



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KOLOREKTAL KANSERİNDE OTOFAJİ GEN
EKSPRESYON PROFİLİNİN KLİNİK VE PATOLOJİK
PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Uz. Dr. Ali SÜNER
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIBBİ ONKOLOJİ BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Celaletdin CAMCI**

**Eylül-2013
GAZİANTEP**

**T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KOLOREKTAL KANSERİNDE OTOFAJİ GEN
EKSPRESYON PROFİLİNİN KLİNİK VE PATOLOJİK
PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

**Uz. Dr. Ali SÜNER
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIBBİ ONKOLOJİ BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Celaletdin CAMCI**

I. ÖNSÖZ

Dünyada ve Türkiye'de sağlık alanında çok hızlı bir gelişim ve değişim yaşanıyor. Özellikle Onkoloji alanında bu değişim ve gelişim çok daha belirgin olarak göze çarpıyor. Bu zor ve çok önemli bilim dalında uzman olmaktan mutluluk duyuyorum.

Asistanlığım süresince değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan kaçınmayan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Celaletdin CAMCI ve Prof. Dr. Alper SEVİNÇ'e, hem bir hoca hem de ağabey olarak desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet Emin KALENDER'e, teşekkür ederim. Ayrıca birlikte çalışmaktan zevk aldığım arkadaşlarım Dr. Ozan BALAKAN'a, Dr. Özlen Nuray SEVER'e ve Dr. Hakan BÜYÜKHATİPOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI'ya teşekkür ederim.

Bu süreç boyunca gösterdikleri sabır ve destek için eşim Aynur SÜNER'e ve çocuklarıma teşekkür ederim.

II. İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
KISALTMALAR	VI
TABLO LİSTESİ.....	VII
ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Epidemiyoloji	4
2.2. Etyoloji.....	5
2.2.1.Genetik faktörler	5
2.2.2. Çevresel faktörler	5
2.2.3. Ailesel kolorektal kanser	6
2.3. Kolorektal kanser için tarama.....	7
2.4. Evreleme	9
2.5. Programlı hücre ölüm modelleri.....	12
2.5.1. Apoptozis.....	12
2.5.2. Otofaji	12
2.5.3. Otofajinin düzenlenmesi	15
2.5.4. Otofaji üzerinde etkili olan moleküller	16
2.5.5. Tümörögenizde otofajinin rolü	17
2.5.6. Otofaji ve apoptozis arasındaki hücresele düzeyde ilişki	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1.Örneklerin toplanması.....	19
3.2. Yöntem.....	19
3.2.1. Gen Ekspresyonu	19
3.2.2. cDNA elde edilmesi	20
3.2.3. RT- PCR çalışması	21

3.2.4. Örnek ve PCR karışımı.....	21
3.2.5. Analiz	22
3.3. İstatistiksel analizler	23
4. BULGULAR	24
4.1. Demografik, Klinik ve Patolojik Bulgular	24
4.2.Genetik bulgular	26
4.2.1.Genel açıklamalar.....	26
4.2.2. Tümör Dokusu ile Normal Dokunun Karşılaştırması	26
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	35
7. KAYNAKLAR	36

III. ÖZET

KOLOREKTAL KANSERİNDE OTOFAJİ GEN EKSPRESYON PROFİLİNİN KLİNİK VE PATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ

Dr Ali SÜNER

Uzmanlık Tezi, İç Hastalıkları Anabilin Dalı, Tıbbi Onkoloji BD

Tez Danışmanı: Prof Dr Celaletdin Camcı

Eylül 2013, 42 sayfa.

Kolon kanseri tüm dünyada kadınlar ve erkeklerde üçüncü en sık gözlenen kanserdir. Yılda yaklaşık 1.200.000 yeni vaka ve yaklaşık 609.000 ölüm tahmin edilmektedir. Erkek ve kadınlardaki kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır.

Erken evre kolorektal kanser'in (KRK) primer tedavisi cerrahidir ve yüksek oranda kür sağlanabilir. Ancak nüks ve metastatik hastaların prognozu kötüdür ve median yaşam süresi 24 ay kadardır. Hastaların yaklaşık olarak yarısında metastaz gelişmektedir. Bu hastalarda temel tedavi kemoterapidir. Yeni kemoterapi ajanları ve hedefe yönelik ajanlar ile cevap oranları ve yaşam süresinde artış olmuştur.

Otofaji kendi kendini yeme anlamına gelir. Otofaji uzun ömürlü proteinlerin, hasarlı organellerin, mikroorganizmaların ve virüslerin hücre içerisinde paketlenip lizozoma taşınarak parçalanması süreci olarak bilinmektedir. Otofaji genleri (Atg); otofajinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Otofaji sitoplazmada otofagozom denilen çift zarlı keseciklerin varlığıyla tanımlanır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda otofajinin metabolizma, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, enfeksiyonlar, morfogenez, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminde de rol oynadığı görülmüştür.

Otofaji, hem hücrenin yaşatılabilmesi hem de hücre ölümü olmak üzere zıt iki role sahiptir. Otofaji hücre ölümüne de neden olduğundan dolayı programlı hücre ölümü II olarak isimlendirilmiştir.

Otofajinin kanser ile ilişkisini ortaya koyan çalışmalar sonucu kanserde yeni tedavi stratejileri olarak otofaji sinyal yollarını hedefleyen ilaçlar geliştirilmektedir. Örneğin otofaji yolağını tetikleyerek etki gösteren mTOR inhibitörleri klinik olarak renal karsinom tedavisinde kullanılmaktadır.

Çalışmamızda hem kanser oluşumunun erken evrelerinde hem de ileri evre kanserlerin progresyonunda önemli role sahip olduğu düşünülen Otofaji yolağı ile ilişkili 94 gen'in RT-PCR yöntemi ile normal kolon dokusunda ve tümör dokusunda ekspresyon düzeylerine bakıldı. Normal dokuda ve tümöral dokudaki gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Bu genlerden 47 tanesinin ekspresyon düzeyi tümör dokusunda anlamlı derecede daha yüksek bulundu. Bu sonuçlar hastaların demografik ve histopatolojik özellikleri ile karşılaştırıldı ve aralarında anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı.

Anahtar kelimeler: Kolorektal Kanser, Otofaji, Gen Ekspresyonu

IV. ABSTRACT

THE ASSOCIATION OF AUTOPHAGY GENE EXPRESSION PROFILES WITH CLINICAL AND PATHOLOGICAL PARAMETERES IN COLORECTAL CANCER

Dr. Ali SÜNER

Dissertation, Department of Internal Medicine Division of Medical Oncology

Thesis Advisor: Prof. Dr. Celaletdin CAMCI

September 2013, 42 pages.

Colon cancer is the third most common type of cancer among men and women over the world. Approximately 1.200.000 new cases and 609.000 colon cancer-related deaths are estimated per year. Colon cancer consists of 10% of all cancers among men and women.

Primary treatment of early stage colorectal cancer (CRC) is surgery with high cure rates. However, prognosis of recurrent and metastatic patients are poor and the median survival time is about 24 months. Approximately half of the patients develop metastases. Main treatment of these patients is chemotherapy. New chemotherapy agents and targeted drugs have led to increased response and survival rates.

Autophagy means that the cell eats itself. Autophagy is known as the process that include packaging and then transporting of the long-living proteins, damaged organelles, microorganisms and viruses into the lysosomes where they are digested. Autophagy genes (Atg) play a role in the regulation of autophagy. Autophagy is defined by the presence of double membrane vesicles in the cytoplasm called autophagosomes. Recent studies revealed that autophagy take a part in metabolism, cancer, neurodegenerative diseases, infections, morphogenesis, aging, cell death and immune system.

Autophagy includes both the opposite processes of cell death and cell sustenance. roles including. Since autophagy causes cell death it is called programmed cell death II.

Based upon the recent studies that revealed a relationship between cancer and autophagy, new treatment strategies have been developed that target autophagy signal pathways. For example, mTOR inhibitors have been used in the treatment of renal cell carcinoma.

In this study, we studied the expression levels of 94 genes that are supposed to be related to cancer development and progression with RT-PCR method in colon cancer tissue and normal colon tissue. Gene expression levels were compared between normal tissue and tumor tissue. 47 out of 94 genes showed higher expression in tumor tissues than in normal tissues. These results were compared to patients demographical and histological features, showing no association.

Key Words: Colorectal Cancer, Autophagy, Gene Expression

V. KISALTMALAR

Atg	: Otofaji genleri
FAP	: Familyal Adenomatöz Polipozis
GGK	: Gaitada gizli kan
HNPCC	: Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser
IHK	: İmmün histokimya
KRK	: Kolorektal kanser
3-MA	: 3-metil adenin
MMR	: Mismatch Repair
MSI	: Mikrosatellit insitabilite
mTOR	: Mammalin target of Rapamycin (Memelilerde Rapamisin hedefi)
NSAI	: Nonsteroid anti inflamatuvar
OS	: Genel sağkalım
PCR	: Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyon)
PFS	: Progresyonsuz sağkalım
PI3K	: Fosfo Inozitol 3 Kinaz
SEER	: Sürvey Epidemiyoloji ve Sonuçlar
TNM	: Tümör Nod Metastaz

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kolorektal Kanserde TNM evreleme sistemi.....	11
Tablo 2. SEER programı 2010 verilerine göre evreye göre 5 yıllık rölatif sağ kalım oranları	12
Tablo 3. Otofaji ile ilgili ekspresyonu araştırılan hedef genlerin listesi	22
Tablo 4. Hastaların genel demografik, klinik ve patolojik özelliklerine göre dağılımı	25
Tablo 5. Hastaların TNM evresine göre dağılımı	26
Tablo 6. Normal dokuya göre tümör dokusunda anlamlı derecede yüksek saptanan genler	27

VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Apoptozis ve Otofaji arasında farklar	12
Şekil 2. Otofaji Mekanizmaları	14
Şekil 3. Otofaji basamakları	15
Şekil 4. Otofaji yolağı: ubikitin benzeri sistem	10
Şekil 5. Otofaji basamakları.....	11
Şekil 6 .Tümör/normal doku ekspresyon oranı	28

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kolon kanseri tüm dünyada kadınlar ve erkeklerde görülen kanserler arasında üçüncü en sık gözlenen kanserdir. Yılda yaklaşık 1.200.000 yeni vaka ve yaklaşık 609.000 ölüm görülmektedir. Erkek ve kadınlarda tüm kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (1).

Kolon kanseri insidansı, etkili bakım ve yaşam biçimi değişiklikleri sonucunda batı ülkelerinde azalmıştır. Genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi kolorektal karsinogenezinde önemli role sahiptir. Özellikle ileri evrede, diğer solid tümörlerle karşılaştırıldığında son iki dekatta moleküler mekanizması daha iyi anlaşılmasına rağmen kolorektal kanser (KRK) prognozunda belirgin bir gelişme olmamıştır. Survey Epidemiyoloji ve Sonuçlar (SEER) program veritabanı analizine göre 5 yıllık sağkalım oranları 1980'lerin başlarında tanı konan hastalar için %56.5'den 1990'ların başlarında tanı konan hastalar için % 63.2'ye kadar ve son zamanlarda erken tanı ve tedaviye bağlı olarak % 64.9'a yükselmiştir (2). Son 30 yılda kolon kanseri insidansı azalmış ve 1990 ile 2007 yılları arasına mortalite %35 oranında azalmıştır. Bunun muhtemel nedenleri erken tanı ve tedavideki gelişmelerdir (3).

