

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİYOİNFORMATİK ANALİZ YÖNTEMLERİYLE İNSAN KOLON
KANSERİNDE OLASI BELİRTEÇ miRNA ADAYLARININ BELİRLENMESİ
VE HEDEF GENLERİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
ARAŞTIRILMASI**

Sarah AHMED TULFAH

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2022**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOİNFORMATİK ANALİZ YÖNTEMLERİYLE İNSAN KOLON KANSERİNDE OLASI BELİRTEÇ miRNA ADAYLARININ BELİRLENMESİ VE HEDEF GENLERİN KOLON KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI

Sarah Ahmed TULFAH

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Eş-danışman : Dr. Öğr. Üyesi Pelin TELKOPARAN AKILLILAR

Kolorektal kanser (KRK), dünya çapında üçüncü en yaygın malin tümör ve kanserle ilişkili ölümün ikinci ana nedenidir. Kolon kanserinin teşhisi ve tedavisi hakkında Tıp ve bilim alanındaki gelişime rağmen kolon kanseri halen insanların yaşamları için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Bu nedenle, KRK nüksünün erken teşhisini iyileştirmek için KRK'nın patogenezi anlamak ve yeni biyobelirteç adayları belirlemek oldukça önemlidir. Son zamanlarda, moleküler ve genetik tekniklerin gelişmesi sonucunda kanser erken teşhisinde önemli gelişmeler olmuştur. MikroRNA'lar, transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunu düzenleyen ve önemli biyolojik roller oynayan kısa kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar, kolon kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser formları ile ilişkilendirilmiştir. Buna göre, miRNA'nın ifadesini kolorektal kanserde diagnostik bir belirteç olarak kullanılması mümkündür. Bu tez çalışmasında, potansiyel biyobelirteç olabilecek miRNA'ları ve hedef genleri belirlemek için *In silico* kolon kanseri data setleri ve kolon kanseri hücre hatlarını, sağlıklı doku ve hücrelerle karşılaştırılmıştır. Kolon kanseri ve sağlıklı bireylere ait GEO data setleri arasından GSE53592, GSE61741 mikrodizi verilerinden faydalanılmıştır. Verilerin ön işlenmesinden sonra, 11 ortak eksprese edilen miRNA tanımlanmıştır ve daha sonra hedeflenen genlerin miRNA sinyalleri ve tahminleri q-RT PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Analiz sonuçlarına göre hsa-miR-93-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-20b-3p, hsa-let-7f-1-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-145-3p, hsa-miR-331-3p ve hsa-miR-1231'nin kolon kanserli hastalarda anlamlı olarak farklı şekilde ifade edildiği belirlenmiştir. Bu miRNA'ların hedeflediği mRNA'ları biyoinformatik analizlerle belirledikten sonra, LAMA3 ve ITGA3 gen ifadelerinin kolon kanseri hücre hatlarındaki ifadesinin sağlıklı kolon hücre hatların kıyasla anlamlı bir şekilde artarken COL1A2 gen ifadesinin ise azaldığı gözlemlenmiştir. ITGA5, COL4A6 ve COL5A2 ifadelerinin ise değişmediği bulunmuştur.

Eylül 2022, 77 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kanser, Kolon kanseri, miRNA, qRT-PCR (Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR).

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF POSSIBLE MARKER miRNA CANDIDATES IN HUMAN COLON CANCER WITH BIOINFORMATIC ANALYSIS METHODS AND INVESTIGATION OF TARGET GENES IN COLON CANCER CELL LINES

Sarah AHMED TULFAH

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Pelin TELKOPARAN AKILLILAR

Colorectal cancer (CRC) is the third most prevalent malignant tumor and the second leading cause of cancer-related death globally. Despite the scientific development and research on diagnosing colon cancer, it still poses a significant danger to people's lives. Therefore, it is urgent to understand the pathogenesis of CRC and resolve new biomarkers to improve the early diagnosis and prediction of CRC recurrence. Recent advances in molecular and genetic techniques have resulted in significant advances in cancer diagnosis. MicroRNAs are short non-coding RNAs that regulate gene expression at the transcriptional level and play important biological roles. miRNAs have been associated with various forms of cancer, including colon cancer. Accordingly, it will be possible to use miRNA expression as a diagnostic marker in CRC. This thesis compared *in silico* colon cancer datasets and colon cancer cell lines with healthy tissues and cells to identify potential biomarker miRNAs and target genes. Among the GEO data sets of colon cancer and healthy individuals, GSE53592 and GSE61741 microarray data were used. After preprocessing the data, 11 standard and expressed miRNAs were identified, and then the miRNA signals and predictions of the targeted genes were investigated using the qRT-PCR method. Following the identification of the mRNAs targeted by these miRNAs using bioinformatic analyses, the expression of the LAMA3 and ITGA3 genes on colon cancer cell lines increased significantly when compared to healthy colon cell lines, while the expression of the COL1A2 gene decreased. The expressions of ITGA5, COL4A6, and COL5A2 have not changed.

September 2022, 77 pages

Key Words: Cancer, colon cancer, miRNA, qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR)

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Benim için hem bilimsel hem de pratik seviyelerde birçok ders taşıyan yeni ve değerli bir deneyim olan yüksek lisans çalışmalarındaki uzun kariyerimin sonunda, yaşam sözlüğüme eklenen yeni bir dil kazandım, Türk dili. Çalışmalarım ışığında, bana güçlü bir insan olmayı, bağımsız olarak nasıl olumlu bir şekilde bakacağımı öğreten birçok durumdan geçtiğim konuları olumlu bir şekilde bakma ve başarılı olma girişimlerini öğrendim. Bu bakış açısından, kariyerim boyunca beni destekleyen herkese olumlu sözleriyle beni motive ettikleri için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimi ve tez çalışmalarım süresince başından beri ana destekçim ile bana anlayışla yardım eden, sevgi ve hoşgörüsü ile daima yanımda olan değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a bütün yardımları için teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Eğitimimin yanı sıra tezimin her aşamasında yanımda olan, desteğini benden esirgemeyen ve benim için çok değerli bir kazanç olan, nazik gülümseme ve sevecen kalbin sahibi değerli nazik hocam, eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Pelin TELKOPARAN AKILLILAR'a sonsuza kadar teşekkür ederim.

Çalışmalarımda destek olan, gerek bilgi birikimi gerekse yapıcı düşünceleri ile bana anlayışla yardım eden sayın Öğr. Gör. Dr. Okan ONAR'a teşekkür ederim.

Laboratuvarında samimi arkadaşım, her zaman güler yüzü ve samimiyeti ile yardım elini uzatan sevgili çalışma arkadaşım Name PERKTAŞ'a teşekkür ederim.

Sözlerimin sonuncusu kalbimin en değer verdiği insan olan canım annem. Sevgi ve minnettarlık sözleri seni tanımlayamıyor, bana verdiğin destekler ve uykusuz geceleri asla unutmuyacağım. Benimle birlikte, çalışmalarımı sıkılmadan merakla dinleyen bana azim kazandıran ve asla hakkını ödeyemeyeceğim en değerli anneme sonsuz kere teşekkür ederim.

Sarah TULFAH
Ankara, Eylül 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURUMSAL TEMELLER.....	5
2.1 Kanser	5
2.1.1 Kolon kanseri.....	8
2.1.2 Kolon kanseri risk faktörleri	9
2.1.2.1 Yaş	10
2.1.2.2 Diyet.....	10
2.1.2.3 Genetik ve genler.....	11
2.1.3 Kolon kanseri epidemiyolojisi.....	12
2.1.4 Kolon kanseri moleküler mekanizmas	13
2.1.5 Kolon kanseri evreleri	15
2.1.6 Kanser histolojisi türleri.....	17
2.1.7 Tümör yayılımı ve metastazı	17
2.1.8 Kolon kanseri tanı ve tedavi stratejileri.....	18
2.1.8.1 KRK tanısında kullanılan cerrahi yöntemler	19
2.1.8.2 KRK tanısında kullanılan ablatif yöntemler	21
2.1.8.3 Embolizasyon.....	22
2.1.8.4 Kemoterapi	23
2.1.8.5 Radyoterapi	24
2.1.8.6 İmmünoterapi.....	24
2.2 miRNA ve Görevleri'nin Araştırılması.....	26
2.3 miRNA'ların Kolon Kanseri Tanı ve Tedavisindeki Rolü	27
2.4 Tez Amacı	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
3.1 Materyal	28

