI M., KIKUCHI-YANOSHITA R., ENOMOTO M., IGARI T., TANAKA K., MURAOKA M., TAKAHASHI H., AMADA Y., FUKAYAMA M. (1994). Characteristics of Somatic Mutation of the Adenomatous Polyposis-Coli Gene in Colorectal Tumors. *Cancer Research*, **54(11)**: p. 3011-3020.
- MOORTGAT S., DESIR J., BENOIT V., BOULANGER S., PENDEVILLE H., NASSOGNE M.C., LEDERER D., MAYSTADT I. (2016). Two novel EIF2S3 mutations associated with syndromic intellectual disability with severe microcephaly, growth retardation, and epilepsy. *Am. J. Med. Genet.* **170A**: 2927-2933.
- MORRISON T.B., WEIS J.J., WITTEWER C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* Jun; **24(6)**:954-8, 960, 962.
- MUNEMITSU S., ALBERT I., RUBINFELD B., POLAKIS. (1996). Deletion of an amino-terminal sequence beta-catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol.* Aug; **16(8)**: 4088–4094. doi: 10.1128/mcb.16.8.4088

- NIELSEN H.J., JAKOBSEN K.V., CHRISTENSEN I.J., BRÜNNER N. (2011). Screening for colorectal cancer: possible improvements by risk assessment evaluation? *Scand J Gastroenterol* Aug **19**. Epub ahead of print.
- NORDGÅRD O., OLTEDAL S., KØRNER H., AASPRONG O.G., TJENSVOLL K., GILJE B., HEIKKILÄ R. (2009). Quantitative RT-PCR detection of tumor cells in sentinel lymph nodes isolated from colon cancer patients with an ex vivo approach. *Ann Surg*; **249**:602-07.
- NORMAN W., MARTEN., BURKE E.J., HAYDEN J.M., & STRAUS D.S.(1994). Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *The FASEB Journal* Vol: **8**pp. 538-544.
- NOWELL, P.C.(2002). Tumor progression: a brief historical perspective. *Seminars in Cancer Biology*, **12**(4): p. 261-266.
- OBROCEA F.L., SAJIN M., MARINESCU E.C., STOICA D.(2011). Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathology reporting. *Rom J Morphol Embryol*; **52**:537-44.
- OGAWA K., UTSUNOMIYA T., MIMORI K., TANAKA F., INOUE H., NAGAHARA H., MURAYAMA S., MORI M.(2005). Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*; **11**:2889-93.
- OHUE M., TOMITA N., MONDEN T., FUJITA M., FUKUNAGA M., TAKAMI K., YANA I., OHNISHI T., ENOMOTO T., INOUE M. (1994). A frequent alteration of p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Res*, **54**(17): p. 4798-4804.
- ORTIZ-ZAPATER E., PINEDA D., MARTINEZ-BOSCH N., MIRANDA F. G., IGLESIAS M., ALAMEDA F., MORENO M., ELISCOVICH C., EYRAS E., REAL F.X., MÉNDEZ R., NAVARRO P. (2012). Key contribution of CPEB4-mediated translational control to cancer progression. *NatMed*. **18**(1):83–90.
- ÖBERG Å., LINDMARK G., ISRAELSSON A., HAMMARSTRÖM S., HAMMARSTRÖM M.L. (2004). Detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR for CEA and CK20 mRNAs. *Int J Cancer*; **111**:101-110.
- PFAFFL M.W (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. **29**(9):e45.
- PAIK S., SHAK S., TANG G., KIM C., BAKER J., CRONIN M., BAEHNER F.L.(2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*,. **351**(27): p. 2817-2826.
- PARKIN D. M., BRAY F., FERLAY J., PISANI P. (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. **55**: p. 74-108.
- PAL I., MANDAL M.(2012). PI3K and Akt as molecular targets for cancer therapy: current clinical outcomes *Acta Pharmacol Sin*. Dec; **33**(12) : 1441–1458.