Erken evre KRK'nın primer tedavisi cerrahidir ve yüksek oranda kür sağlanabilir. Ancak nüks ve metastatik hastaların prognozu kötüdür ve medyan yaşam süresi 24 ay kadardır (4). Hastaların yaklaşık olarak yarısında metastaz gelişmektedir. Bu hastalarda temel tedavi kemoterapidir. Yeni kemoterapi ajanları ve hedefe yönelik ajanlar ile cevap oranları ve yaşam süresinde artış olmuştur (5).

Klinik pratiğe giren bu yeni ajanlara rağmen metastatik KRK (mKRK) hastalarının medyan yaşam süresi 24 ayı geçememektedir. Bunun nedeni bu bileşiklerden fayda görecekten hastaları seçmede yeterince biyomarkır olmayışı olabilir (6).

Kanserin küratif tedavisi önündeki en önemli engellerden biri hücre ölüm sinyalizasyonundaki bozukluklardır (7).

Otofaji kendi kendini yeme anlamına gelir. Otofaji hücre içerisindeki uzun ömürlü proteinlerin, hasarlı organellerin, mikroorganizmaların ve virüslerin hücre içerisinde paketlenip lizozoma taşınarak parçalanması süreci olarak bilinmektedir (8,9). Otofaji genleri (Atg); otofajinin düzenlenmesinde rol oynarlar (10). Otofaji sitoplazmada otofagozom denilen çift zarlı keseciklerin varlığıyla tanımlanır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda otofajinin metabolizma, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, enfeksiyonlar, morfogenez, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminde de rol oynadığı görülmüştür (11).

Otofaji, hem hücrenin yaşatılabilmesi hem de hücre ölümü olmak üzere zıt iki role sahiptir (12). Otofaji hücre ölümüne de neden olduğundan dolayı "programlı hücre ölümü II" olarak isimlendirilmiştir (13).

Otofajinin kanser ile ilişkisini ortaya koyan çalışmalar sonucu kanserde yeni tedavi stratejileri olarak otofaji sinyal yollarını hedefleyen ilaçlar geliştirilmektedir. Örneğin otofaji yolağını tetikleyerek etki gösteren mTOR inhibitörleri klinik olarak renal karsinom tedavisinde kullanılmaktadır (14).

Kolorektal ve gastrik kanserlerde UVRAG geninde mutasyon tanımlanmıştır (15). UVRAG, Bif1 genlerinin tümörögenезisi baskılayabileceği ve bu iki genin tümör supresör gen olabileceği öne sürülmüştür (15,16). Hepatoselüler ve gastrik kanserde Atg5 geninde, kolorektal ve gastrik kanserlerde Atg2B, Atg5, Atg9B genlerinde somatik mutasyonlar tanımlanmıştır (9,17). Bu çalışmalar sonucunda otofajik genlerin ifadelerinin kanser hücrelerinde azaldığı ve otofajinin karsinogenezde tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak önemli rol oynadığını savunan fikirler ileri sürülmüştür (18).

Moleküler düzeyde otofajinin kanserdeki rolünün tümör supresör ve onkogenler tarafından da düzenlenebileceği ve otofaji genlerinin tümör supressör olabileceği ileri sürülen bir hipotezdir (19,20).

Apoptotik mekanizmalardaki bozukluklar hem anormal proliferasyona yol açmakta hem de sitotoksik tedaviye dirence sebep olmaktadır. Bu nedenle özellikle son on yılda apoptozisi indükleyen yeni ajanlar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (21). Kanser hücrelerinde açlığa otofajik yanıt daha az belirgin olmakla birlikte bir çok tümör tipinde önemli bir sağkalım mekanizması olarak karşımıza çıkmaktadır (22).

Karsinogenezin supresyonunun da otofaji ile sağlanabildiği düşünülmektedir. Apoptozise uğramayan kanser hücrelerinin yok edilmesinde bir diğer mekanizma da otofaji olabilir (23).

Sonuç olarak kolorektal kanser tüm dünyada sık gözlenen ve ölüme yol açan kanserlerden biridir. Otofaji; metabolizmanın düzenlenmesi, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminde rol almakla birlikte kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve enfeksiyon hastalıklarının nedenleri arasında da sayılmaktadır. Bu çalışmada kolorektal kanserin klinik ve patolojik özellikleri ile otofajinin ilişkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji

Kolon kanseri tüm dünyada kadınlar ve erkeklerde görülen kanserler arasında üçüncü en sık gözlenen kanserdir. Yılda yaklaşık 1.200.000 yeni vaka ve yaklaşık 609.000 ölüm görülmektedir. Erkek ve kadınlardaki kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (1).

Kolorektal kanser Amerika Birleşik Devletleri'nde üçüncü en sık görülen kanserdir ve ölüm nedeni olarak üçüncü sıradadır (24). Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın 2007-2008 yıllarında 10 il'deki kanser kayıt merkezi verilerine göre, KRK görülme sıklığı açısından tüm kanserler içinde % 7.8 ile kadınlarda üçüncü ve % 7.5 ile erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır (25).

Kolorektal kanser, normal glandüler epitelin invaziv kansere değişim gösterdiği genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimidir. Normal kolon epitelinin adenoma, invaziv kansere ve metastatik kansere dönüşümünü içeren basamaklar Vogelstein ve Fearon tarafından tanımlanmıştır (26). Kolorektal kanser patogeneğinde genomik ve epigenomik instabilite kadar, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozis, immortalizasyon, angiogenezis ve invazyon gibi karsinogenezde kritik olayları düzenleyen çok özel genlerin mutasyonları ve bunun sonucu değişen sinyal yolları da önemli yer tutar (27).

Kolorektal kanserli hastalarda prognostik faktörlerin bilinmesi erken evrelerde nüks riskinin belirlenmesi için, erken evre ve ileri evrelerde yaşam süresinin belirlenmesi açısından önemlidir. Kolorektal kanserde bir çok prognostik faktör tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlileri tanıda klinik evre, yapılan cerrahinin şekli (küratif /palyatif), tümör lokalizasyonu, patolojik evre ve tedavi şeklidir. Bunlarla beraber lokal nüks, progresyonsuz sağ kalım (PFS) ve genel sağkalımı (OS) etkileyen pek çok faktör belirlenmiştir (28).

Eskiden KRK yaşlılarda çok daha fazla görülürdü (29). Ancak son çalışmalarda genç popülasyonda KRK insidansının arttığı görülmektedir (30). Genç hastalar daha ileri evrede başvurmakta, daha kötü patolojik parametreler görülmekte ve çok daha agresif seyretmektedir (31).

2.2. Etiyoloji:

2.2.1. Genetik faktörler

Birinci ve ikinci derece akrabalarda kolon kanseri öyküsü sporadik kolon kanseri riskini arttırmaktadır. Birinci derece yakınında kolon kanseri tanısı olması riski 2 kat arttırmaktadır (32.) İlk tanının 60 yaşından önce olması riski daha belirgin şekilde arttırmaktadır. Benzer şekilde kolon kanseri tanısı alan hastanın yakınlarında premalign adenom insidansı da artmaktadır (33).

Genetik olarak riskli gruplar kolon kanseri ve adenomu açısından daha sıkı takip edilmelidir. Ancak bu genetik yatkınlığı tam olarak belirlemek zordur. Etilen tetrahidrofolat redüktaz ve N-asetiltransferaz özellikle NAT1 and NAT2 gibi genetik polimorfizmlerin varlığı genetik yatkınlık oluşturabilir (34,35).

2.2.2. Çevresel Faktörler

a-Diyet:

Total Kalori: Obesite ve artmış total kalori alımı kolorektal kanser için bağımsız risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Artmış vücut kitle indeksi erkeklerde kolon kanseri riskini 2 kat arttırırken rektum kanseri ile bu ilişki saptanmamıştır (36).

Et, Yağ ve Protein: Artmış kırmızı et tüketimi kolorektal kanser için risk faktörüdür. Kızartılmış ve işlenmiş etler özellikle rektal kanser riski ile ilişkilidir (37). Fazla proteinli diyet karsinogenezi arttırabilir ancak bununla ilgili kesin kanıt yoktur. Kırmızı ette bulunan yağlar kolonda bulunan bakteriler tarafından metabolize edilerek karsinojenik etki oluşturabilir. Yağların içeriği de önemlidir. Özellikle doymuş hayvansal yağların yüksek riskli olduğu gösterilmiştir (38).

Klasik olarak fiber, taze sebze ve meyvenin düşük kolorektal insidansı ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Yüksek fiber oranının kolon transit zamanını kısalttığı ve lümendeki karsinojenlerin konsantrasyonunu azalttığı kabul edilmektedir. Ancak yakın zamanda sonuçlanan geniş çaplı bir çalışmada bu ilişki gösterilememiştir (39).

b-Yaşam tarzı: Sedanter yaşam tarzı kolorektal kanser riskini arttırmaktadır ancak mekanizması bilinmemektedir. Yakın zamanlı çalışmalarda fiziksel aktivitenin evre I-III kolon kanserinde mortaliteyi ve nüksü azalttığı gösterilmiştir (40). Alkol kullanımı ile kolorektal kanser arasında minimal bir ilişki saptanmış ve rektum kanseri riskinin daha belirgin arttığı görülmüştür. Uzun süre sigara kullanımı artmış adenom ve kanser riski ile ilişkili bulunmuştur. Uzun süre çay ve kahve kullanımı ile kolorektal kanser arasında kesin bir ilişki saptanmamıştır.

c-İlaçlar: Populasyon temelli çalışmalar aspirin ve diğer nonsteroid antiinflamatuvar (NSAI) ilaçların adenom ve kanser riskinin azalttığını desteklemiştir. Bu etki kullanılan ilacın türünden bağımsızdır ve sağ kolon sola göre daha fazla fayda görmektedir (41).

Kolorektal kanser etyolojisinde etkili diyet ve çevresel faktörler

Riski arttıran faktörler	Riski azaltan faktörler
Yüksek kalorili diyet	Diyette yüksek fiber
Fazla et tüketimi	Antioksidan vitaminler
Fazla pişmiş et tüketimi	Taze meyve ve sebze
Doymuş yağ miktarının fazlalığı	NSAI ilaçlar
Fazla alkol tüketimi	
Sigara	
Sedanter yaşam	
Obezite	

2.2.3. Ailesel Kolorektal Kanser:

Famlyal Adenomatöz Polipozis (FAP): FAP kolorektal kanserlerin % 1'ini oluşturur. 30 yaşından önce kolonda yüzlerce hatta binlerce polip oluşur ve total kolektomi yapılmazsa %100 kolon kanseri gelişir. FAP'ta görülen benign kolon dışı bulgular; retinal pigment hipertrofisi, mandibular osteom, epidermal kist, adrenal adenom ve desmoid tümördür. Birlikte görülen maligniteler ise tiroid tümörleri, duodenum veya Ampulla Vateri kanseri ve

beyin tümörleridir. FAP otozomal dominant geçiş gösterir. Ancak hastaların %30' u de novo mutasyon gösterir ve bilinen aile öyküsü yoktur. Kromozom analizinde 5q21 de bulunan APC "adenomatozis polipozis coli" geninde mutasyon vardır (42).

Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC): HNPCC kolorektal kanserlerin yaklaşık %3' ünü oluşturur. Kolonda yaklaşık 100 kadar polip görülür. Ortalama kanser gelişme yaşı 43' tür. HNPCC tip I ve tip II formu vardır. Tip II de birlikte mide, ince barsak, safra yolları, renal pelvis, mesane, cilt, uterus ve over kanseri görülebilir. HNPCC' li hastalarda yaşam boyu kolorektal kanser gelişme riski %80, endometrium kanseri riski yaklaşık %40 ve diğer kanserlerin gelişme riski %10' dan azdır.

HNPCC otozomal dominant geçiş gösterir. DNA "mismatch repair" geninde mutasyon olduğu saptanmıştır (43).

2.3. Kolorektal kanser için tarama:

Tarama için kullanılacak en uygun yöntem hakkında tartışmalar devam etmektedir. Tarama yönteminin basit, hasta uyumu kolay, sensitif, spesifik ve kost efektif olması istenir. Şu anda optik kolonoskopi en efektif ve tercih edilen tarama yöntemidir.

Tarama için hastalar ortalama riske sahip ve yüksek riskli olarak iki gruba ayrılarak değerlendirilmelidir.

2.3.1. Ortalama riskli hastalar: Kendisinde ve ailesinde adenomatöz polip ve kolon kanseri öyküsü olmayan, gizli ve aşikar kanaması olmayan, 50 yaşın üzerinde kadın ve erkek bireyler olarak tanımlanır.

Bu hastalar için önerilen tarama metotlar:

1. Gaitada gizli kan (GGK) testi: Yıllık olarak yapılması önerilir. Ardışık 3 örnekleme ile yapılmalıdır. Pozitiflik saptandığında hastaya kolonoskopi yapılmalıdır.
2. Fleksibl Sigmoidoskopi: 5 yılda bir yapılması önerilir.

3. GGK testi ve Sigmoidoskopi: Yıllık GGK testi ve 5 yılda bir sigmoidoskopi kombinasyonu yapılabilir.

4. Kolonoskopi: 10 yılda bir yapılması önerilir.

2.3.2. Yüksek Riskli Hastalar:

1. Aile öyküsü : Birince derece yakınlarından birine (kardeş, anne, baba, çocuk gibi) 60 yaşından önce kolon kanseri veya adenomatöz polip tanısı konmuş kişiler veya birinci derece yakınlarından 2 kişiye herhangi bir yaşta kolon kanseri tanısı konmuş kişiler olarak tanımlanır. Bu hastalara 40 yaşında veya tanı konan aile bireyinin yaşından 10 yıl daha genç yaşta başlayarak 5 yılda bir kolonoskopi yapılması önerilir.

2. FAP: 10-12 yaşlarından başlayarak fleksibl sigmoidoskopi ve üst endoskopi yapılması önerilir.

3. HNPCC: 20-25 yaşlarında başlayarak 1-2 yılda bir kolonoskopi yapılmalıdır. Ayrıca uterus ve over kanseri açısından da tarama yapılmalıdır.

4. Adenomatöz polip saptanan kişiler:

a. Bir veya daha fazla büyük ve sesil polip, malignite saptanmışsa veya kolonoskopi optimal yapılamamışsa kısa süre sonra kolonoskopi tekrarlanmalıdır.

b. Üç veya daha fazla polip saptanmışsa 3 yıl içinde kolonoskopi yapılmalıdır.

c. Bir cm'den küçük 1-2 polip saptanmışsa 5 yıl sonra kontrol kolonoskopi yapılmalıdır.

5. Kolorektal kanser tanısı olan hasta:

a. Tanı anında yapılan kolonoskopi obstrüksiyon nedeniyle tamamlanamamışsa cerrahiden sonra 6 ay içinde tekrarlanmalıdır.

b. Tanıda kolonoskopi yapılmışsa 3 yıl içinde kontrol yapılmalı, eğer normale sonraki kontrol 5 yıl sonra yapılmalıdır (44).

2.4. Evreleme

KRK evrelendirilmesi ilk defa 1930 yılında Dukes tarafından yapılmıştır. 1954 yılında Dukes sınıflaması gözden geçirilerek modifiye edilmiştir. Amerikan Kanser Birliği [American Joint Committee on Cancer (AJCC)] ve Uluslararası Kanser Birliği [Union Internationale Contrele Cancer (UICC)] TNM evreleme sistemini geliştirmişlerdir (45). TNM evreleme sistemine göre değerlendirildiğinde kolon ve rektum kanserleri evrelerine göre benzer sağkalım gösterdikleri için ikisi için de aynı evreleme sistemi kullanılmaktadır (46). AJCC tarafından önerilen ve 2010 yılında güncellenen patolojik TNM evreleme sistemi ve evrelere özgü beş yıllık sağ kalım oranları tabloda özetlenmiştir (Tablo 1 ve 2).

Primer Tümör Boyutu (T)

Tx: Primer tümör değerlendirilemedi

T0: Primer tümör ile ilgili kanıt yok

Tis: Karsinoma in-situ

T1: Tümör submukozaya invaze

T2: Tümör muskularis propriaya invaze

T3: Tümör muskularis propriadan perikolorektal dokulara uzanım göstermekte

T4a: Tümör visseral periton yüzeyine kadar uzanmış

T4b: Tümör komşu organ ve dokulara invaze

Bölgesel Lenf Nodları (N)

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: Bir-üç lenf nodu metastazı var

N1a: Bölgesel bir lenf nodu metastazı

N1b: Bölgesel iki-üç lenf nodu metastazı

N1c: Bölgesel lenf nodu metastazı olmadan non-peritonize perikolik veya perirektal dokularda veya subserozal, mezenterik tümör depozit(ler)i varlığı

N2: Dört veya daha fazla lenf nodu metastazı

N2a: Bölgesel dört-altı lenf nodu metastazı

N2b: Bölgesel yedi veya daha fazla lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz (M)

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

M1a: Bir organ veya bölgede (örn; karaciğer, akciğer, bölgesel olmayan lenf nodu) metastaz

M1b: Birden fazla organ/bölge veya periton metastazı var

Tablo-1. Kolorektal Kanserde TNM evreleme sistemi

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

Tablo-2. SEER programı 2010 verilerine göre evreye göre 5 yıllık rölâtif sağ kalım oranları (47).

Evre	5 yıllık sağkalım oranları (%)
I	97.1
IIA	87.5
IIB	71.5
IIIA	87.7
IIIB (T1-T2, N2)	75
IIIB (T3, N1)	68.7
IIIC (T3, N2)	47.3
IIIC (T4, N1)	50.5
IIIC (T4, N2)	27.1

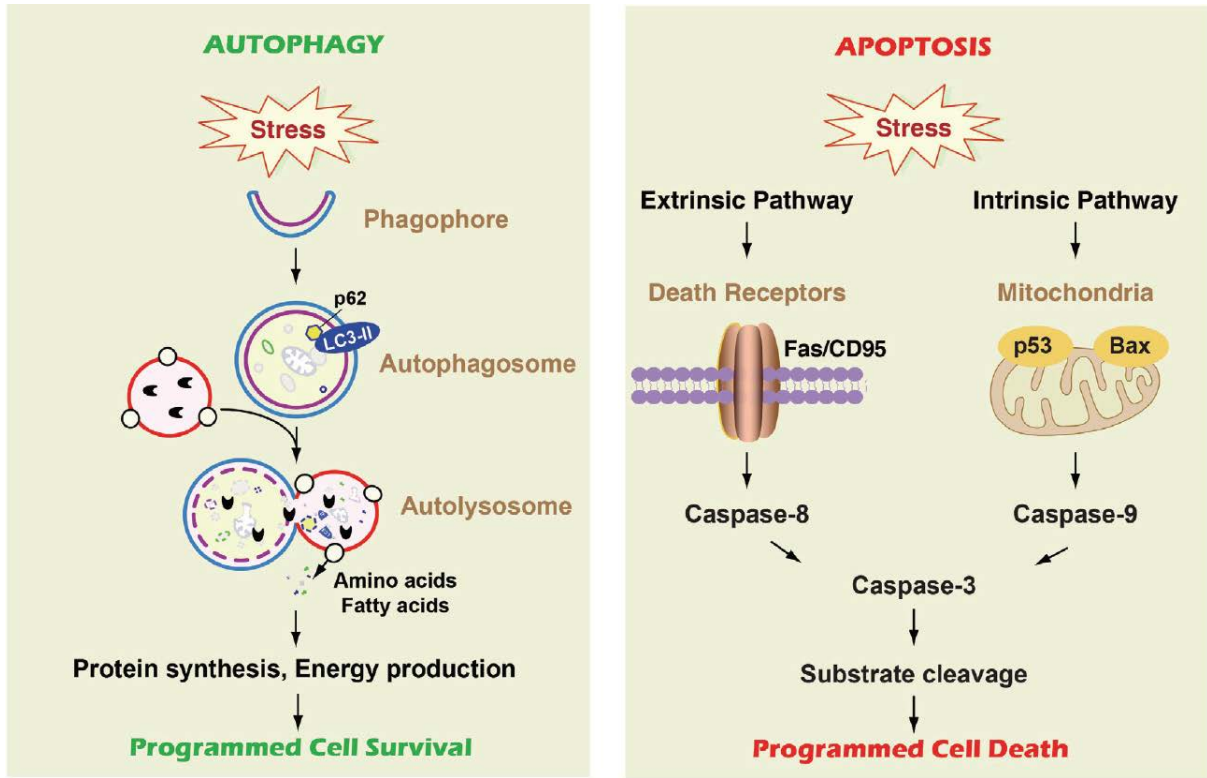
2.5. Programlı Hücre Ölümü Modelleri

Programlı hücre ölümü modelleri 1990' lı yıllarda Clarke tarafından üç ayrı grupta tanımlanmıştır. Apoptozis tip I, Otofaji tip II, lizozomal olmayan hücre ölümü tip III hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (48).

2.5.1. Apoptozis: Programlı hücre ölümü mekanizması olarak en iyi bilinen model olan apoptozisde hücre büzüşmesi ve kromatin yoğunlaşması oluştuktan sonra Kaspaz adı verilen proteazlar aracılığı ile hücre DNA'sı ve diğer proteinler parçalanarak apoptotik cisimler oluşturulur. Bu apoptotik cisimler diğer hücreler tarafından fagosite edilerek ortamdan uzaklaştırılır (48).

2.5.2. Otofaji: Otofaji kendi kendini yeme anlamına gelir ve hücrelerin fizyolojik koşullarda açlık durumunda besin elde etmek için hücre içindeki yapıları parçalaması anlamında kullanılmaktadır. Böylece hücre içi moleküllerin geri dönüşümü sağlanmakta ve homeostazis korunmaktadır (49).

Apoptozis ile Otofaji arasında temel bazı farklar şekil 1 de gösterilmiştir.



Şekil 1: Apoptozis ve Otofaji arasında farklar. (50)

Programlı hücre sürviyi olarak da adlandırılan otofaji, hücrel homeostasis, enerji dengesi, gelişme ve hücrel defans gibi normal insan fizyolojisinin devamı için kritik öneme sahiptir (51,52). Aynı zamanda otofaji iki tarafı keskin kılıç gibidir. Kanser, nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma, kas hastalıkları, enfeksiyon hastalıkları ve immün sistem hastalıklarının patogeneğinde de rol oynayabilir (53,54).