3.2 Yöntem	29
3.2.1 Hücre kültürü	30
3.2.2 HT-29 ve CCD-18Co hücre serilerinden pellet toplaması ve saklanması.....	31
3.2.3 CCD-18Co ve HT-29 hücre hatlarından RNA izolasyonu	31
3.2.4 Nano drop	33
3.2.5 Komplementer/ Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi	33
3.2.6 cDNA sentez protokolü	34
3.2.7 q-RT PCR yöntemi ile gen ifade analizleri	35
3.3 miRNA'ların <i>in siliko</i> İfade Analizleri	36
3.4 İstatistiksel Analiz	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1 GEO Data Setlerinin Seçilmesi ve <i>in siliko</i> Analizi	38
4.2 miRNA Biyoinformatik Analizleri	42
4.2.1 GSE53592 ve GSE61741 veri setlerinde ortak diferansiyel olarak ifade edilen miRNA'ların tanımlanması	42
4.2.2 Belirlenen potansiyel biyobelirteç miRNA'ların hedeflediği sinyal yollarının <i>in siliko</i> analizi	42
4.3 q-RT PCR Yöntemi ile ECM-Reseptör İnteraksiyon Yolağında İfade Edilen Bazı miRNA Hedef Genlerinin <i>in vitro</i> Analizi	51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre
M	Molar
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
pH	Hidrojen kuvveti
g	Santrifüj kuvveti
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
gr	Gram
L	Litre
α	Alfa
β	Beta
s	Saat
dk	Dakika
sn	Saniye

Kısaltmalar

ACS	American Kanser Topluluğu
AJCC	Amerikan Ortak Kanser Komitesi
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
KKH	Kanser kök hücresi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü'nün
dH ₂ O	Distille su
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FBS	Fetal bovin serumu
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
TBS	Tris Tamponlu Tuz
TBS-T	TBS-Tween
CO ₂	Karbon dioksit
KRK	Kolorektal kanser
dH ₂ O	Distille su
DMSO	Dimetil sülfoksit
cDNA	Tamamlayıcı DNA

mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	Mikro RNA
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR
KRK	Kolorektal kanser
HT-29	Kolorektal adenokarsinoma hücre hattı
CCD-18co	İnsan kolon fibroblast hücresi
<i>C.Elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
APC	Adenomatöz Polipozis Gen
DNA	Deoksiribo nükleik asit
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat-Dehidrogenaz
MWA	Mikrodalga ablasyonu
RFA	Radyofrekans ablasyonu
KLL	Kronik lenfositik lösemi
TAE	Transarteriyel embolizasyon
TACE	Kemoembolizasyon
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DNase	Deoksiribonükleaz
RNA	Ribonükleik asit
RNase	Ribonükleaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 2017 yılında dünya genelinde kolon kanseri ölüm istatistikleri	6
Şekil 2.2 2020’de ilk on kanser için küresel insidans ve mortalite oranları	7
Şekil 2.3 Kanserın ayırt edici özellikleri.....	8
Şekil 2.4 Kolorektal Kanser Risk Faktörleri.....	11
Şekil 2.5 Kolon kanseri ilerlemesi	13
Şekil 2.6 Kolorektal karsinoma oluşumunun izlediği genetik yol	15
Şekil 3.1 İnsan kolon kanseri hücre hattı HT-29 ve kolon epitel hücreleri CCD-18Co	30
Şekil 3.2 Manual RNA izolasyonu fazları	32
Şekil 4.1 Volcano grafiği GSE61741: Hastalar ve kontrollerde miRNA profilleri, kolon kanseri serum örnekleri.....	41
Şekil 4.2 Volcano grafiği GSE53592: Kolon kanseri örneklerinden ekspresyon verileri, kolon kanseri (serum örnekleri) doku vs Tespit kontrol dokusu, $p < 0.05$	41
Şekil 4.3 Venn şeması ile gösterilen ortak değişen miRNA’lar.....	42
Şekil 4.4 Farklı olarak eksprese edilen miRNA’ların ısı haritası	44
Şekil 4.5 ECM Reseptör Etkileşim yolağının Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) yolak haritası	46
Şekil 4.6 Normal ve Kolon Kanseri Dokularında diferansiyel gen ekspresyon analizinin TNM çizim analizi	47
Şekil 4.7 GSE53592 ve GSE61741 data setlerinde ortak ifade edilen miRNA’ların ECM-Reseptör İnteraksiyon yolağı ile ilişkili genlerin 3’ UTR dizileri arasındaki öngörülen bağlanma bölgelerinin TargetScan analizi.....	50
Şekil 4.8 ITGA5, COL4A6, LAMA3, COL1A2 ve COL5A2 miRNA hedef genlerinin HT-29 kolon kanseri hücrelerindeki ifadelerinin ve CCD-18Co sağlıklı kolon hücrelerine göre olan nispi ifade değişimlerinin q-RT-PCR yöntemi ile analizi.....	52
Şekil 5.1 Çalışma tasarımının iş akışı	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 KRK'nin tradisyonel tedavi yöntemlerinin önemli semptomları.....	25
Çizelge 3.1 RNA ölçümleri ve A260/A280 oranı.....	33
Çizelge 3.2 cDNA Sentezi için İlk Basamakta Gerekli Olan Maddeler	34
Çizelge 3.3 cDNA Sentezi için Üçüncü Basamakta Gerekli Olan Malzemeler	35
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan primerlerin listesi	35
Çizelge 3.5 qRT-PCR reaksiyon karışımı.....	36
Çizelge 3.6 qRT-PCR reaksiyon koşulları.....	36
Çizelge 3.7 GSE61741 ve GSE53592 veri setleri.....	37
Çizelge 4.1 GSE53592 en çok artan ve azalan miRNA'lar	39
Çizelge 4.2 GSE61741 en çok artan ve azalan miRNA'lar	40
Çizelge 4.3 KEGG analizi sonucu en çok miRNA tarafından hedeflenen yolaklar ve genler	45
Çizelge 4.4 Mann-Whitney analizine göre, TNM çizim analizine göre ekspresyon değişiklikleri görüntülenen ECM-Reseptör Etkileşim yolağında yer alan genlerin kat değişimlerinin sayısal verileri.....	49
Çizelge 4.5 Hedef genlerin hücrede işlevleri	53

1. GİRİŞ

Kanser sayısız tanıma sahiptir, ancak en temel tanımı zamanla diğer organlara da yayılabilecek tümörlere neden olan kontrolsüz hücre bölünmesidir (Pardee ve Stein 2011). Aynı zamanda kanser kalıtsal bir hastalıktır ve hücre bölünmesi ve proliferasyon mekanizmasındaki bozulmaların neden olduğu anormal hücre büyümesi olarak tanımlanır. Kanser, organizmalarda mevcut herhangi bir hücre türünde meydana gelebilir (Lengauer vd. 1998). Tarihsel kayıtlara göre; bundan 5000 yıl önce Mısır'da, kansere benzer semptomlarla ortaya çıkmış hastalıklar bizlere kanserin geçmişi ile ilgili ilk ipuçlarını vermektedir. Yengeç anlamına gelen Yunanca Karkinoma'dan karsinom terimi ilk olarak M.Ö. 400 civarında kullanılmıştır (Rupnarain vd. 2004).

Kanser hücreleri; genellikle ölümlü sonuçlanan, metastaz olarak adlandırılan uzak doku ve/veya organlara göç etme kapasitesine sahiptir. Günümüzde doktorlar, biyologlar ve/veya kimyagerler tarafından çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen, kansere bağlı ölümler halen devam etmektedir.

Dünyada kanser türleri içerisinde insidansı ilk beşte yer alan kolon kanseri gastrointestinal sistemde meydana gelmektedir. Dünya sağlık örgütü'nün 2018 tahmini verilerine göre yaygın kanser türlerine bakıldığında kolon kanseri 1.80 milyon vakada rastlanmıştır ve ölümlü sonuçlanan kanser vakaları arasında 862 bin ile dünyada ikinci sırada yer almaktadır (WHO 2018). Risk faktörlerine bakıldığında ilk önce mutasyonlar ve bunu takiben hareketsizlik, genetik faktörler, sigara kullanımı gibi birçok farklı sebeple ortaya çıkabilmektedir. Kolon kanserinin erkek bireylerde kadınlara kıyasla daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir. Risk faktörlerine ilaveten çevresel faktörler de kolon kanserinin gelişmesinde yaş ile beraber önemli rol oynamaktadır. Çeşitli coğrafi bölge ve etnik gruplar incelendiğinde kolon kanseri görülme sıklığında önemli değişimler gözlenmektedir (Brenner vd. 2014). Amerikan Kanser Topluluğu istatistiklerine göre 2017 yılında 135,430 kişiye kolon kanseri teşhisi konmuştur. 50.260 den fazla kişinin kolon kanserine bağlı nedenlerden hayatlarını kaybettiği belirtilmiştir (Siegel vd. 2019). Türkiye'de ise Türkiye Halk Sağlığı kurumunun 2018 verilerine göre erkeklerde kadınlara kıyasla 2 kat daha fazla kolon kanser teşhisi konulmuştur.