- PITARI G.M., LI P., LIN J.E., ZUZGA D., GIBBONS A.V., SNOOK A.E., SCHULZ S., WALDMAN S.A. (2007). The paracrine hormone hypothesis of colorectal cancer. *Clin Pharmacol Ther*; **82**:441-47.
- POWELL S.M., ZILZ N., BEAZER-BARCLAY Y., BRYAN T.M., HAMILTON S.R., THIBODEAU S.N., VOGELSTEIN B., KINZLER K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, **359**(6392): p. 235-237.
- POWELL S.M., PETERSEN G.M., KRUSH A.J., BOOKER S., JEN J., GIARDIELLO F.M., HAMILTON S.R., VOGELSTEIN B., KINZLER K.W. (1993). Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. **329**:1982-7.
- POWELL S.M., ZILZ N., BEAZER-BARCLAY Y., BRYAN T.M., HAMILTON S.R., THIBODEAU S.N., VOGELSTEIN B., KINZLER K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, **359**(6392): p. 235-237.
- POLAKIS P.(1999). The onco genic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*. Feb; **9**(1):15-21.
- QIAGEN (2014). Erişim: [[http://www.qiagen.com/resources/molecular-biology-methods/pcr/#What is probe-based PCR?](http://www.qiagen.com/resources/molecular-biology-methods/pcr/#What%20is%20probe-based%20PCR?)]. Erişim tarihi: 06.02.2020
- RENKONEN E.T., NIEMINEN P., ABDEL-RAHMAN W.M., MOISIO A.L., JÄRVELÄ I., ARTE S., JÄRVINEN H.J., PELTOMÄKI P. (2005). Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogeneous. *J Clin Oncol*. **23**:5651-9.
- ROGERS G.W.JR., KOMAR A.A., MERRICKE W.C. (2002). IF4A: The godfather of the DEAD box helicases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* Volume 72, Pages **307-331**
- RUBIN E.(2001). *Essential Pathology*, 3rd Edition, Lippincott Williams &Wilkins, Baltimore &Philadelphia, USA.
- RUBINFELD B., SOUZA B., ALBERT I., MÜLLER O., CHAMBERLAIN S.H., MASIARZ F.R., MUNEMITSU S., POLAKIS P. Association of the APC gene product with β -catenin. *Science*. 1993; **262**:1731-1734
- RUBINFELD B., ALBERT I., PORFIRI E., MUNEMITSU S., POLAKIS P.(1997). Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res*. Oct **57**(20):4624-30.
- SARGENT D.J., RESNICK M.B., MEYERS M.O., GOLDAR-NAJAFI A., CLANCY T., & GILL S.(2011). Evaluation of Guanylyl Cyclase C Lymph Node Status for Colon Cancer Staging and Prognosis. *Ann Surg Oncol* May 1. Epub ahead of print.
- SCHULZ S., HYSLOP T., HAAF J., BONACCORSO C., NIELSEN K., WITEK M.E., & BIRBE R.(2006). A validated quantitative assay to detect occult micrometastases by reverse transcriptase polymerase chain reaction of guanylyl cyclase C in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*; **12**:4545-52.