Hücre içinde oluşan atıklar ve biriken maddeler asit hidrolaz enzimi içeren lizozomlar aracılığı ile parçalanırlar. Otofaji, hasarlanmış organeller ve uzun ömürlü sitoplazmik proteinlerin lizozomlar aracılığı ile ortamdan uzaklaştırılmasını sağlar (55).

Hücre içerisinde bazal düzeyde otofaji, protein ve organellerin döngüsü ile homeostazise katkıda bulunurken, artan hücrel stres durumunda hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bir mekanizmadır (53). Kanser ile otofaji ilişkisi hala oldukça tartışmalıdır. Otofaji, kanser gelişimi esnasında tümör supresör etki gösterirken, kanserin progresyonu esnasında kanser hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunmaktadır (56).

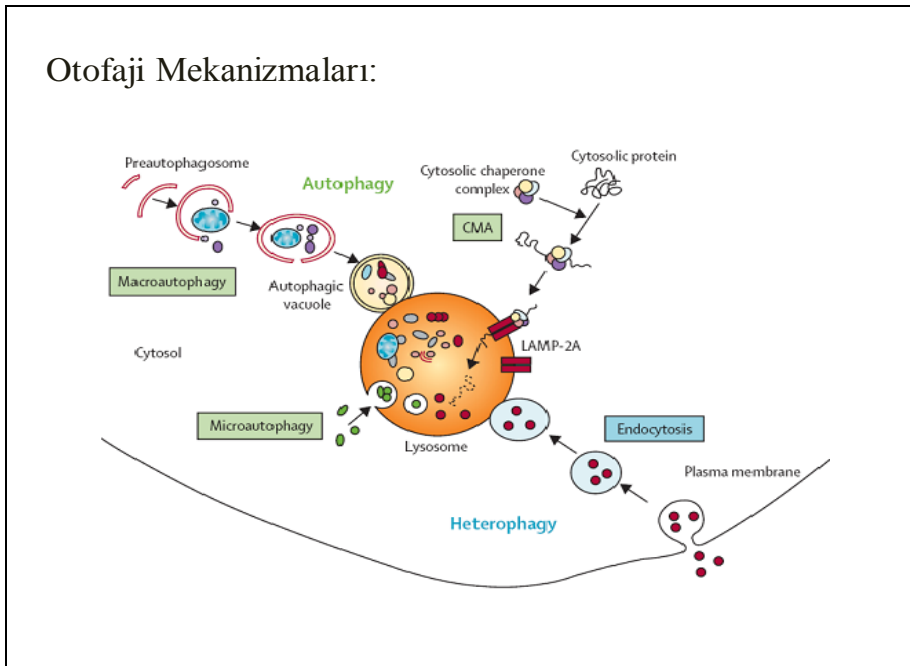
Kanser tedavisindeki yeni gelişmelere rağmen, bir çok kanser türünde kemoterapi ve radyoterapiye yeterli yanıt alınmamakta ve tedaviye rağmen progresyon gelişmektedir (57).

Kanser tedavisi esnasında hem normal hücrelerde hem de kanser hücrelerinde otofaji artmaktadır. Fakat normal hücrelerden ziyade kanser hücreleri hayatta kalmak için otofajiyi daha fazla kullandıkları için bu durum yeni tedavi fırsatları oluşturabilir (58).

En az üç ayrı otofaji mekanizması tanımlanmıştır (59). Bunlar:

1. Makrotofaji: Protein ve hasarlanmış hücre organellerinin parçalanmasını sağlar. Otofagozom oluşumu ile gerçekleşir.
2. Şaperon aracılı otofaji: Sitoplazmada işaretlenen proteinler lizozoma taşınır.
3. Mikrotofaji: Lizozom membranının invaginasyon, protrüzyon ve septasyonu ile gerçekleşir.

Şekil 2'de otofaji mekanizmaları gösterilmiştir.



Şekil 2. Otofaji Mekanizmaları (59).

Otofaji dendiğinde genel olarak makrotofaji kastedilmektedir. Otofaji ile bağlantılı proteinler (autophagy related proteins; Atg proteinleri) ilk olarak mayalarda yapılan araştırmalarda saptanmıştır. Günümüzde 30'dan fazla Atg geni tanımlanmıştır (60).

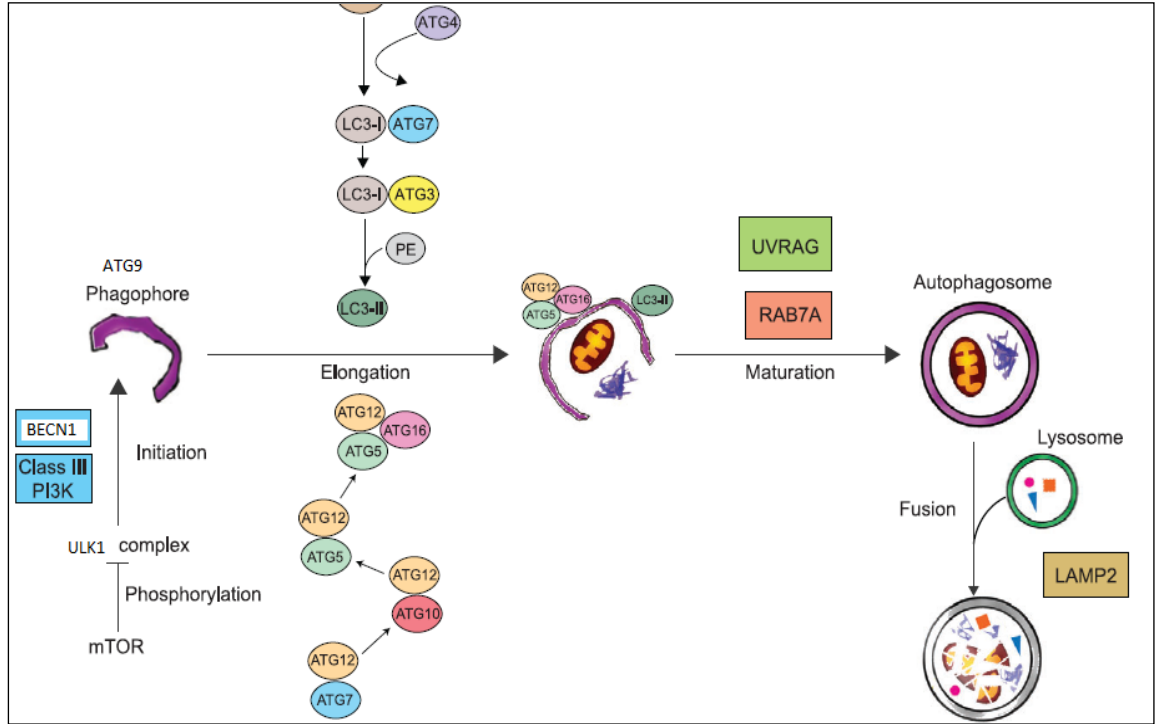
Otofajik yıkım işlemi 4 fazda gerçekleşir (şekil 3).

I- İndüksiyon fazı: Besin, oksijen, hormonlar, büyüme faktörleri ve enerji azlığı durumlarında, kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinin uygulanması nedeniyle oluşan hücrel stres algılanmasında işe karışan sinyal kaskadları aracılığıyla başlar.

II- Elongasyon fazı: Otofagofor olarak bilinen izolasyon membranı sitoplazma veya organellerin bir kısmını çevreler ve böylece otofagozom denen çift membranlı yapıyı oluşturur.

III- Maturasyon ve füzyon fazı: Dış membran endozom ya da lizozom ile birleşir ve otolizozom oluşumu ile sonuçlanır.

IV- Degradasyon fazı: İç membran, protein ve organel içeriği (otofajik cisim) lizozom enzimleriyle yıkılır ve yeniden sıklusa girer (61).



Şekil 3. Otofaji basamakları: Otofajik kese oluşuktan sonra uzamaya başlar. Uzama sonrasında ise geç endozom veya lizozom ile birleşerek taşıdığı yapıların parçalanmasını sağlar, yıkım sonrası açığa çıkan aminoasit ve yağ asitleri gibi yapıtaşları tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılmış olur (61).

2.5.3. Otofajinin düzenlenmesi:

Otofaji regülasyonunda en önemli uyarılar açlık, hipoksi ve stres durumlarıdır. Memelilerde rapamycin hedefi (mTOR) bir serin tirozin kinazdır. Hücrelerde bol miktarda eksprese olur ve hücrenin büyümesinde, proliferasyonunda ve hayatta kalmasında rol almaktadır. Bunların yanı sıra kanser hücrelerinin kontrolsüz şekilde büyümesinde de rol aldığı düşünülmektedir. TOR protein kompleksi otofajinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. TOR, hücrelerde büyüme ve protein sentezini kontrol eden bir kinazdır. TOR'un

baskılanması otofajinin aktive olmasına neden olur. Açlık durumunda TOR aktivitesi düşer, Atg13 defosforile olur, Atg1 ile bağlanarak otofajiyi indükler (62).

PI3K kompleksi de hücre büyümesinde etkili sinyal yollarındandır ve Akt/PKB yolağını aktive eder. Akt'nin aktivasyonu TOR'u aktive ederek otofajiyi inhibe eder (63,64).

PTEN ise PI3K/Akt yolağı ile tam tersi bir işleve sahiptir ve otofajiyi indükler. PTEN'de oluşan mutasyonlar otofajiyi baskılamaktadır (65). PI3K kompleksi Atg6 (beclin-1), Atg14, Vp15 ve Vps34 proteinlerinden oluşmaktadır, bu kompleks PI3K bağlayıcı protein ile otofajik keseciğin oluşumunu başlatmaktadır. 3-metil adenin (3-MA) PI3K'nın inhibitörüdür ve otofajiyi inhibe etmek üzere yaygın olarak kullanılır (66).

2.5.4. Otofaji üzerinde etkili olan moleküller:

Akt/PKB ve TOR yolağı: Otofajinin regülasyonunda en önemli yolağıdır. TOR yolağının aktivasyonu hücre büyümesi ve sağ kalımını sağlarken inaktive olması otofajiye yol açar. mTOR yolağı Akt/PKB yolağı ile kontrol edilir. Akt/PKB'nin aktivasyonu otofajinin inhibisyonuna yol açar (67,68). Akt/PKB aktivasyonu aynı zamanda NF-kB yolağı üzerinden apoptozisi de bloke eder (69,70).

Bcl-2 ve Bcl-XL: Anti-apoptotik proteinlerdir, hem apoptozisi hem de otofajiyi inhibe ederler. Beclin-1 üzerindeki BH3 bölgesine bağlanarak otofaji keseciği oluşumunu engellerler (71,72).

Atg4D, Atg5 ve Beclin: Bu proteinlerin proteolize uğraması apoptozisi indüklemektedir. Bu şekilde bazı otofaji proteinlerinin apoptoz yolları tarafından da kullanıldığı saptanmıştır (73,74).

p53: Apoptozisi uyarıcı etkisi olan p53; Bax, PUMA ve NOXA gibi pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunu arttırır ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinleri ise azaltır (75). p53'ün aktivasyonu mTOR yolağının inhibisyonuna ve sonuçta otofajinin aktivasyonuna yol açar (76). Çekirdekdeki p53'ün otofajiyi arttırdığı, sitoplazmik p53'ün ise azalttığı gösterilmiştir (77).