Bu durum uygulanmakta olan farklı tedavi stratejilerinin yetersizliğini ifade eder niteliktedir (T.C. Halk Sağlığı Kurumu 2018). Bu veriler kolon kanseri tedavisi için yeni terapötik ajanların ve kombine tedavilerin geliştirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Kolorektal kanser için ana terapötik seçenekler hala cerrahi, kemoterapi ve bunların kombinasyonudur. Kolorektal kanser tedavisi için erken evrede cerrahi rezeksiyon kullanılmasına rağmen, cerrahiye sıklıkla adjuvan kemoterapi eşlik eder (Wang vd. 2007). Bununla birlikte, nüks, metastaz ve ilaç direnci sebebiyle hastaların yaklaşık olarak %50'si hayatını kaybetmektedir (Bray vd. 2018). Son zamanlardaki terapötik gelişmelere rağmen, 5-florourasil (5-FU), ileri evre ve metastatik kolorektal kanserlerin tedavisinde en sık kullanılan ajandır (Webber vd. 2015). 5-FU, kanser hücrelerinin büyümesini engelleyen kemoterapötik bir ajandır. Antimetabolit bir pirimidin analogu olan 5-FU, anti-neoplastik etkisini timidilat sentezinin de-novo sentezini katalize etmek için anahtar bir enzim olan timidilat sentezin inhibisyonu yoluyla göstermektedir (Parker ve Cheng, 1990). 5-FU nükleozid metabolizmasına müdahale ederek hücre sitotoksitesine, RNA ve DNA yapısındaki değişikliklere neden olur. 5-FU, kolon kanseri tedavisinde tek başına veya oksaliplatin, irinotekan ve folinik asit gibi diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde kullanılmaktadır (Noordhuis vd. 2004).

Geride bıraktığımız son on yıl içerisinde, anormal mikroRNA (miRNA) ifade değişimlerinin kolorektal kanserin (KRK) başlaması ve ilerlemesinde işlevsel bir rolü olduğu netlik kazanmıştır. Spesifik miRNA'ların, eksprese edildikleri hücre ortamına bağlı olarak tümör baskılayıcılar veya onkogenler olarak işlev görebileceği gösterilmiştir (Lopez-Camarillo vd. 2012; Pencheva ve Tavazoie 2013; Davoodian vd. 2017; Zhou vd. 2017; Wu ve Storey 2018). miRNA'lar ile ilgili kolon kanseri hücreleri üzerine yapılmış tüm çalışmalar, bu hücrelerin kanser hücre dizileri üzerindeki etkisine bakmakta ve bu hücre dizileri için hedef genleri belirlemektedir. miRNA'lar, hedef genlerin transkripsiyon sonrası susturulmasını düzenleyen, boyutu 19 ila 25 nükleotid olan kısa RNA molekülleridir. Tek bir miRNA, yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilir ve genellikle fonksiyonel etkileşimli bir yola dahil olan birçok genin ifadesini etkileyebilir (Lu ve Rothenberg 2018). Son yıllarda bu araştırmaların kolon kanseri hücrelerinin yayılmasını sınırlamak veya engellemek için yapılan araştırmalar önem kazanmıştır.

Kolorektal kanser büyümesi ve metastazında yer alan kritik yollardan biri, hücre dışı matris (ECM) ve hücrel reseptörlerin etkileşimidir. Hücre dışı matris (ECM), hücreleri biyokimyasal ve yapısal olarak destekleyen hücre dışı bir doku bileşenidir. ECM, kollajenler, lamininler ve fibronektinler gibi birkaç glikoproteinden oluşur ve entegrinler ve kaderinler gibi ECM bileşenleriyle doğrudan etkileşime giren yüzlerce hücrel reseptör vardır (Barczyk vd. 2010; Achilleas vd. 2016). ECM ve hücrel yüzeydeki reseptörler arasındaki etkileşimler hücre davranışını etkiler ve hücre iletişimi, proliferasyon, yapışma ve göçte oldukça önemli işlevlere sahiptir (Nguyen-Ngoc vd. 2012). Yapılan çalışmalar ECM - reseptör etkileşiminin kolorektal kanserin oluşumunda ve yayılmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Stankevicius vd. 2016; Crotti vd. 2017; Maltseva ve Rodin 2018). Birçok çalışma, ECM-reseptör etkileşiminde yer alan bazı genlerin ekspresyonuna dayanan biyobelirteçleri ve kolorektal kanser prognozu imzalarını, E- integrinlerini ve P-kaderin kodlayan genler ve çeşitli lamininler gibi tanımlanmıştır (Boudjadi vd. 2013; Galatenko vd. 2018; Gong vd. 2019).

Kanserdeki immün infiltratlar, karsinogenezden tümör büyümesine kadar çeşitli tümör fazlarında önemli bir role sahiptir. Tümör hücreleri ve bağışıklık sistemi hakkında daha fazla bilgi sahibi olan yeni bir tümör tedavisi stratejisi olan immünoterapi, tümör hastalarına umut vermektedir (Balkwill ve Coussens, 2005; Castell ve Larsson, 2015). Yüksek verimli omikler, moleküler biyoloji ve bilgisayar teknolojisi son zamanlarda bize hesaplanabilir bir perspektif vermektedir ve KRK insidansı, ilerleme ve prognozun moleküler yönlerini ortaya çıkarmaktadır. Teoretikal ve *in siliko* araştırmalar çoğunlukla kanser biyobelirteç tahmini ve tedavisi için yenilikçi bilgiler ve çözümler sunmak için kullanılmıştır. Klinik uygulamalarda kullanılan moleküler biyobelirteçlerin birçoğu geleneksel olarak tümör örneklerinin aynı hasta gruplarının sağlıklı doku örnekleri ile karşılaştırılarak bulunmuştur. Ancak moleküler biyobelirteç taramasında çeşitli dezavantajlar vardır (Waghlikar vd. 2012; Wen vd. 2014). Dezavantajlarından biri; potansiyel hayati göstergelerin çoğu hem sağlıklı insanlarda hem de kanser hastalarında mevcuttur ve bu nedenle sağlıklı insanlar ve hastalar arasındaki ifade seviyelerindeki farklılıklar genellikle çok küçüktür, bu da kanser ve diğer iyi huylu yaralanmaları sağlık durumundan doğru bir şekilde ayırt etmek için örnekleme yöntemini göz ardı etmeyi imkânsız hale getirmektedir (Huang vd. 2017).

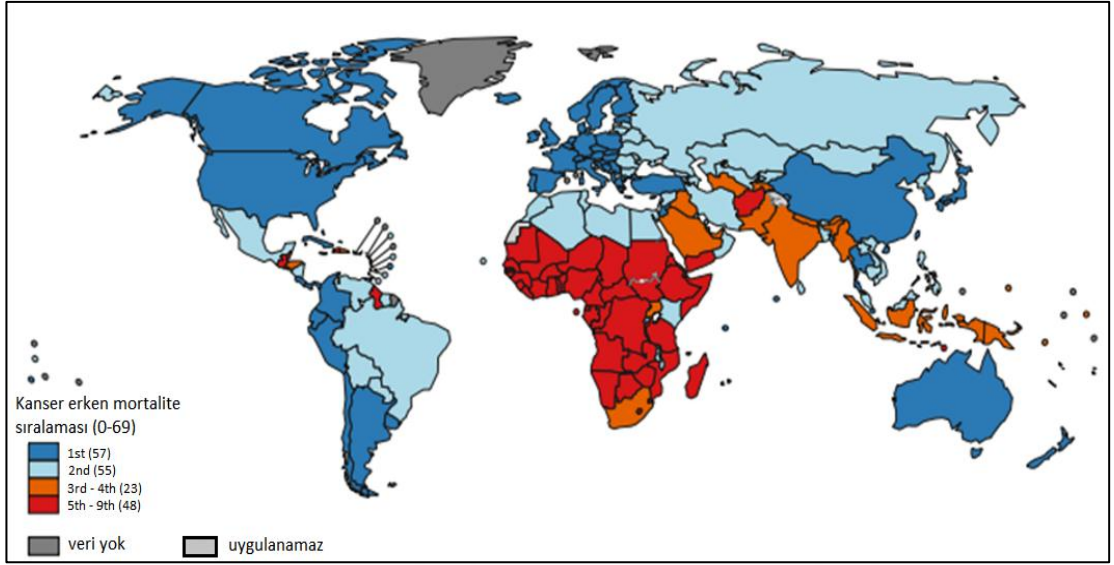
Bu zayıf yönlerin üstesinden gelmek için, biyobelirteçleri tanımlamak için ağ tabanlı algoritmalar ilgi çekmekte ve iyi performans göstermektedir. Moleküler belirteçler ve ağ tabanlı belirteçler ise biyobelirteçleri normal ve malign örneklerden ayıran analitik yaklaşımlardır (Brown 2008). Biyobelirteçler tanı ve/veya tedavi için biyolojik süreçleri veya farmakolojik sinyal hedeflerini belirlemek ve değerlendirmek için kullanılabilirler (Chen vd. 2015).