- SCHUSTER, R., MAX N., MANN B., HEUFELDER K., THILO F., GRÖNE J., ROKOS F., BUHR H.J., THIEL E., KEILHOLZ U. (2004). Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *International Journal of Cancer*, **108**(2): p. 219-227.
- SCHULZ S., HYSLOP T., HAAF J., BONACCORSO C., NIELSEN K., WITEK M.E., BIRBE R., PALAZZO J., WEINBERG D., WALDMAN S.A. (2006). A validated quantitative assay to detect occult micrometastases by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of guanylyl cyclase C in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*; **12**:4545-52.
- SHENG N., YAN L., WU K., YOU W., GONG J., HU L., TAN G., CHEN H. & WANG Z. (2018). TRIP13 promotes tumor growth and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Cell Death and Disease* **9**:402 DOI 10.1038/s41419-018-0434-z
- SORAVIA, C., BERK T., MADLENSKY Y. L., MITRI A., CHENG H., GALLINGER S., COHEN Z., & BAPAT. (1998). Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *American Journal of Human Genetics*, **62**(6): p. 1290-1301.
- STURGEON C. (2002). Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin Chem*; **48**:1151-59.
- STRANGER B.E., FORREST M.S., DUNNING M., INGLE C.E., BEAZLEY C., THORNE N, et al. (2007). Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* **315**, 848–853.
- SU L.K., VOGELSTEIN B., KINZLER K.W. (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* ;**262**:1734–1737.
- SUN H.T., WEN X., HAN T., LIU ZH, LI SB, WANG J.G. & LIU X.P. (2015). Expression of CPEB4 in invasive ductal breast carcinoma and its prognostic significance. *Oncotargets Ther* **8**: 3499-506.
- TAO Y., YANG G., YANG H., SONG D., HU L., XIE B., & WANG H. (2017). TRIP13 impairs mitotic checkpoint surveillance and is associated with poor prognosis in multiple myeloma. *Oncotarget* **8**, 26718–26731
- THELLIN O., ZORZI W., LAKAYE B., BORMAN B. D., COUMANS B., HENNEN G., GRISAR T., IGOUT A. & HEINEN, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.*, **75**, 291-295.
- TIAN Q., LIANG L., DING J., ZHA R., SHI H., WANG Q., HUANG S., GUO W., GE C., CHEN T., LI J., HE X. (2012). MicroRNA-550a acts as a pro-metastatic gene and directly targets cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4 in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2012;**7**(11):e48958 Epub 11/13. 10.1371/journal.pone.0048958 PONE-D-12-24463 [pii].
- TSAIL Y., CHANG Y.W., LEE M.C., CHANG Y.C., HWANG P.I., HUANG Y.S., CHENG C.F. (2016). *PLoS One*. Biphasic and Stage-Associated Expression of CPEB4 in Hepatocellular Carcinoma. May **9**; **11**(5):e0155025. doi: 10.1371/journal.pone.0155025. eCollection 2016.

- VADER G. (2015). Pch2(TRIP13): controlling cell division through regulation of HORMA domains. *Chromosoma* **124**, 333–339
- VIVANCO I., SAWYERS C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in humancancer. *NatRevCancer.* ;2:489–501.
- VOGELSTEIN B.,FEARON E.R., HAMILTON S.R., KERN S.E., PREISINGER A.C., LEPPERT M., NAKAMURA Y., WHITE R., SMITS A.M., BOS J.L.(1988). Genetic Alterations During Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*, **319(9)**: p. 525-532.
- VOGELSTEIN, B., FEARON E.R., HAMILTON S.R., KERN S.E., PREISINGER A.C., LEPPERT M., NAKAMURA Y., WHITE R., SMITS A.M., BOS J.L.(1988). Genetic Alterations During Colorectal-Tumor Development. *New EnglandJournal of Medicine*, **319(9)**: p. 525-532.
- YAN H., DOBBIE Z., GRUBER S.B., MARKOWITZ S., ROMANS K., GIARDIELLO F.M., KINZLER K.W., VOGELSTEIN B. (2002). Small changes in expression affect predisposition to tumorigenesis. *Nat Genet.* **30**:25–6
- YANAGAWA, R.,FURUKAWA Y., TSUNODA T., KITAHARA O., KAMEYAMA M., MURATA K., ISHIKAWA O., NAKAMURA Y.(2001). Genome-wide screening of genes showig altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray. *Neoplasia.* **3(5)**: p. 395-401.
- YANG Z.Y., WU X.Y., HUANG Y.F., DI M.Y., ZHENG D.Y., CHEN J.Z., DING H., MAO C &TANG J.L.(2013). Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a systematic review with meta-analysis. *Int J Cancer* **133**: 1914-1925.
- ZHIJUN L., DAPENG W., HONG J., GUICONG W., BINGJIAN Y., HONGLIN L.(2017). Over expression of CPEB4 in glioma indicates a poor prognosis by promoting cell migration and invasion. *Tumour Biol.***39(4)**:1010428317694538.
- ZHONG X., XIAO Y., CHEN C., WEI X., HU C., LING X. & LIU X. (2015). MicroRNA-203-mediated post transcriptional deregulation of CPEB4 contributes to colorectal cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun* **466**: 206-213.
- ZHOU K., ZHANG W., ZHANG Q., GUI R., ZHAO H., CHAI X., LI Y., WEI X., SONG Y. (2017). Loss of thyroid hormone receptor interactor 13 inhibits cell proliferation and survival in human chronic lymphocytic leukemia. *Onco target* **8**, 25469–25481.
- ZLOBEC I., LUGLI A. (2008). Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol*; **61**:561-69.
- ZOU T.T., SELARU F.M., XU Y., SHUSTOVA V., YIN J., MORI Y., SHIBATA D., SATO F., WANG S., OLARU A., DEACU E., LIU TC., ABRAHAM JM., MELTZER SJ. (2002). Application of cDNA microarray stogenerate a molecular taxonomy capable of distinguishing between coloncancer and normalcolon. *Oncogene.* **21(31)**: p. 4855-4862.