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve Atg4: Hücre içinde ROS yüksekliği apoptozisi uyarırken düşükliğinde hücre büyümesi ve sağkalımı arttırır. ROS, Atg4'ü okside ederek otofaji üzerindeki etkilerini gösterir. Okside Atg4 inaktive olur ve otofagozom oluşumu baskılanır (78).

2.5.5. Tümörögenizde otofajinin rolü:

Beclin-1 otofajinin başlangıç aşaması olan çift zarlı otofagozom oluşumu için temel otofaji proteindir ve BECN 1 geni tarafından kodlanmaktadır. Diğer otofaji proteinleri Vps34, p150, UVRAG, Bif1, Atg14L, Rubicon'un oluşturduğu büyük protein kompleksi Beclin-1 ile etkileşerek otofagozom oluşumunu sağlarlar (79,80).

BECN 1 mutant farelerde neoplastik lezyonlar, hepatosellüler karsinom, akciğer adenokarsinomu, B hücreli lenfoma gibi malignitelerin oranında artış gösterilmiştir (66,81).

Ayrıca meme, over ve prostat kanserlerinde otofaji regülasyonu için gerekli olan beclin1'in monoallelik delesyonu ve bazı meme kanserlerinde beclin 1 düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (82,83).

Anjiyogenezisin yetersiz olduğu zamanlarda hipoksik tümör bölgelerinde otofaji aktive olur ve tümör hücrelerinin canlılığının devam etmesini sağlar. Besin yetersizliği durumunda otofajinin bu rolü hücrenin besin, oksijen ve büyüme faktörleri tekrar uygun hale gelene kadar zaman kazanmasını sağlar. Dolayısıyla otofaji tümör devamlılığı için gerekli bir mekanizma olarak görülmektedir (84).

Otofaji sadece açlık döneminde enerji kaynağı üreten bir mekanizma değildir, aynı zamanda hasarlanmış hücre içi organel ve proteinlerin de kontrolünü sağlar. Otofaji sayesinde hasarlanmış, toksik olabilecek protein ve organellerin hücre içinde birikmesi ve hücreye zarar vermesi engellenmiş olur. Bu durum özellikle tümör hücreleri gibi etkin olmayan aerobik glikoliz yapan ve hızlı tümör büyümesi ve metastaz nedeniyle kan akımı desteği her zaman uygun olmayan hücreler için kritik öneme sahiptir. Dokular ve tümördeki otofaji bozuklukları hücresel sağlamlılığı bozar ve hücrelerde DNA hasarı, mutasyon ve genomik instabiliteye olanak sağlar, sonuçta tümör oluşumu ve progresyonuna katkıda bulunur (58,85,86). Bu gözlemler otofaji uyarılmasının kanser oluşumunu önleyebileceğini, otofaji aracılı sağkalımın inhibisyonunun ise agresif kanserlerin tedavisinde yeni bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir.

2.5.6. Otofaji ve apoptozis arasındaki hücresel düzeyde ilişki.

Atg3, Atg5, Atg7 ve Atg9 gibi otofaji genlerinde mutasyon ya da delesyon olan farelerde yapılan deneyler otofajinin besin yokluğunda hücresel yaşam için önemini ortaya koymuştur. Bu farelerde besin yokluğunda otofajinin uyarılmadığı ve doğumdan kısa süre sonra öldükleri görülmüştür. Otofajinin açlık durumunda hücre içindeki proteinleri yıkarak enerji geri dönüşünü sağladığı ve apoptozisi engellediği bir çok çalışmada gösterilmiştir (87). Otofaji; apoptozise paralel olarak hücre ölümüne yol açabildiği gibi, apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir ya da apoptoz için bir ön koşul olabilir (88).

Bazı durumlarda otofaji ve apoptozis hücrede birbirine zıt etkiler yapabilmektedir. Bu durumda, otofaji hücre ölümüne karşı bir hayatta kalma mekanizması olarak çalışarak, apoptozisin durdurulmasına ve ölümün engellenmesine yol açmaktadır. Otofaji, metabolik stres, ilaç ya da radyasyon hasarıyla karşı karşıya kalan hücrede anormal ve hasarlı proteinlerin yok edilmesinde ve DNA'nın hasardan korunmasında önemlidir. Otofaji yokluğunda tümör hücrelerinde DNA hasarı, gen amplifikasyonu ve kromozomal anormallikler artmaktadır (89).

Otofajinin hem karsinogenezisde hem de kanser hücrelerinin sağ kalımında önemli rol oynadığı anlaşılmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçlar ve hedefe yönelik ilaçların otofajiyi indüklediği bilinmektedir. Bu nedenle otofajiyi bloke etmek veya indüklemek kanser tedavisinde önemli avantajlar sağlayabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmaya 2001-2010 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında kolorektal kanser tanısı konmuş ve Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı tarafından takip ve tedavisi yapılmış 89 hasta alındı. Gaziantep Üniversitesi Etik Kurulu'ndan 16.10.2012/388 tarih ve sayı numarası ile etik kurul onayı alındı.

Çalışmaya alınan hastaların demografik (yaş, cinsiyet), patolojik özellikleri (tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, histolojik tip, diferansiyasyon, vasküler ve perinöral invazyon, lenf nodu tutulumu), klinik evre, takip süresi ve sağkalım süreleri Medikal Onkoloji Bilim Dalı tarafından oluşturulan dosya ve Patoloji Anabilim tarafından arşivlenen kayıtlardan retrospektif olarak taranarak kaydedildi.

Çalışmaya uygun 89 hastanın parafin blokları ve preparatları Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden elde edildi. Olguların preparatları ışık mikroskopunda yeniden değerlendirildi. Her bir olgu için karsinom alanları ve normal kalın barsak mukozasını içeren lamaların ait olduğu parafin bloklar seçildi.

3.2. Yöntem:

3.2.1. Gen ekspresyonu:

Parafine gömülü doku örneklerinden "Qiagen FFPE" RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA elde edildi. Bunun için, 15ml'lik falcon tüpler hazırlanarak dokular tüplere konuldu. Örnek numunenin 5 katı kadar "Buffer EL" eklenerek 10-15 dakika buzda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan alındıktan sonra 2500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Dipteki pellete dokunmadan üstteki kısım yavaşça dökülerek bu sefer ilk başta koyduğumuz örnek miktarının 2 katı kadar "Buffer EL" koyup hafifçe vortex yapıp pelletin dağılması sağlanarak 2500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Dipteki pellete dokunmadan üstteki kısım hafifçe dökülüp, daha önceden hazırlanan β mercapto ethanol solüsyonundan 600 μ l eklendi. Pellet iyice sıvı hale gelinceye kadar pipetaj yapıldı. Karışım mor renkli spin kolonlara

aktarılarak yüksek devirde 2 dakika santrifüj edilip üstteki filtrelili olan spin kolon atılarak, alttaki karışımın olduğu "collection" tüpün içerisine ilk başta β mercapto etanol solüsyonundan ne kadar konduysa o kadar %70' lik alkol eklendi ve pipetaj ile karıştırıldı. Daha sonra karışımdan 600 μ l alarak beyaz renkli spin kolonlara aktarılıp, 10000 rpm' de 15 saniye santrifüj edilerek alttaki sıvı kısım dökülüp tekrardan kalan kısmı da spin kolona aktarıldı ve yine 10000 rpm' de 15 saniye santrifüj edilerek alttaki kısım atılıp spin kolonlar yeni 2 ml' lik "collection" tüplere alındı. Spin kolon üzerine 700 μ l Buffer RW1 eklenerek 10000 rpm' de 15 saniye santrifüj edilip, alttaki kısım atılarak spin kolonlar yeni 2 ml' lik "collection" tüplere alındı. Spin kolon üzerine 500 μ l Buffer RPE eklenip 10000 rpm' de 15 saniye santrifüj edilerek, alttaki kısım atılıp spin kolonlar yeni 2 ml'lik "collection" tüplere alındı. Spin kolon üzerine 500 μ l Buffer RPE eklenerek 12000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek, alttaki kısım atılarak spin kolonlar yeni 2 ml' lik "collection" tüplere alındı. Spin kolona hiçbir şey koymadan boş olarak 14000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilerek spin kolonlar 1.5 luk ependorf tüplere alındı. Spin kolon üzerine 40 μ l Rnase free water eklenerek 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen RNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ile derişimi ise nanodrop spektrofotometresi ile ölçüldü. İzole RNA sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -85 $^{\circ}$ C'de saklandı. Nano teknoloji temelli yüksek kapasiteli Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) ile gen ekspresyon çalışması BioMark™ HD System ile yapıldı.

3.2.2. cDNA elde edilmesi:

Gerçekleştirilen çalışmada cDNA'lar "Qiagen miScript Reverse Transcription Kit" kullanılarak sentezlendi. PCR koşulları ve PCR karışımı, kullanılan Kit'de belirtildiği şekilde yapıldı.

miScript RT Buffer, 5x	4 μ l
miScript Reverse Transcriptase Mix	1 μ l
RNase/DNase free su	5.0 μ l
RNA örneği	10.0 μ l
Toplam hacim	20 μ l

cDNA sentezi, 37°C'de 60 dakika , 95 °C'de 5 dakika olacak şekilde "AB Applied Biosystems 96-Well Thermal Cycler" cihazı kullanılarak cDNA yapıldı.

3.2.3. RT- PCR çalışması:

Nano teknoloji temelli yüksek kapasiteli Real Time PCR ile gen ekspresyonu çalışması BioMark™ HD System ile yapıldı. Gen ekspresyonu analizi için cDNA'lar pre-amplifikasyona edildi.

Pre-amplifikasyon mix:

Qiagen Multiplex PCR Mix	5 µl
Primer Pool	1 µl
DNase RNase İçermeyen Su	1.5 µl

Pre-amplifikasyon mixi hazırlanarak, plate pipetlendi, üzerlerine cDNA eklenerek uygun PCR koşulları AB Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler cihazı kullanılarak uygulandı.

PreAmp Thermal Program

15 dakika	95°C	} 14 döngü
15 saniye	95°C	
4 dakika	60°C	
∞	4°C	

Otofaji ailesinin 94 bölgesine ait primerler özel olarak tasarlandı ve IFC Controller HX ve BioMark™ HD System kullanılarak Real-time PCR yapıldı.

Otofaji gen ekspresyonu analizi için tasarlanan 94 primer ayrı chiplerde çalışıldı. Örnek ve Assaylar için iki farklı mix hazırlandı.

3.2.4. Örnek ve PCR karışımı:

Master Mix, 2x	366.60 µl
20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent.....	36.60 µl
EvaGreen	36.60 µl
0.1xTE Buffer.....	55.20 µl

Hazırlanan mixe dilüe edilmiş pre-amplifikasyona cDNA'lar eklendi ve chipe pipetlendi.

3.2.5. Analiz:

Otofaji gen ekspresyon Primer Plate'inden primerler alınarak chipe yüklendi.

Chip assay ve örneklerin chipte bulunan kuyucuklara giderek karışması ve RT PCR'a hazır hale getirilmesi için BioMark IFC Controller HX (S/N: HX 10132) cihazına yerleştirildi.

BioMark IFC Controller HX' de işlem bittikten sonra BioMark™ HD System (S/N: 104)'ine chip yerleştirildi ve uygun PCR koşulları uygulandı.