Bu açıdan değerlendirildiğinde; bu tez çalışması kapsamında daha önceden kolon kanseri üzerine farklı araştırmacılar tarafından yapılmış ve halka açık bir şekilde paylaşılmış GEO data setlerinden faydalanarak, diferansiyel olarak ifade edilen miRNA'ların *in siliko* olarak analizi gerçekleştirilmiştir. Yaptığımız analizler sonucunda belirlediğimiz miRNA'ları ve bunların ortak düzenleyici yolları arasındaki negatif/pozitif korelasyon ve etkileşimler belirlenmiştir. Devamında ise belirlenen miRNA hedef gen ifade değişimleri kolon kanseri ve sağlıklı kolon hücre hatları kullanılarak doğrulanmıştır. Bu tez çıktısı olarak; kolon kanseri gelişiminde miRNA-hedef mRNA ilişkileri *in siliko* ve *in vivo* hücre hattı çalışmaları sonucu farklı hücresel biyolojik olaylar (örneğin, hücre apoptozu, büyüme, farklılaşma ve çoğalma ve tümörijeniz ve ilerleme) ile ilişkilendirilerek ve literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

2. KURUMSAL TEMELLER

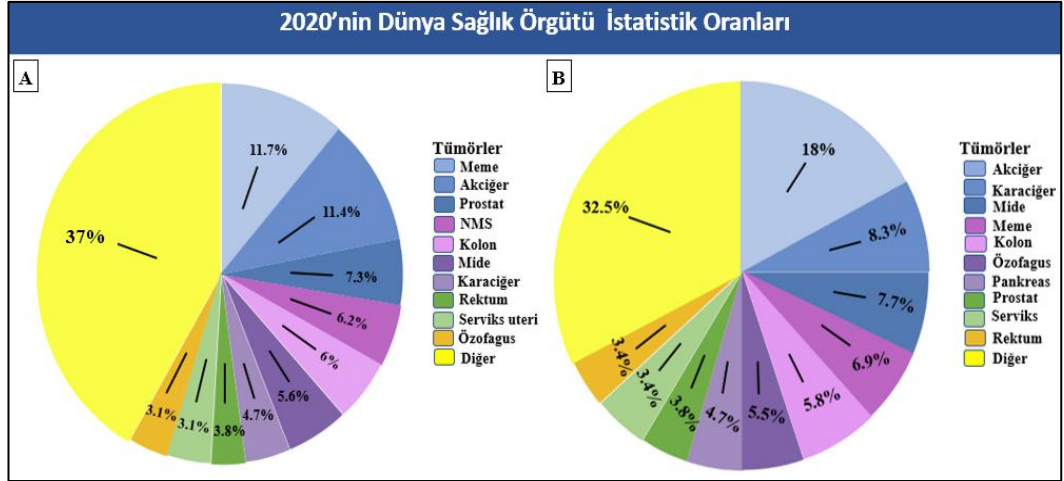
2.1 Kanser

Kanser, insan ölümlerinde önde gelen nedenleri arasında yer alan dünyanın her yerinde yaşam kalitesini ve süresini riske atan önemli bir etmendir (Bray vd. 2021). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2019 yılı verilerine göre kanser, 183 ülkenin 112'sinde 70 yaşından önceki ölümlerin birinci veya ikinci önde gelen nedeni olurken 23 ülkede de üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır (Şekil 2.1). Kanserin önde gelen ölüm nedeni olarak öne çıkması, kısmen birçok ülkede kansere göre inme ve koroner kalp hastalığı mortalite oranlarındaki önemli düşüşlerden kaynaklanmaktadır (Sung vd. 2021). Dünyanın hızla büyüyen ve yaşlanan nüfusu kanser insidansındaki artışa katkıda bulunmaktadır. Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra, günümüzde hem ülkemizde hem de dünyada önde gelen ikinci mortalite nedenidir (TÜİK 2020). Global olarak her altı ölümden biri ülkemizdeyse her beş ölümden biri kanser sebebiyle gerçekleşmektedir (WHO 2020; TÜİK 2020). Genel olarak, küresel kanser insidansı ve ölüm yükü hızla artmaktadır. Bu durum popülasyon yaşlanmasını, büyümesini, bazıları sosyoekonomik gelişme ile bağlantılı olan kilit kanser risk faktörlerinin yaygınlığını ve dağılımındaki değişiklikleri yansıtır (Omran, 1971; Gersten vd. 2002). Şekil 2.1'deki haritaların karşılaştırılması, erken mortalite nedeni olarak kanserin pozisyonunun sosyal ve ekonomik kalkınmanın ülke düzeylerini ne kadar etkilediğini göstermektedir (Sung vd. 2021).



Şekil 2.1 2017 yılında dünya genelinde kolon kanseri ölüm istatistikleri (Sung vd. 2021)

DSÖ'nün Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) istatistiklerine göre 2020 yılında, 19.3 milyon yeni kanser vakası tanımlanmış ve yaklaşık 10 milyon ölüme neden olduğu gösterilmiştir. Bu istatistikler sonucunda kansere bağlı ölümler, kardiyovasküler hastalıkları geride bırakarak ilk defa küresel olarak ölümün önde gelen nedenini oluşturmuştur (Sung vd. 2021). Ayrıca, meme kanseri insidansı şu anda genel yükün %11.7'sini kapsayarak, sırası ile akciğer (%11.4) ve prostat (%7.3) kanserlerine göre en sık görülen kanser çeşididir. Toplam mortalite söz konusu olduğunda, akciğer kanseri hala en yüksek oranda (%18), ardından karaciğer (%8.3) ve mide (%7.7) oranlarına sahiptir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 2020’de en yaygın ilk on kanser tipi için küresel insidans ve mortalite oranları. (A) Kanser türüne göre toplam yük yüzdesi, (B) ölüm yüzdesi (Sung vd. 2021)

Aynı çalışmaya göre kanser insidansının 2040 yılına kadar 28,5 milyon olguya yükselmesi beklenmektedir. Ayrıca her üç kişinin hayatlarının bir noktasında kansere yakalanacağı öngörülmektedir (Sung vd. 2021). Kanser, her biri benzersiz özelliklere sahip ve benzersiz bir tedavi stratejisi gerektiren 200’den fazla türe sahip çok karmaşık bir hastalıktır. Bununla birlikte, genellikle üç temel tipte sınıflandırılabilir:

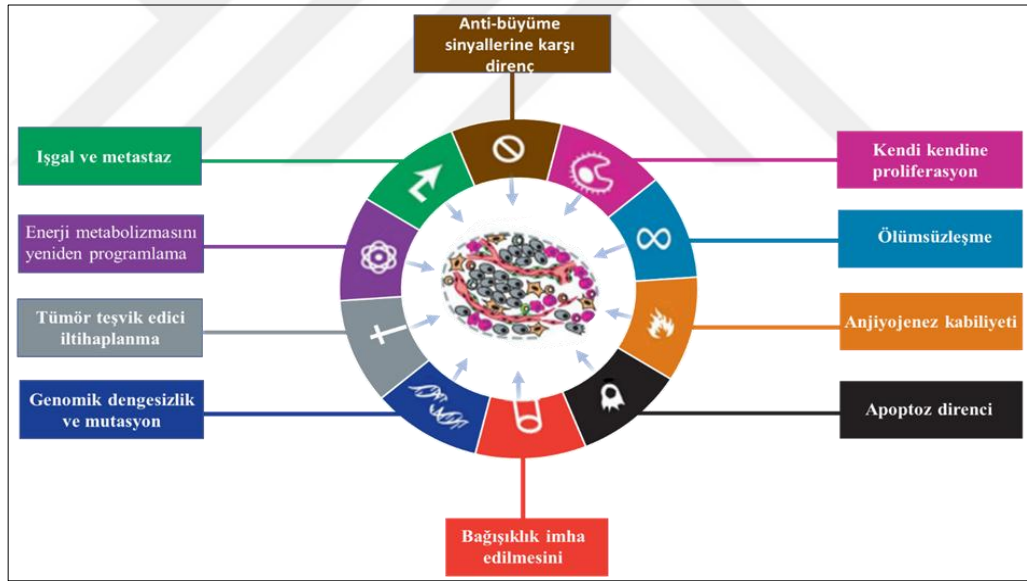
- Tüm malignitelerin %90’ından fazlasını oluşturan karsinomlar, epitelyal hücrelerden gelişen katı tümörlerdir.
- Sarkomalar, kemik ve kaslı bağ dokularından gelişen katı tümörlerdir.
- Beyaz kan hücreleri lösemi ve lenfomaların kaynağıdır.

Ayrıca, tümörler de yaygın olarak kaynaklandıkları organlar üzerinde isimlendirilir. Kadınlarda kolorektal kanserler, akciğer, servikal ve tiroid kanserlerine oranla olasılığı daha yüksektir (Pardee ve Stein, 2011).