- WALDMAN S.A., HYSLOP T., SCHULZ S., BARKUN A., NIELSEN K., HAAF J., BONACCORSO C., LI Y., WEINBERG D.S. (2009). Association of GUCY2C expression in lymph nodes with time to recurrence and disease-free survival in pN0 colorectal cancer. *J Am Med Assoc*; **301**:745-52.
- WANG H.X., QIN R., MAO J., HUANG Q.L., HONG F., LI F., GONG Z.Y., XU T., YAN Y., CHAO S.H., ZHANG S.K., CHEN J.X. (2018). CPEB4 regulates glioblastoma cell proliferation and predicts poor outcome of patients. *Clin Neurol Neurosurg*. Jun; **169**:92-97.
- WANG Z., LIU, Z., FANG, X. & YANG, H. (2017). MiR-142-5p suppresses tumorigenesis by targeting PIK3CA in non-small cell lung cancer. *Cell. Physiol. Biochem*. **43**, 2505–2515.
- WATANABE, T., KOBUNAI, TAKASHI., TANAKA, TOSHIKI., ISHIHARA, SOICHIRO., MATSUDA, KEIJI., NAGAWA, HIROKAZU. (2009). Gene Expression Signature and the Prediction of Lymph Node Metastasis in Colorectal Cancer by DNA Microarray. *Diseases of the Colon&Rectum*. **52**(12): p. 1941-1948.
- WEI E.K., GIOVANNUCCI E., WU K., ROSNER B., FUCHS C.S., WILLETT W.C. (2004). Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer*; **108**:433-42.
- WESTRA H.J. PETERS M.J., ESKO T., YAGHOOTKAR H., SCHURMANN C., KETTUNEN J., et al. (2013): Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat. Genet.* **45**, 1238–1243.
- WHARTON, R.Q., WHARTON R.Q., JONAS S.K., GLOVER C., KHAN Z.A., KLOKOUZAS A., QUINN H., HENRY M., ALLEN-MERSH T.G. (1999). Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. *Clinical Cancer Research*, **5**(12): p. 4158-4163.
- WONG, I.H.N., YEO W., CHAN A.T., JOHNSON P.J. (2001). Quantitative relationship of the circulating tumor burden assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients with Dukes' stage, serum carcinoembryonic antigen level and tumor progression. *Cancer Letters*, **162**(1): p. 65-73.
- XU H., LIU B. (2013). CPEB4 is a candidate biomarker for defining metastatic cancers and directing personalized therapies. *MedHypotheses*. **81**(5):875–877. Nov; **81**(5):875-7.
- WANG Y., WANG Y.L., WANG Y., LIU T., NI M., LI M.S., et al. (2017). PIK3CA mutations contribute to acquired cetuximab resistance in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**, 4602–4616.