Her bir assay her bir örnek için ayrı ayrı analiz edildi. Örneklerin her bir assay'de oluşturdukları pikler, Ct değerleri ve kopya sayıları ayrı ayrı analiz edilerek istatistikî hesaplamalar yapıldı.

Bakılması planlanan gen primerleri tablo 3'te belirtilmiştir.

Tablo 3: Otofaji ile ilgili ekspresyonu araştırılan hedef genlerin listesi (alfabetik sıra ile)

Gen adı	Gen adı	Gen adı	Gen adı
AKT1	BALC2	HSPA8	RAPGEF1
AMBRA1	BLC3L1	HTT	REPGEF2
ATG10	BNIP3	IFNA2	RAPGEF3
ATG11	CAP3	IFNG	RAPGEF4
ATG12	CASP3	IGF1	RAPGEF5
ATG13B	CLN3	INS	RAPGEFL1
ATG14	CTSB	IRGM	RB1
ATG16L1	CTSS	LAMP1	RGS19
ATG16L2	CXCR4	LAMP2	RPL13A
ATG18	DAPK1	LAMP3	RPS6KB1
ATG2B	DRAM1	MAP1LC3A	SNCA
ATG3	DRAM2	MAPK14	SQSTM1
ATG4A	EIF2AK3	MAPK3	TGFB1
ATG4B	EIF4G1	PIK3C3	TMEM74
ATG4C	ESR1	PIK3R4	TNF
ATG4D	FADD	PTEN	TP63
ATG5	FAS	RAB11B	TP73
ATG7	GAA	RAB24	ULK1
ATG9A	GABARAPL1	RAB7A	ULK2
ATG9B	GABARAPL2	RAP1A	UVRAG
BAD	GAPDH	RAP1B	VSP15
BAX	HDAC1	RAP2A	WIF4G1
BECN1	HGS	RAP2B	
BID	HPRT1	RAP2C	

Çalışma İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı-Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı ve Patoloji Ana Bilim Dalı tarafından ortak yürütüldü.

3.3. İstatistiksel analizler

Fluidigm Dynamic Array ile BioMARK HD Sistemi'nde yapılan gen ekspresyonu için Real-time PCR ölçümleri Biogazelle qBasePLUS real-time PCR veri-analizi yazılımı ile değerlendirildi. ACTB "housekeeping gen" olarak hedeflerin normalizasyonunda kullanıldı.

Verilerin analizinde kullanılan Mann Whitney testinde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak incelenmiştir. Mann-Whitney testi ortalamaları karşılaştırırken dağılımları da incelemektedir. Assay'de ölçümü yapılan örnek sayısını ifade eden “*datapoints*” 12'nin altına düştüğünde anlamlılık testi oldukça hassaslaşmakta ve ortalamalardan ayrı olarak testin istatistiki anlamlılığı için incelenen dağılım büyük ihtimalle standart bir eğri oluşturamayacak kadar az bulunmaktadır. Bu yüzden testin anlamlılık düzeyini ifade eden p değeri bu gruplarda oldukça yüksek olacak ve istatistiksel olarak anlamlı bir karşılaştırma ifade edilemeyecektir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik, Klinik ve Patolojik Bulgular

Çalışmaya KKK tanısı patolojik olarak kanıtlanmış 34'ü kadın 55'i erkek toplam 89 hasta alındı. Erkek / Kadın oranı 1.61 idi. Hastaların tanı sırasında yaş ortalaması 61.3 ± 14.9 (24-86) yıl olarak saptandı. Hastaların genel demografik, klinik ve patolojik özellikleri tablo 4'te verilmiştir.

Tablo-4. Hastaların genel demografik, klinik ve patolojik özelliklerine göre dağılımı

		n	%
Cinsiyet			
	Kadın	34	38.2
	Erkek	55	61.8
Lokalizasyon			
	Rektosigmoid	9	10.1
	Rektum	11	12.4
	Sigmoid	16	17,9
	Sağ Kolon	31	34.8
	Sol Kolon	11	12.4
	Transvers Kolon	11	12.4
Histoloji			
	Adenokarsinom	83	93.2
	Müsinöz karsinom	6	6.8
Vasküler invazyon			
	Negatif	75	84.3
	Pozitif	14	15.7
Perinöral invazyon			
	Negatif	82	92.1
	Pozitif	7	7.9
Diferansiasyon			
	Düşük grade (iyi-orta diferansiye)	83	93.3
	Yüksek grade (az diferansiye)	6	6.7
Lenf nodu tutulumu			
	Negatif	49	55.0
	Pozitif	40	45.0
Tümör boyutu			
	6 cm'den büyük	45	50.5
	6 cm ve altı	44	49.5
Nüks durumu			
	Nüks var	11	12.4
	Nüks yok	78	87.6

Hastalar TNM evrelemesine göre dağılımı Tablo 5' te gösterilmiştir.

Tablo 5. Hastaların TNM evresine göre dağılımı

Evre	n	%
Evre I	9	10.1
Evre II	31	34.8
Evre III	22	24.7
Evre IV	27	30.4
Toplam	89	100

4.2. Genetik bulgular

4.2.1. Genel açıklamalar

“Fluidigm Dynamic Array” ile BioMARK HD Sistemi'nde yapılan gen ekspresyonu için Real-time PCR ölçümleri Biogazelle qBasePLUS real-time PCR veri-analizi yazılımı ile değerlendirildi. ACTB "housekeeping gen" olarak hedeflerin normalizasyonunda kullanıldı. Patolojik verilere göre ve örnek özelliklerine göre 89 hastanın tümör ve non-karsinom dokularından elde edilen örneklerden BioMark Real Time-PCR cihazı ile gen ekspresyonu analizi çalışması yapıldı.

Testlerde Otofaji plağından toplam 94 genin anlatım düzeyi bu gruplarda karşılaştırılmıştır. Bu 94 genin ifadesi ACTB geni ifadesine göre normalizasyonu sağlanarak değerlendirilmiştir.

4.2.2. Tümör Dokusu ile Normal Dokunun Karşılaştırması

89 hastanın tümör dokusundaki gen ekspresyonu bu hastaların normal kolon dokularındaki gen ekspresyonu ile karşılaştırılmıştır. Karsinom ve normal kolon doku örnekler arasındaki ortalama farkının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı %95 güven aralığında Mann-Whitney yöntemi ile araştırılmıştır. 47 gen açısından tümör dokuları ve normal kolon dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir fark bulunduğu saptanmıştır (Tablo 6).

Tablo 6: Normal dokuya göre tümör dokusunda anlamlı derecede yüksek saptanan genler.

Gen Adı	P	Gen adı	p
CAP3	0.0001	RAPGEF4	0.006
RAP2C	0.0001	ESR1	0.012
MAP1LC3B	0.0001	IFNG	0.012
RPL13A	0.0001	RGS19	0.013
RAP1A	0.0001	AKT1	0.015
IFNA2	0.0001	TGFB1	0.016
HAPA4	0.0001	MAPK14	0.017
RAB7A	0.0001	ULK1	0.017
TMEM74	0.0001	ATG7	0.021
RAP1B	0.0002	MAPK3	0.021
GABARAPL1	0.0004	PIK3C3	0.022
RAPGEF3	0.0004	BAD	0.022
ATG2B	0.0006	GAPDH	0.023
IRGM	0.0006	RB1	0.03
TP73	0.0006	ATG10	0.032
LAMP2	0.0007	ATG9B	0.032
BLC2	0.001	RAP2B	0.032
CASP3	0.001	RAPGEF2	0.032
EIF2AK3	0.001	GABARAPL2	0.035
INS	0.002	FADD	0.036
PTEN	0.002	UVRAG	0.036
ATG11	0.003	CXCR4	0.049
FAS	0.003	BLC3L1	0.049
BID	0.003		

Gen anlatımı ortalamaları tümör/non-karsinom ortalaması şeklinde CNRQ (kalibre ve normalize edilmiş rölatif kantitasyon) verilmiştir. Bu durumda payda non-karsinom ve değer olarak 1 kabul edilirse grafik tümör dokusundaki gen ekspresyonunun kaç kat azalıp arttığını göstermektedir. Grafiğin ortalamayı gösteren y-ekseni log2 tabanında gösterilmiştir, böylece artış ve azalışlar daha kolay görülebilmektedir (Şekil 6).

4.2.4. Lokalizasyon Karşılaştırmaları

Lokalizasyon verileri ile oluşturulan 6 grup arasında incelenen 94 gende 5 grupta gen ifadesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Sadece sağ kolon tümör ve normal doku örnekleri %95 güven aralığında bu 94 genin anlatımı açısından karşılaştırıldığında IFNA2 geni açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$).

4.2.5. Histoloji Karşılaştırmaları

Kanser dokularının histolojik tipleri ile ilgili verilerinin karşılaştırılması için oluşturulan gruplardaki hasta sayıları; adenokarsinom; 83 hasta, müsinöz karsinom; 6 hasta şeklindeydi.

Adenokarsinom ile müsinöz karsinom grupları arasında gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

4.2.6. Perinöral İnvazyon Karşılaştırmaları

Kanser dokularının perinöral invazyon durumu ile ilgili verilerinin karşılaştırılması için oluşturulan gruplardaki hasta sayıları perinöral invazyon pozitif olan 7 hasta ve perinöral invazyon negatif olan 82 hasta karşılaştırıldı.

Perinöral invazyon gösteren hastaların tümör dokuları ile perinöral invazyon göstermeyen hastaların tümör dokuları arasında gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı dağılımları da dikkate alan Mann-Whitney testi ile araştırıldı. Bu testte iki tümör grubu arasında taranan hedefler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0.05$), burada da neden yine perinöral invazyonu pozitif bireylerin sayıca yetersizliği olabilir.

4.2.7. Vasküler İnvazyon Karşılaştırmaları

Kanser dokularının vasküler invazyon durumu ile ilgili verilerinin karşılaştırılması için oluşturulan gruplarda vasküler invazyonu olan 14 hasta ve vasküler invazyonu olmayan 75 hasta değerlendirildi.

Hastalarda tümör dokularının vasküler invazyon durumuna göre gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

4.2.8. Lenf Nodu Tutulumu Karşılaştırmaları

Lenf nodu tutulumları ile ilgili verilerinin karşılaştırılması için oluşturulan gruplardaki birey sayıları; lenf nodu tutulumu pozitif 40 hasta ve lenf nodu tutulumu negatif 49 hasta olarak karşılaştırıldı.

Lenf nodu tutulumu gösteren bireylerin tümör dokuları ile lenf nodu tutulumu göstermeyen bireylerin tümör dokuları arasında gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$).

4.2.9. Diferansiyasyon Karşılaştırmaları

Hastalar, tümör diferansiyasyonuna göre gruplandırıldığında; Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nun yeni sınıflamasına göre 6 hasta yüksek grade'li (az diferansiye), 83 hasta düşük grade'li (iyi-orta diferansiye) olarak 2 gruba ayrıldı.

Az diferansiye grupta hasta sayısı yetersiz olduğu için iki grup arasında istatistiksel değerlendirme yapılamadı.

4.2.10. Cinsiyet Karşılaştırmaları

Kanser hastalarından, 34 kadın hasta ve 55 erkek hastanın tümör dokularından elde edilen gen ekspresyonu verilerinin karşılaştırılması sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$).