Kanser, DNA molekülündeki mutasyonların ve düzensiz hücre büyümesindeki fiziksel değişiklikleri ile ard arda eklenmesi olarak da nitelendirilir (Kreuser 1986; Pienta vd. 1989). Kanser genellikle bir hücrede başlar, ancak normal bir hücrenin mutasyon sayısı arttıkça malign bir fenotip ortaya çıkabilir (Hanahan ve Weinberg 2000). Kanser hücreleri, uzak dokulara ve / veya organlara yayılarak, sıklıkla ölüme yol açan

metastaza neden olabilir. Hanahan ve Weinberg (2011) kanser için 10 temel özellik önermiştir (Şekil 2.3).

1. Kendi kendine proliferasyon
2. Anti-büyüme sinyallerine karşı direnç
3. Apoptoz direnci
4. Ölümsüzleşme
5. Anjiyojenez kabiliyeti
6. İşgal ve metastaz
7. Tümör teşvik edici iltihaplanma
8. Enerji metabolizmasını yeniden programlama
9. Bağışıklık imha edilmesini
10. Genomik dengesizlik ve mutasyon



Şekil 2.3 Kanserin ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011)

2.1.1 Kolon kanseri

Kolon kanseri, akciğer, prostat ve meme kanseri ile birlikte en ölümcül kanserler arasında sayılmaktadır (Labianca vd. 2010). Kansere bağlı ölümler arasında %55 sağkalım oranı ile ikinci sırada yer almaktadır (Bray vd. 2018). Kadınlarda ikinci,

erkeklerde ise üçüncü kanser türü iken kadınlardaki insidans ve ölüm oranı erkeklere göre yaklaşık olarak %25 daha düşüktür (IARC 2018). Cinsiyet ayrımı olmaksızın ülkemizde en sık görülen üçüncü kanser türüdür (Sung vd. 2021). Kolorektal kanser, dünyada tüm kanser ölümlerinin %10'unu oluşturur (Bray vd. 2018). Avrupa'da her yıl, yaklaşık 250.000 yeni kolon kanseri tanısı konulmaktadır (Dyba vd. 2021). Bu kanser gelişimi sanayileşme ve kentleşme ile tandemde yükselir. Kolorektal kanser sosyoekonomik gelişimin bir işaretidir ve insidans oranları, önemli ölçüde değişen ülkelerde artan HDI ile sürekli olarak tırmanma eğilimindedir (Bray 2014; Fidler vd. 2016). Hastalığın insidansındaki dengeleyici ve azalan eğilimler günümüzde yalnızca çok gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Bu eğilimler öncelikle ülke çapında tarama programları ve kolonoskopi taramasının artmasıyla ilişkilendirilmiş olmasına rağmen yaşam tarzı ve diyet değişiklikleri de buna katkıda bulunabilmektedir (Ouakrim vd. 2015). Kolon kanseri vakalarının sayısındaki görünür artış esas olarak çevresel ve kalıtsal nedenlere bağlanır. Ancak, bu artışın kesin nedenleri bilinmemektedir (Dekker vd. 2019). Epidemiyolojik çalışmalar erkek cinsiyeti ve artan yaşın, hastalık insidansıyla bağlantılı olduğunu göstermektedir. Pozitif aile öyküsünün, tüm kolorektal kanserli hastaların yaklaşık %10-20'sinde hastalığın ortaya çıkmasında önemli bir rolü olduğu görülmektedir (Henrikson vd. 2015). Kolorektal kanser mortalite oranlarındaki farklılıklar kısmen yaşam tarzı risk faktörlerinin yaygınlığı ile ilişkili olabilir. Örneğin birkaç çalışma, alkol alımındaki akut bir artışın, kolorektal kanser insidansı ve ölüm oranlarının artmasına neden olabileceğini göstermiştir (Rehm ve Gmel 2007; Zaridze vd. 2009). Benzer şekilde, genç yaş gruplarında kolorektal kanser ölüm oranlarındaki azalma, daha çeşitli diyet (örneğin daha az yağ içeren) ve daha az alkol tüketimi gibi önleyici yaşam tarzı faktörlerine bağlanabilir (Zatonski ve Bhala 2012). Kolon kanseri riskini artıran veya azaltan en önemli faktörler aşağıda listelenmiştir.

2.1.2 Kolon kanseri risk faktörleri

Kanser, günümüzde yüksek sayıda ölümle insan sağlığını etkileyen en ciddi hastalıklardan biridir (Pacal vd. 2020). Birçok çalışmalar, aşırı alkol alımına ek olarak, sigara, artan vücut ağırlığı, kırmızı ve işlenmiş et tüketimi gibi ek çevresel risk faktörlerinin kolon kanserinin teşvik edilmesi ve geliştirilmesi üzerinde büyük bir etkiye

sahip olduğunu göstermiştir (Botteri vd. 2008; Chan vd. 2011; Cai vd. 2014; Kyrgiou vd. 2017). İnsan kanserinden türetilen hücre dizileri, kanser biyolojisini araştırmak ve kanser tedavisinin etkinliğini artırmak için hipotezleri test etmek için en yaygın kullanılan modellerdir (Ko 2008). Kolon kanseri için risk faktörleri üç ana faktöre ayrılmaktadır:

2.1.2.1 Yaş

İleri yaş kolon kanseri gelişimi için bir risk faktörüdür, kolon kanseri hastalarının % 90'ı elli yaşın üzerindedir. Ancak gençlerde ortaya çıkabilir. Daha önce adenomatöz polip veya kalıcı bağırsak iltihabı öyküsü olan kişilerde risk de yükselir. Birinci derece akrabalar arasında aile kolorektal kanser öyküsü, ilk gebelikte geç yaş, düzensiz adet döngüleri ve ilerlemiş yaş faktörü yüksek kolorektal kanser riski ile ilişkili önemli değişkenleridir (Yoo vd. 1999).

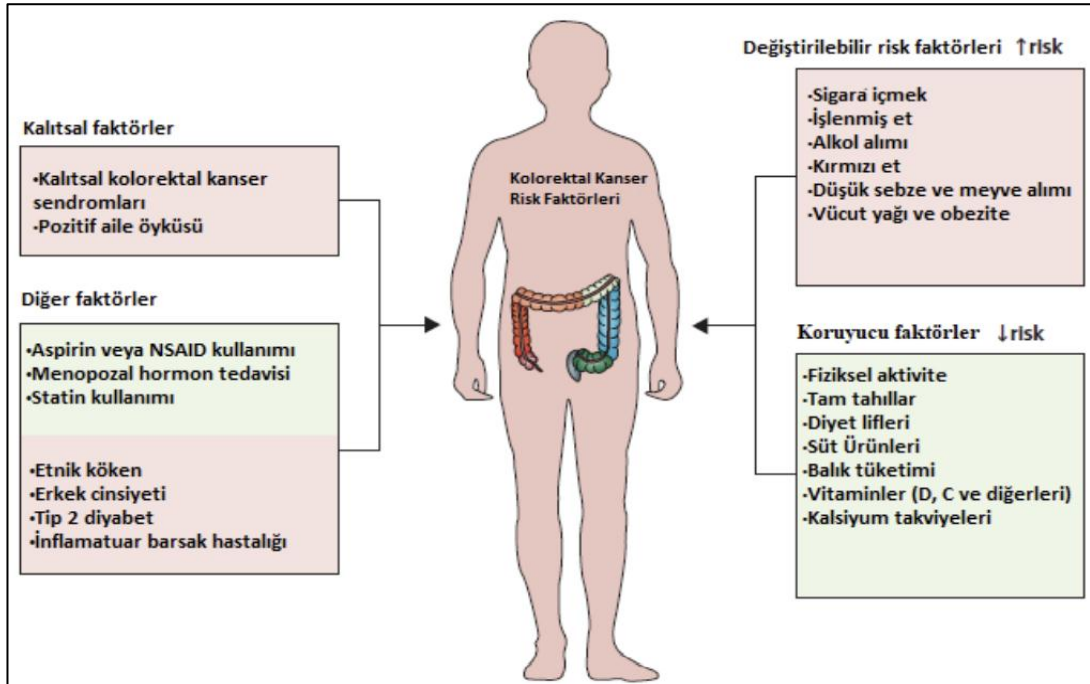
2.1.2.2 Diyet

Bağırsak mikroflora ortamı ve gıda alımı kolon hücre farklılaşmasını etkiler (Bry vd. 1996; Yang vd. 1996). Yapılan araştırmalara göre, düşük folat ve metiyonin alımı ile birlikte yüksek alkol tüketimi kolon kanser riskini arttırabilir (Giovannucci vd. 1995). Bunun yanında, rafine tahıl ve kırmızı et tüketiminin de kolorektal kanser riskini arttırdığını ortaya koyulmuştur (Levi vd. 1999). Balık yağı ve lifli besin (örneğin selüloz) tüketiminin hücre bölünmesi, büyümesi ve ölüm dengesini etkileyerek kolon tümörlerinin oluşumuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Heitman ve Cameron, 1990; Lindner 1991). Örneğin; buğday kepeği, gelişimin erken ve geç aşamalarında kolon kanserine karşı koruma sağlarken (Alabaster vd. 1995), balık, karbonhidratlar ve β -karoten bakımından zengin bir diyet de kript boyunca azalmış kolorektal mukoza proliferasyonuna ve normal bir hücre proliferasyon paternine yol açar (Caderni vd. 1999). Yoğurt, hücrel apoptozu arttırarak kolon kanseri hücrelerinde mitoz ve apoptoz arasındaki dengeyi etkilediği gösterilmiştir (Rachid vd. 2002). Epidemiyolojik, in vitro araştırmalar ve insan denemeleri, yüksek kalsiyum tüketiminin kolonik karsinogenezi düşürdüğünü göstermiştir (Buset vd. 1986; Slattery vd.1988; Thomas vd. 1993).