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1#> (Erişim 25.01.2020)

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PIK3CA> (Erişim 20.01.2020).

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Zafer SÖYLEMEZ
Uyruğu : TC
Doğum Tarihi ve Yeri : 06/07/1979
Medeni Durumu : Bekar
Tel : 05369242274
e-mail : soylemezzafer01@gmail.com
Yazışma Adresi : Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD.

EĞİTİM

Lisans : Sıtkı Koçman Üniversitesi / Biyoloji Bölümü-2001
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyoloji ve Genetik-2006
Doktora : Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü-Tıbbi Genetik-2020

İŞ DENEYİMLERİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik AD Araştırma Görevlisi-2004-Devam ediyor

YABANCI DİL

YÖK DİL: 55

YAYINLAR

- 1- Onrat S.T, Akci Ö, **Söylemez Z**, Onrat E, Avşar A. Prevalence of myocardial infarction polymorphisms in Afyonkarahisar, Western Turkey. *Molecular Biology Reports* September 2012, Volume 39, Issue 9, pp 9257–92647
- 2- Onrat ST, **Söylemez Z**, Elmas M. 46,XX, der(15),t(Y;15)(q12;p11) karyotype in an azoospermic male. *Indian J Hum Genet*. 2012 May;18(2):241-5
- 3- Arikan Y, Tosun M, YilmazS, Saykol V and Söylemez Z. The comparative effects of pneumoperitoneum on apoptosis and p53 expression in gastrointestinal organs. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques* Vol. 18, No. 3
- 4- Tosun M, Samli H, Arikan Y, Solak M, Sahin A, Söylemez Z, Kalkan S. The effects of CO2 pneumoperitoneum on the apoptotic index in the peritoneum. *Adv Ther*. 2007 Jul-Aug;24(4):883-9.
- 5- Elitok B, Solak M, Kabu M, Elitok Ö. M., Söylemez Z and Fıstık T. Clinical, Haematological, Serum Biochemical and Cytogenetic Study in Cows with Primary Ketosis, *Pak. Vet. J*,2010
- 6- Yildiz S, Yildirim A, Özüguz P, Erdoğan M Ö, Kaçar S.D, Arikan E.S, Kuşku E, **Söylemez Z**, Solak M. -119C/G in MYG1 Gene and 49A/G in CTLA4 Gene Polymorphisms in Turkish Patients with Vitiligo. *Journal of Advances in Internal Medicine*, 5(1), 1-5.
- 7-ErdoğanM,Ö, Avcı K,YildizS.H,Terzi E.S.A, **Söylemez Z**,Varol N. Effect of gene polymorphisms in transmembrane protein 18 (*TMEM18*) and neuronal growth regulator 1 (*NEGR1*) on body mass index in obese. Pages 1567-1574 | Received 23 Jan 2018, Accepted 04 Oct 2018, Published online: 14 Nov 2018.

EKLER

Ek. 1. İntihal Raporu

FARKLI EVRE KOLOREKTAL TÜMÖRLERDE BAZI GENLERİN İFADELENME DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%7

BENZERLİK ENDEKSİ

%5

İNTERNET
KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%3

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.tkrcd.org.tr

İnternet Kaynağı

%2

2

Submitted to Afyon Kocatepe University

Öğrenci Ödevi

%1

3

acikerisim.aku.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%1

4

"Abstracts of the 47th Annual Meeting of the EASD, Lisbon 2011", Diabetologia, 2011

Yayın

<%1

5

Submitted to Gaziantep Aniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

6

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

<%1

7

www.wjgnet.com

İnternet Kaynağı

<%1

8

www.kolonrektum.com

İnternet Kaynağı

<%1