4.2.11. Tümör Boyutu Karşılaştırmaları

Tümör boyutu ortalaması 6 cm olarak tespit edildi ve buna göre tümör boyutu 6 cm ve altı olan 44 hasta ile tümör boyutu 6 cm'in üstünde olan 45 hastanın tümör dokularına ait gen anlatımı seviyeleri karşılaştırıldı. Mann-Whitney testi ile yapılan dağılım araştırması sonucunda bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

4.2.12. Nüks Durumun Karşılaştırılması

Nüks gözlenen 11 hastanın tümör dokusundan elde edilen gen ekspresyonu verileri ile nüks gözlenmeyen 78 hastanın tümör dokusundan elde edilen gen ekspresyonu sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

5.TARTIŞMA

Kolorektal kanser, adım adım meydana gelen genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile normal kolon mukozasının invaziv kansere dönüşümü sonucu oluşur. KRK'nın çoğu daha önce var olan ve malignitenin genetik özelliklerini içeren adenomlardan gelişir (90).

Kolorektal kanser karsinogenezinin farklı yolaklarının tanımlanması KRK' nın heterojen yapısını ortaya koymuştur. Fearon ve Vogelstein tarafından ileri sürülen ilk modelde 3 basamak tanımlanmıştır. Birinci basamakta onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör supresör genlerin inaktivasyonu oluşur. İkinci olarak karsinom gelişimi için en az 4-5 gende mutasyon oluşması gereklidir. Üçüncü olarak tümörün biyolojik davranışı bu genetik değişimlerin birikimi sonucu belirlenir (91,92).

Fearon ve Vogelstein modelinden daha farklı yolaklarında keşfi ile KRK' nın moleküler yapısı daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Son 20 yılda 2 önemli moleküler yapı daha keşfedilmiştir. Bunlardan biri "Mismatch Repair" (MMR) gen defektinin neden olduğu Mikrosatellit İnsitabilite (MSI)'dir. Dięeri de özellikle hipermetilasyon yolu ile gen fonksiyonlarının sessizleştirilmesi olan epigenetiğ'in anlaşılmasıdır (90).

KRK farklı fenotiplere neden olan farklı moleküler yolaklara bağlı olarak heterojen bir hastalıktır. Kolorektal karsinogenezin moleküler temelini anlaşılması ile tedavi ve prognozda önemli değişiklikler olmuştur. Tümörün patolojik ve moleküler özelliklerine dayanarak tarama ve takip protokollerinin optimizasyonu, hastalık evresinin daha doğru değerlendirilmesi ve tedavinin bireyselleştirilmesi ile sonuçlar daha iyi hale gelmiştir (90).

Kolorektal karsinogenez ile ilişkili olan farklı gen mutasyonları vardır. Fakat bu genlerin bir çoğunun hastalığın başlangıcı ve progresyonundaki rolü henüz anlaşılabilmiştir. Bunlardan en önemlileri APC, K-ras ve p53 mutasyonları olup KRK' da değişen oranlarda bulunurlar ancak aynı vakada birlikte bulunmaları nadirdir (93).

KRK' nın temelinde yer alan bu multifaktöryel ve karmaşık genetik yapı hem hastaların tedavi yanıtlarındaki farklılıkların hem de yapılan genetik çalışmaların sonuçlarındaki farklılıkların nedeni olabilir.

Otofaji ölen hücrelerde gözlenmesine rağmen kanser hücresinde otofajinin hücreyi öldürdüğü ya da ölümden koruduğu net değildir. Muhtemelen otofaji hücrenin normal fonksiyonlarını restore edemediği zaman hücre ölmektedir. Bu konu tartışmalıdır, çünkü farklı otofaji inhibitörleri farklı sonuçlar doğurmaktadır. Örneğin meme kanseri hücrelerinde tamoksifen otofaji'yi uyarmaktadır, otofaji inhibitörü olan 3-Metil Adenin (3-MA) bu hücrelerin ölümünü engellemektedir. Bu durum otofajinin bir ölüm mekanizması olduğunu düşündürmektedir (94). Bunun tersine radyasyonun uyardığı otofajide bir otofaji inhibitörü olan Bafilomisin A1 kullanıldığında kanser hücrelerinde apoptozisi arttırmaktadır. Bu durumda otofaji hücrelerin apoptozisten kaçmasını sağlayan koruyucu bir mekanizma gibi görülmektedir (23).

Başka bir hipoteze göre otofajinin farklı evrelerinde yapılan inhibisyon farklı sonuçlara neden olmaktadır. Örneğin temozolamid ile tedavi edilen glioma hücrelerinde otofajinin erken evresinde 3-MA ile inhibisyon hücreleri ölümden korunurken, geç evrede Bafilomisin A ile yapılan inhibisyon apoptozisi uyarak hücre ölümünü arttırmaktadır (95). 3-MA ve Bafilomisin-A bir çok çalışmada otofaji inhibitörü olarak kullanılmasına rağmen bunlar otofajinin spesifik inhibitörleri değildir. 3-MA fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K) inhibitörüdür, Bafilomisin-A Hidrojen-ATPaz inhibitörüdür. Kanser tedavisinde otofajinin rolünün daha net tanımlanabilmesi için otofaji genleri üzerinde daha spesifik inhibisyon yapılmalıdır (96).

Otofajik bazı genler, kanser gelişimi esnasında tümör supresör etki gösterirken, kanserin progresyonu esnasında kanser hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunmaktadır (56).

Bu bilgilerden de anlaşıldığı gibi otofaji ve kanser ilişkisi oldukça komplekstir. Otofajinin kanserdeki rolü, kanserin evresine, hücrelerin metabolik durumuna ve stres varlığına göre değişmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda otofaji ile ilişkili bazı moleküllerin farklı kanser türlerinde ekspresyonlarının farklılık gösterdiğini bildiren sonuçlar bildirilmiştir. Literatürde otofaji ilişkili genlerle yapılan çalışmalarda bir çok farklı yöntem (hayvan modelleri, hücre serileri, insan normal ve tümör dokuları gibi) ve değerlendirme tekniği (İmmün histo-kimya boyama, gen ekspresyon düzeyi, allelik delesyon gibi) kullanıldığı görülmektedir. Biz bu çalışmamızda Real Time PCR yöntemini kullanarak otofaji yolağı ile

ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerini saptadık. ULK1, ATG13B, BECN-1,PI3K, Akt, PTEN, UVRAG, ve GABARAP ekspresyon düzeylerini çalıştığımız önemli moleküllerden bazılarıdır.

Ökaryotik hücrelerde, "mammalian target of rapamycin complex 1" (mTORC1) yeterli besin varlığının en önemli sensörüdür ve majör otofaji regülatörüdür. Yeterli besin varlığında mTORC1 aktive olur, ULK1 ve ATG13' ü fosforile ederek inhibe eder. Bu çalışmada normal dokuya göre tümör dokusunda ULK1 ekspresyonunun arttığı, ATG13B ekspresyonunun değişmediği saptandı. ULK1 ve ATG13 kompleksi otofagozom çekirdeklenmeyi oluşturan yapıdır. Büyüme faktörleri eksikliği veya farmakolojik olarak mTORC1 inhibisyonu yapıldığında otofaji aktive olur (97).

Beclin-1 otofajinin başlangıç aşaması olan çift zarlı otofagozom oluşumu için temel otofaji proteindir ve BECN 1 geni tarafından kodlanmaktadır. BECN 1 düzeyinin Meme, Over ve Beyin tümörlerinde ekspresyonunun azaldığını bildiren çalışmalara (98,99) karşın kolon kanserinde ekspresyonunun arttığını bildiren çalışmalar da (100) mevcuttur. Bununla birlikte Guo ve arkadaşlarının 85 kolorektal kanserli hasta ile yaptıkları çalışmada hastaların bir kısmında BECN 1 ekspresyonunun azaldığı ve bu hastaların kemoterapi yanıtının daha iyi olduğu bildirilmiştir (101). Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 175 hastanın tümör dokusu ile normal kolon dokusu İHK yöntemi ile BECN 1 ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir. Hastaların yaklaşık %90' ında BECN 1 ekspresyonunun arttığı görülmüştür (100). Bizim çalışmamızda ise BECN 1 gen ekspresyonu normal kolon dokusu ile tümör dokusu arasında farklılık göstermedi. Çalışmamızda otofajinin maturasyon ve füzyon aşamasında etkili olan UVRAG, RAB7A ve LAMP2 düzeyi tümör dokusunda yüksek saptanırken, otofajinin başlangıç aşamasında etkili olan BECN 1 düzeyini yüksek saptanmamasının nedeni tümör dokusundaki hücrelerde otofajinin ileri evrelerinde olmalarından kaynaklanıyor olabilir.

PI3K kompleksi de hücre büyümesinde etkili sinyal yollarındandır ve Akt/PKB yolağını aktive eder. Akt'nin aktivasyonu TOR'u aktive ederek otofajiyi inhibe eder (63,64).

PTEN ise PI3K/Akt yolağı ile tam tersi bir işleve sahiptir ve otofajiyi indükler. PTEN' de oluşan mutasyonlar otofajiyi baskılamaktadır (65). PI3K kompleksi Atg6 (beclin-1), Atg14, Vp15 ve Vps34 proteinlerinden oluşmaktadır, bu kompleks PI3K bağlayıcı protein ile otofajik keseciğin oluşumunu başlatmaktadır (66). Bizim çalışmamızda birbirine zıt etkili olan PI3KC3, Akt1 ve PTEN genlerinin tümör dokusundaki ekspresyon düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu.

UVRAG geninin monoallelilik delesyonu insan kolon kanserlerinde sıklıkla görülmektedir, UVRAG proliferasyon ve tümörögenезin inhibisyonunda görev alır (98). Çalışmamızda UVRAG geninin normal dokuya göre tümör dokusunda ekspresyonunun arttığını saptadık.

GABARAPL-1 önemli hücre içi transport fonksiyonları olan bir proteindir. GABARAP ve GABARAPL-1'in tümör gelişimi ile ilgili olduğunu ileri süren çalışmalar vardır. Meme kanseri hastalarında yapılan çalışmada GABARAPL-1 mRNA düzeyi, yüksek histolojik gradlı, lenf nodu metastazı olan ve hormon reseptörü negatif hastalarda daha düşük bulunmuştur. GABARAPL-1 mRNA düzeyinin meme kanserinde nüks ve lenf nodu metastazını belirlemede iyi bir gösterge olabileceği ileri sürülmüştür (102).

Kolorektal kanserde GABARAP' ın fonksiyonu hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda tümör dokusu ile normal kolon dokusu karşılaştırıldığında GABARAPL-1 ve GABARAPL-2 düzeyi tümör dokusunda anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Ancak klinik ve patolojik bulgularla ilişki saptanmadı.

Çalışmamız otofaji ilişkili genler ile ilgili yapılan çalışmalar içinde en geniş kapsamlı çalışmalardan biridir. Seksen dokuz hastanın hem tümör dokusunda hem de normal kolon dokusunda RT-PCR yöntemi ile 94 gen'in ekspresyon düzeyi çalışılarak normal ve patolojik dokulardaki düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu genlerden 47' sinin tümör dokusunda ekspresyonunun daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızın en önemli özelliklerinden biri de bu sonuçların hastaların demografik özellikleri (yaş, cinsiyet, evre gibi) ve histopatolojik özellikleri (lokalizasyon, vasküler invazyon gibi) ile birlikte değerlendirilmesidir. Burada dikkate değer noktalardan birisi gen ekspresyon düzeylerinin bu değişkenlerden bağımsız olmasıdır.