Çalışmalara göre; aşırı diyet ve enerji tüketimi, insülin direncinin gelişimine ve sonuç olarak insülin, trigliserit ve esterleştirilmemiş yağ asitlerinin dolaşım seviyelerinde artışa yol açar. Bunlar kolon epitel hücreleri için proliferatif bir uyarıcı görevi görür ve oksijen ara maddelerinin birikmesini teşvik eder. Uzun süreli maruziyet kolon kanseri riskini artırır (Bruce vd. 2000).

2.1.2.3 Genetik ve genler

Dekker vd. göre, hem kalıtsal hem de çevresel risk faktörlerinin kolorektal kanserin gelişiminde rolü vardır (Şekil 2.4). İkiz ve aile çalışmalarına göre, kolorektal kanserin kalıtımı %12 ila %35 arasında değişmektedir (Lichtenstein vd. 2000; Czene vd. 2002). Çoklu kolorektal kanser genom çapında ilişki çalışmalarının, kolorektal kanser riski ile ilişkili olan kanser duyarlılık genlerini (yaygın tek nükleotid polimorfizmleri) etkili bir şekilde tanımlamasına rağmen (Jiao vd. 2014) . Ayrıca, uzun süredir devam eden inflamatuvar bağırsak hastalığı olan bireylerin yanı sıra kolorektal kanser veya adenom öyküsü olan bireyler yüksek kolorektal kanser riski altındadır ve yakın izleme gerektirir (Cottet vd. 2012).



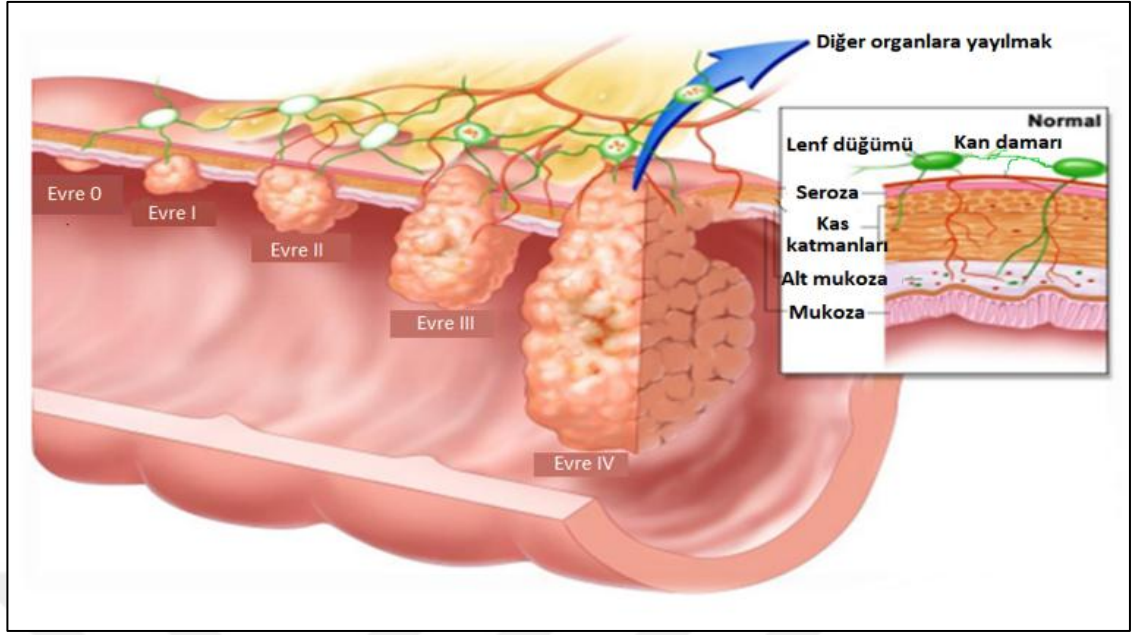
Şekil 2.4 Kolorektal Kanser Risk Faktörleri (Dekker vd. 2019)

2.1.3 Kolon kanseri epidemiyolojisi

Kolon ve rektumda birkaç kanser türü vardır. Bunlar arasında, bağırsaktaki spesifik hormon üreten hücrelerden gelişen karsinoid tümörler ve Cajal'ın interstisyel hücreleri olarak bilinen kolon duvarındaki özel hücrelerden gelişen gastrointestinal stromal tümörler vardır (Kindblom vd. 1998). Bu tümörler iyi huylu ya da malign olabilir ve sindirim sistemi boyunca her yerde bulunabilirler. Lenfomalar lenf nodlarının yanında, kolonda da başlayabilirler (Ponz ve Roncucci, 2000). Sarkomalar, kan damarlarında, bağ dokusuna veya kolonun ve rektumun duvarlarında başlayabilen tümörlerdir. Sarkomalar, kolonda ve rektumda nadirdir (Koch vd. 2008). Genomik instabilite, normal kolonik veya rektal mukozanın kansere geçişinde rolü mevcuttur (Rupnarain vd. 2004).

Farklı insan malignitelerinde en mutasyona uğramış ikinci gen sürücüsü olan Ras (H-Ras, K-Ras ve N-Ras), uzun zamandır kritik bir kanser araştırması odağı olmuştur (Chen vd. 2019). RAS aktivasyonu, hücre gelişimi, farklılaşmayı, hayatta kalma, apoptoz, sitoskeleton örgütü, hücre hareketliliği, proliferasyon ve iltihabı yöneten çeşitli hücresel yolları etkiler. Tümör baskılayıcı genlerinde bulunan mutasyonlar, genellikle kromozom 18'in uzun kolunda bulunur, daha da büyümeye yönlendirmek için adenom gelişimi yapılarak ortaya çıkar (Lanza vd. 1998; Wang vd. 2010).

KRK'de 17p'nin alelik kaybı genellikle ikinci aleldeki p53'teki mutasyonlarla ilişkilidir ve bu mutasyon adenomun karsinoma geçişine aracılık edebilir (Grady ve Markowitz 2002). Diğer tümör baskılayıcı genlerinde daha fazla inaktivasyon mutasyonlarının varlığında, bu karsinom hücreleri diğer organlara da göç edebilir. P53 tümör baskılayıcı genindeki mutasyonlar, kolon kanserinde prevalendir, ancak kanserojenez evresinde daha geç görülürler (Al-Sohaily vd. 2012). P53'ün, DNA-hasarlı hücrelerin çoğalmasını sınırlandırmadığı, ancak tümör büyümesinin geç bir aşamasında etkisizleştirilen APC (Adenomatöz Poliposis Gen) ve RAS ve P53 mutasyonlarına yanıt olarak apoptozu indüklemesi önerilmektedir (Al-Sohaily vd. 2012).



Şekil 2.5 Kolon kanseri ilerlemesi (Correa ve Montero, 2013)

2.1.4 Kolon kanseri moleküler mekanizması

Kolorektal kanser (KRK), geniş bir yayılmaya sahiptir ve dünya çapında kanserle ilişkili ölüm oranlarının artırılmasının ana nedenlerinden biri olarak kabul edilir (Rawla vd. 2019). Kolorektal kanserlerden iki tanesi çok agresif ve yaygın maligniteler içerir; bunlar kolon ve rektal kanserleridir. Mevcut araştırmaların KRK'nin patofizyolojisi ve geliştirilmiş tarama prosedürleri hakkında fikir vermesine rağmen, KRK prevalansı hala artıştadır. Birkaç hüresel sinyal yolunun KRK'de düzensiz olduğu gösterilmiştir, bu da malign fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, KRK'nin heterojen bir hastalık olduğunu ve tümörün moleküler ve genetik özelliklerinin tedavi prognozu ve yanıtını belirlediğini göstermektedir (Prenen vd. 2013; Almeida vd. 2022). KRK için iki moleküler patolojik sınıflandırma tarif edilmiştir. Kanser genom atlası (TCGA) projesi, KRK'yi entegre moleküler analiz (array-bazlı ve sekanslama teknolojileri) kullanarak iki gruba ayırdı (Muzny vd. 2012). İlk grup, DNA hasarlı eşleşme onarımı eksikliği (MMR) (~%13) veya DNA polimeraz epsilon veya delta Ekzonükleaz alan mutasyonları (EDM) (~%3), Mikrosatellit instabilite (MSI) ve hipermutasyonlu tümörlerden (%16) oluşur (Muzny vd. 2012). İkinci grup, hipermutasyona uğramamış tümörler (%84), DNA somatik kopya sayısı değişiklikleri

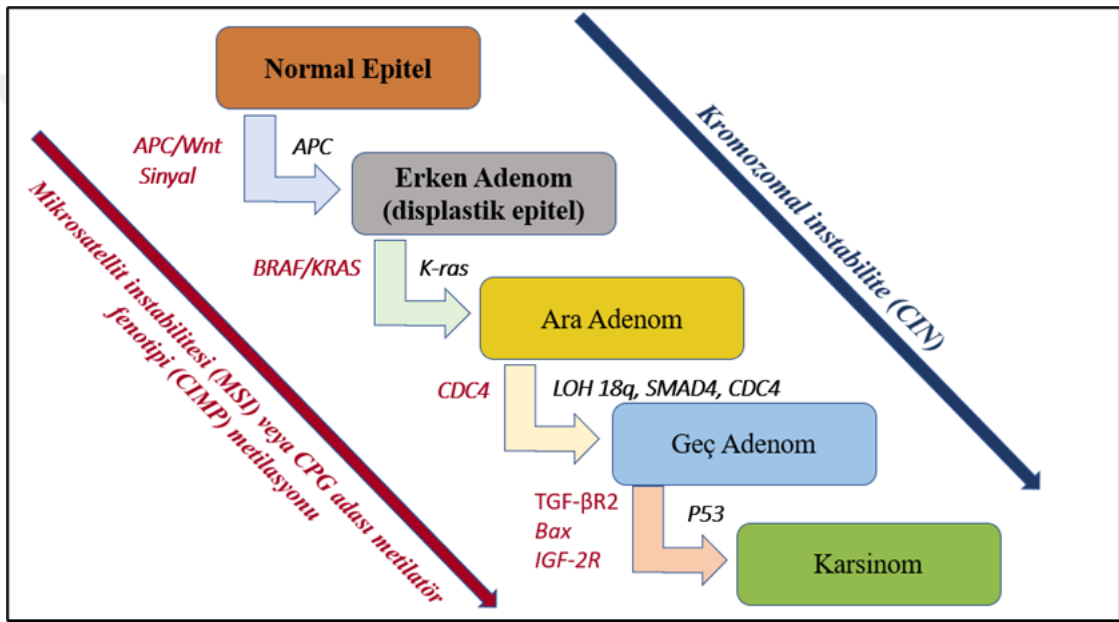
(SCNAs) ve Adenomatous polipozis koli (APC) dahil olmak üzere genlerde sık mutasyonlara sahip düzensiz Wnt yolundan oluşmaktadır. Kirsten Ras (KRAS), fosfatidilinositol- 4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa (PIK3CA), SMAD4 olarak da adlandırılan Smad aile elemanı 4 ve tümör proteini 53 (TP53) bu gruba dahildir (Muzny vd. 2012).

Öte yandan Guinney ve ark. tarafından 18 farklı KRK dokularından elde edilmiş gen ekspresyonu veri kümeleri kullanılarak, KRK'nin dört konsensüs moleküler alt tipini (CMS) tanımlanmıştır: CMS1 (MSI bağışıklığı), CMS2 (kanonik), CMS3 (metabolik) ve CMS4 (mezenkimal) (Guinney vd. 2015). Amerikan Kanser Ortak Komitesi'ne göre, KRK evrelemesi, KRK yayılım miktarını tanımlamak için tümör-düğüm metastazi (TNM) yaklaşımı kullanılarak yapılır (O'Connell vd. 2004). KRK patogenezi oldukça karmaşık ve çeşitlidir ve sporadik, ailesel ve kalıtsal dahil olmak üzere çeşitli risk faktörleri tarafından indüklenir (Akbanı, 1997). Ailesel KRK vakaları, vakaların %25'ini oluşturur ve ailesinde KRK öyküsü olan bireyleri etkiler (Bogaert ve Prenen, 2014). Son olarak, genetik veya kalıtsal vakalar vakalarından sadece %5-10'unu oluşturur ve kolon poliplerinin varlığına veya yokluğuna göre kategorize edilir (Bogaert ve Prenen, 2014).

Polipozisli hastalıklar ailesel adenomatöz polipozis (FAP), MUTYH ile ilişkili polipozis (MAP), hamartomatöz polipozis sendromlarını (Peutz-Jeghers, juvenil polipozis ve Cowden sendromu) içerirken, polipozisi olmayan hastalıklar kalıtsal nonpolipoz KRK olarak (HNPCC; Lynch sendromu) bilinir (Wirtzfeld vd. 2001; Bogaert ve Prenen, 2014). Diğer risk faktörleri, Crohn veya ülseratif kolit gibi uzun süredir devam eden inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBD) gibi mevcut hastalıkların varlığını içerir (Xie ve Itzkowitz, 2008).

Bu bağlamda, KRK oluşumu için iki ana yol tanımlanmıştır. Bir yol, tümör baskılayıcı genlerin (TSG'ler) ekspresyonunu ve adenomatöz polipozis koliyi (APC) inhibe etmeyi içerir. Bu tüm KRK'nin %85'ini oluşturur ve FAP'li hastaların germ hattında mutasyona uğrar. Alternatif yol, tüm sporadik vakaların ve HNPCC sendromunun yaklaşık %15'ini oluşturan MMR (MSH2, MLH1 ve PMS2) 'de yer alan proteinlerin

mutasyonel inaktivasyonudur (Fearon ve Vogelstein, 1990; Grady ve Markowitz, 2002). Farklı yollar, farklı genetik kararsızlık modelleri, müteakip klinik belirtiler ve patolojik özellikler ile karakterize edilir (Grady ve Markowitz, 2002; Grady 2005). Bununla birlikte, KRK vakalarının çoğu, geniş bir heterozigoz (LOH) kaybı ve büyük kromozomal anormallikler ile karakterize edilen kromozomal kararsızlık (CIN) yolunu takip eder (Lin vd. 2003; Parsons vd. 2008). KRK'nin genetik kararsızlığı ve patogenezinde rol oynayan üç ana yol vardır: kromozomal kararsızlık (CIN), mikro uydu kararsızlığı (MSI) ve CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) yolları (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Kolorektal karsinoma oluşumunun izlediği genetik yol (Pino ve Chung, 2010)

2.1.5 Kolon kanseri evreleri

Teşhis süreci, tanının öneminin, tümörün yayılması ve gelişiminin kapsamını belirlemede yatan ve tedavi olasılığına yardımcı olan ciddi hastalıklar durumunda önemlidir. Kolon kanseri, komşu organlara veya lenfatik veya hematogen yayılım yoluyla ilerler. Yüksek dereceli displazi olarak da bilinen *in situ* karsinom, mukoza ile sınırlıdır ve muscularis mukozasına nüfuz etmeyen karsinomdur. Lenfatik ve vasküler kanallar muscularis mukozasının altında bulunduğundan, bu malignitenin yayılması olası değildir. Düklerin sınıflandırmasına göre, invaziv kolon kanseri tipik olarak A'dan

D'ye sınıflandırılır. Muscularis mukoza aşamaları; B1 evresi submukoza ve muscularis propria; B2 evresi muscularis propria ve seroza; C evresi, bölgesel lenf düğüm metastazlarını içerir ve D evresi uzak metastazları içerir. Kanserin son zamanlarda yoğunluğu ve vücuttaki yayılması esas olarak evreleme süreci ile belirlenir (AJCC 2018). TNM sistemi en çok kullanılan kolorektal kanser evreleme yöntemidir ve Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) tarafından belirtilen üç temel faktöre dayanmaktadır: düğüm, primer tümörün (T) duvar derinliğine, lokal lenf nodu metastazlarının (N) varlığıyla ve uzak metastazların (M) varlığıyla sınıflandırılır (Sandhu ve Bhutani, 2002; AJCC 2018). Kolorektal kanser, hastalığın büyümesine ve yayılmasına dayanarak Amerikan Ortak Kanser Komitesi tarafından beş aşamaya ayrılır: 0, I, II, III ve IV.