Otofaji regülasyonu ile tümörögenез arasındaki yakın ilişki çok sayıda çalışma ile ortaya konmuştur. Kanser tedavisinde otofaji genleri üzerinden yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi olası görünmektedir. Bu açıdan çalışmamızdaki sonuçların oldukça değerli olduğunu, daha fazla hasta sayısı ve IHK gibi tekniklerle kombine edilerek teyit edilmesinin yararlı olacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda hem kanser oluşumunun erken evrelerinde hem de ileri evre kanserlerin progresyonunda önemli role sahip olduğu düşünülen Otofaji yolağı ile ilişki 94 gen'in RT-PCR yöntemi ile normal kolon dokusunda ve tümör dokusunda ekspresyon düzeylerine bakıldı. Normal dokuda ve tümöral dokudaki gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Bu genlerden 47 tanesinin ekspresyon düzeyi tümör dokusunda anlamlı derecede daha yüksek bulundu. Bu sonuçlar hastaların demografik ve histopatolojik özellikleri ile karşılaştırıldı ve aralarında anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı.

Sonuç olarak otofaji ilişkili bazı genlerin hasta özellikleri ve histopatolojik özelliklerden bağımsız olarak tümör dokusunda daha yüksek düzeyde ifade edildiğini söyleyebiliriz.

Günümüzde tüm kanserlerde olduğu gibi kolorektal kanserde de daha spesifik ve daha az toksik tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır. Bu nedenle kolorektal kanserde yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmesine katkı sağlayabilecek otofaji yolağının önemli bir hedef olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda bulduğumuz sonuçların hem daha geniş hasta serileri hem de diğer çalışma teknikleri (taze doku kullanılması, IHK boyama gibi) ile teyid edilmesi veya bu yöntemlerin birlikte kullanılması yararlı olabilir. Ayrıca kolorektal kanserde kullanılan tedavilerin ve hasta sağkalımlarının gen ekspresyon düzeylerinden nasıl etkilendiği araştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(5):277-300.
2. Miller BA, Chu KC, Hankey BF, Ries LA. Cancer incidence and mortality patterns among specific Asian and Pacific Islander populations in the U.S. *Cancer Causes Control.* 2008;19(3):227-56.
3. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):212-36.
4. Poston GJ, Figueras J, Giuliante F, Nuzzo G, Sobrero AF, Gigot JF, et al. Urgent need for a new staging system in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(29):4828-33.
5. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004;22(2):229-37.
6. Prenen H, Vecchione L, Van Cutsem E. Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer. *Target Oncol.* 2013;8(2):83-96.
7. Melet A, Song K, Bucur O, Jagani Z, Grassian AR, Khosravi-Far R. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. *Adv Exp Med Biol.* 2008;615:47-79.
8. Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis.* 2009;14(4):376-91.
9. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS, et al. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol.* 2009;217(5):702-6.
10. Kim MS, Song SY, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Expressional and mutational analyses of ATG5 gene in prostate cancers. *APMIS.* 2011;119(11):802-7.
11. Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res.* 2007;17(10):839-49.
12. Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(6):505-10.
13. Hannigan AM, Gorski SM. Macroautophagy: the key ingredient to a healthy diet? *Autophagy.* 2009;5(2):140-51.
14. LoRusso PM. Mammalian target of rapamycin as a rational therapeutic target for breast cancer treatment. *Oncology.* 2013;84(1):43-56.

15. Knaevelsrud H, Ahlquist T, Merok MA, Nesbakken A, Stenmark H, Lothe RA, et al. UVRAG mutations associated with microsatellite unstable colon cancer do not affect autophagy. *Autophagy*. 2010;6(7):863-70.
16. Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S, Levine B. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy*. 2005;1(1):46-52.
17. Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, Tari A, Sanguino A, Kondo Y, et al. Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy*. 2008;4(5):669-79.
18. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res*. 2006;66(19):9349-51.
19. Wei H, Guan JL. Pro-tumorigenic function of autophagy in mammary oncogenesis. *Autophagy*. 2012;8(1):129-31.
20. Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Delomenie C, Nicolas V, et al. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene*. 2013;32(18):2261-72, 72e 1-11.
21. Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(11):876-85.
22. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 2004;23(16):2891-906.
23. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*. 2001;61(2):439-44.
24. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(1):10-29.
25. Sağlık Bakanlığı Kanserve Savaş Dairesi Başkanlığı 2006-2008 yılları Türkiye Kansere İnsidansı, www.kanser.gov.tr.
26. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32.
27. Dahabreh IJ, Terasawa T, Castaldi PJ, Trikalinos TA. Systematic review: Anti-epidermal growth factor receptor treatment effect modification by KRAS mutations in advanced colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2011;154(1):37-49.
28. Walker J, Quirke P. Prognosis and response to therapy in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2002;38(7):880-6.

29. Atkin WS, Edwards R, Kralj-Hans I, Wooldrage K, Hart AR, Northover JM, et al. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2010;375(9726):1624-33.
30. You YN. Risk factors for young-onset advanced colorectal cancer-reply. *Arch Intern Med*. 2012;172(12):971-2.
31. Chou CL, Chang SC, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Wang HS, et al. Differences in clinicopathological characteristics of colorectal cancer between younger and elderly patients: an analysis of 322 patients from a single institution. *Am J Surg*. 2011;202(5):574-82.
32. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1994;331(25):1669-74.
33. Pariente A, Milan C, Lafon J, Faivre J. Colonoscopic screening in first-degree relatives of patients with 'sporadic' colorectal cancer: a case-control study. The Association Nationale des Gastroenterologues des Hopitaux and Registre Bourguignon des Cancers Digestifs (INSERM CRI 9505). *Gastroenterology*. 1998;115(1):7-12.
34. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 1996;56(21):4862-4.
35. Butler LM, Millikan RC, Sinha R, Keku TO, Winkel S, Harlan B, et al. Modification by N-acetyltransferase 1 genotype on the association between dietary heterocyclic amines and colon cancer in a multiethnic study. *Mutat Res*. 2008;638(1-2):162-74.
36. Singh PN, Fraser GE. Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Am J Epidemiol*. 1998;148(8):761-74.
37. Probst-Hensch NM, Sinha R, Longnecker MP, Witte JS, Ingles SA, Frankl HD, et al. Meat preparation and colorectal adenomas in a large sigmoidoscopy-based case-control study in California (United States). *Cancer Causes Control*. 1997;8(2):175-83.
38. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(11):916-32.
39. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med*. 1999;340(3):169-76.
40. Meyerhardt JA, Giovannucci EL, Holmes MD, Chan AT, Chan JA, Colditz GA, et al. Physical activity and survival after colorectal cancer diagnosis. *J Clin Oncol*. 2006;24(22):3527-34.
41. Smalley W, Ray WA, Daugherty J, Griffin MR. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: a population-based study. *Arch Intern Med*. 1999;159(2):161-6.

42. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, et al. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. 1993;329(27):1982-7.
43. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med*. 2003;138(7):560-70.
44. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology*. 2003;124(2):544-60.
45. American Joint Committee on Cancer. Colon and rectum. In: *AJCC Cancer Staging Handbook*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia; 2010. p. 173-207.
46. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart A. Revised tumor and node categorization for rectal cancer based on surveillance, epidemiology, and end results and rectal pooled analysis outcomes. *J Clin Oncol*. 2010;28(2):256-63.
47. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010;375(9719):1030-47.
48. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*. 1990;181(3):195-213.
49. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(3):211-6.
50. Kang R, Tang D. Autophagy in pancreatic cancer pathogenesis and treatment. *Am J Cancer Res*. 2012;2(4):383-96.
51. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol*. 2010;12(9):823-30.
52. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010;40(2):280-93.
53. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.
54. Virgin HW, Levine B. Autophagy genes in immunity. *Nat Immunol*. 2009;10(5):461-70.
55. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 2000;290(5497):1717-21.
56. Rouschop KM, Wouters BG. Regulation of autophagy through multiple independent hypoxic signaling pathways. *Curr Mol Med*. 2009;9(4):417-24.
57. Chen S, Rehman SK, Zhang W, Wen A, Yao L, Zhang J. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec;1806(2):220-9.
58. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5308-16.

59. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):931-7.
60. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007;9(10):1102-9.
61. Apel A, Zentgraf H, Buchler MW, Herr I. Autophagy-A double-edged sword in oncology. *Int J Cancer.* 2009;125(5):991-5.
62. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol.* 2000;150(6):1507-13.
63. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001;411(6835):355-65.
64. Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(12):2445-62.
65. Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, et al. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35243-6.
66. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999;402(6762):672-6.
67. Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene.* 2006;25(48):6347-60.
68. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* 2007;12(1):9-22.
69. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005;9(1):59-71.
70. Ballif BA, Blenis J. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ.* 2001;12(8):397-408.
71. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy.* 2008;4(5):600-6.
72. Noble CG, Dong JM, Manser E, Song H. Bcl-xL and UVRAG cause a monomer-dimer switch in Beclin1. *J Biol Chem.* 2008;283(38):26274-82.
73. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2006;8(10):1124-32.
74. Cho DH, Jo YK, Hwang JJ, Lee YM, Roh SA, Kim JC. Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Lett.* 2009;274(1):95-100.

75. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003;22(56):9030-40.
76. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(23):8204-9.
77. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol*. 2008;10(6):676-87.
78. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*. 2007;26(7):1749-60.
79. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*. 2009;23(7):798-803.
80. Yin X, Cao L, Peng Y, Tan Y, Xie M, Kang R, et al. A critical role for UVRAG in apoptosis. *Autophagy*. 2011;7(10):1242-4.
81. Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res*. 2006;66(6):2885-8.
82. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2129-39.
83. Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki M, Matsuno Y, Yamada T, Hirohashi S, et al. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer*. 1995;75(12):2844-52.
84. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006;10(1):51-64.
85. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev*. 2007;21(11):1367-81.
86. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009;137(6):1062-75.
87. Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res*. 2001;22(1):43-61.
88. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*. 2009;16(7):966-75.
89. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev*. 2007;21(13):1621-35.

90. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(9):1423-31.
91. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67.
92. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87(2):159-70.
93. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(14):9433-8.
94. Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, et al. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis.* 1996;17(8):1595-607.
95. Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 2004;11(4):448-57.
96. Kondo Y, Kondo S. Autophagy and cancer therapy. *Autophagy.* 2006;2(2):85-90.
97. Neufeld TP. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Apr;22(2):157-68.
98. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, et al. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol.* 2006;8(7):688-99.
99. Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, Monciatti I, et al. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int J Oncol.* 2007;30(2):429-36.
100. Chen Z, Li Y, Zhang C, Yi H, Wu C, Wang J, et al. Downregulation of Beclin1 and Impairment of Autophagy in a Small Population of Colorectal Cancer. *Dig Dis Sci.* 2013;Epub ahead of print doi:10.1007/s10620-013-2732-8.
101. Guo GF, Jiang WQ, Zhang B, Cai YC, Xu RH, Chen XX, et al. Autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 predict cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2011;17(43):4779-86.
102. Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, et al. High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer.* 2010;102(6):1024-31.