Evre 0: Erken evrelerinde kolorektal kanserler evre 0 olarak adlandırılır. Bu kanser veya kanserli hücreler bu aşamada teşhis edilebilir. Kolon Mukozada anormal hücreler veya polipler keşfedildiğinde, *in situ* olarak da bilinen kolorektal kanserin ilk aşamasıdır. Hücreler bu aşamada üretilir, ancak görüldükleri alanlarla sınırlıdır ve kolon, rektum, lenf düğümleri veya diğer organlara taşındıklarının bir işareti yoktur. Kanser teşhisi sonrasında cerrahi olarak çıkarılmasıyla kanser gelişimi kolayca önlenir (Brenner vd. 2014).

Evre I: Bu aşamada kanserli hücreler bağırsak duvarına ve submukoza dönüşmüş olabilir. Kanser komşu lenf düğümlerine veya daha uzaklara göç etmedi. Malign doku, bu aşamada keşfedilen bireylerde cerrahi olarak çıkarılır ve sağkalım oranı kabaca %90'dır (Dekker vd. 2019).

Evre II: Bu aşama, malign hücrelerin çoklu kolon, kas dokusu veya tüm kolon katmanları katmanlarına yayılıp yayılmadığına bağlı olarak iki kategoriye ayrılmıştır (IIA, IIB). Hastalık henüz bu aşamada lenf düğümlerine veya bitişik organlara yayılmamıştır. Cerrahi çıkarıldıktan sonra kemoterapi teşhisi konan hastaların sağkalım oranı %80'e kadar vardır.

Evre III: Bu noktada kanserli hücreler kolon duvarında yayılmıştır. Çevredeki lenf düğümlerine ve organlara yayılmasına dayanarak IIIA, IIIB veya IIIC olarak sınıflandırılır. Malignite, IIIA ve IIIB'deki ana tümörün yakınında en fazla üç lenf düğümüne ilerlemiştir. IIIC'de ana konuma ve komşu organlara yakın dört veya daha fazla lenf düğümüne genişlemesi mümkündür. Hayatta kalma oranları alt aşamalara bağlı olarak% 30-60 arasında değişmektedir. Tanı takiben, hastayı tedavi etmek için cerrahi prosedürlerin yanı sıra adjuvan kemoterapi kullanılır (Brenner vd. 2014).

Evre IV: Evre IV'teki kolorektal kanser, metastazların birden fazla organı etkileyip etkilemediğine bağlı olarak iki bölüme sınıflandırılır. Kanser başka bir organa yayılmışsa, evre IVA olarak tanımlanır; Birden fazla organa yayılmışsa, Aşama IVb olarak etiketlenir. Tümörlerin cerrahi eksizyonunu takiben kemoterapi sağlanmasına rağmen, bu aşamada tespit edilen hastaların sağkalım yüzdesi%6'ya düşer (Rawla vd. 2019).

2.1.6 Kanser histolojisi türleri

- Adenokarsinomlar; Yüksek diferansiyel, orta diferansiyel ve düşük diferansiyel.
- Müsinöz adenokarsinomlar; taşlı yüzük hücreli karsinom, lenfangiotik ve skiröz tip.
- Skuamöz diferansiyasyon gösteren karsinom; adenoskuamöz, saf skuamöz, saydam hücre komponentli karsinom, bazaloid karsinom.
- Koryokarsinomatöz diferansiyasyon gösteren adenokarsinom.
- Nöroendokrin diferansiyasyon gösteren adenokarsinom.
- Nöroendokrin tümörler; iyi diferansiye (karsinoid tümör), nöroendokrin karsinom, küçük hücreli karsinom.

2.1.7 Tümör yayılımı ve metastazı

Tüm kolon tümörleri, doğrudan komşu yapılara, lenfatikler ve kan damarları yoluyla uzak organlara yayılabilirler. Metastatik yayılım en sık bölgesel lenf nodları ve

karaciğere olur. Diğer sık görülen metastaz yerleri; periton, akciğer ve overlerdir. Daha nadir metastaz bölgeleri ise santral sinir sistemi, kemik, testis, uterus ve oral kavitedir (kumar vd. 2000).

2.1.8 Kolon kanseri tanı ve tedavi stratejileri

Kolorektal kanseri hastalarının kurtulma oranının öngörülmesi, hastanın hangi evrede olduğuyla yakından ilgilidir. Dolayısıyla, her kanserde olduğu gibi kolorektal kanserde de evre teşhisi tedavi yaklaşımlarının belirlenmesi ve tedavinin hastalığa olan etkisi açısından oldukça önemlidir. Bugün itibariyle farklı kimyasal, fiziksel ve biyolojik kaynaklardan yüzlerden fazla kanserojen tanımlanmıştır. Alman patolog Johannes Müller, malign dokuyu ilk kez 1836'da mikroskopi ile tanımladı ve bu hücrelerin normal hücrelere kıyasla dağınık, anormal özelliklerini not edilmiştir (Rupnarain vd. 2004).

Patofizyolojik anlayıştaki ilerlemeler, bireysel tedavi planlarına yol açan lokal ve ileri hastalık için tedavi seçenekleri dizisini artırmıştır. Çeşitli çevresel karsinojenler (sigara dumanı, endüstriyel emisyonlar, benzin buharları gibi), enflamatuar ajanlar (tümör nekroz faktörü (TNF) ve H₂O₂ gibi), tümör promotörleri (phorbol esterleri gibi) karsinogenezi aktive edebilmiştir (Vickers, 2000; Aggarwal ve Shishodia, 2006). Cerrahi, radyasyon tedavisi, immünoterapi ve/veya kemoterapi sıklıkla kanser tedavileri kullanılır (Chau ve Cunningham, 2006).

Son çalışmalar, uygun tarama ve tedavi yöntemlerinin kolorektal kanser ölüm oranlarını azalttığını göstermiştir. Kolorektal kanser ilerlemesi, adenomatöz poliplerin saptanması ve ortadan kaldırılmasıyla yavaşlatılabilir. Bu kolorektal kanser mortalitesi erken tespit ve tedavi ile azalır. Asemptomatik polipler ve erken evre kanserler oldukça yaygındır (Fenoglio-Preiser vd. 1999; Rosai, 2004; Christine vd. 2005). 50 yaşın üzerindeki çoğu kişinin ortalama kolorektal kanser riski olduğundan, düzenli olarak malignite ve polipler açısından kontrol edilmelidir. Aşağıdaki tarama prosedürleri önerilir:

- Yılda bir kez dışkı gizli kan testi etmektedir.
- Her 5 yılda bir esnek sigmoidoskopi etmektedir.
- Her 5-10 yılda bir çift kontrastlı baryum lavman ve kolonoskopi yapılmaktadır.

Dışkı gizli kan testi, birçok küçük tümörü ve prekanseröz lezyonu tespit etmek için spesifik olmayan ve yetersizdir. Bazı doktorlara göre, bu yıllık test her beş yılda bir esnek bir sigmoidoskopi ile desteklenmelidir. Esnek sigmoidoskopi ile keşfedilen adenomatöz polip, tüm bağırsağı kontrol etmek için kolonoskopi gerektirir (Read ve Kodner 1999).

2.1.8.1 KRK tanısında kullanılan cerrahi yöntemler

Kolorektal kanser için yaygın olarak yayılmayan ve metastaz kanıtı göstermeyen en sık tedavi ameliyatıdır. Cerrahi tedavi, ana lezyon ile birlikte lenf nodlarının da uzaklaştırılmasını sağlayabilen tek yöntemdir. Lenf nodlarının çıkarılması tedavinin iyileştiriliciği açısından oldukça kritiktir (Moss ve Nalankilli, 2017). Buna ek olarak bazı erken evre kolon kanser tümörleri ve polipleri minimal invaziv teknikler kullanılarak çıkarılabilir. Malignite oranı düşükse, lokalize olmuş, polip oluşturmuş ve erken aşamada olan kanserlerde kolonoskopi yaklaşımında elektrokoter kullanılır. Bu yöntemde, bir elektrik akımı yardımıyla kolon duvarından polip kesmek için tel kullanılır (Feagins 2019).

Polipektomi, histolojik inceleme için eksize edilmiş polipin çıkarılmasının yanı sıra kapsamlı ve güvenli polip eksizyonunu gerçekleştirmeyi amaçlamaktadır (Rutter ve Jover, 2020). Her ne kadar yaygın olarak güvenli bir operasyon olarak kabul edilmesine rağmen, tehlikesiz değildir. Polipektomi olan hastaların perforasyon veya kanama yaşama olasılığı daha yüksektir. Kanama ameliyat sırasında veya tamamlandıktan sonra (1-2 hafta içinde) meydana gelebilir (Feagins 2019).

Kolonoskop, kolonun iç astarındaki küçük malignitelerin ve kolon duvarındaki poliplerin etrafındaki sağlıklı dokuların anüs içine bir tüp yerleştirilerek ve daha sonra bu

tüpten hastalıklı bölgeye cerrahi aletler yerleştirerek minimal invaziv bir yaklaşımdır. Anüsten 15 cm'ye kadar olan tümörlere ulaşılabilir (Althumairi ve Gearhart, 2015). Lokal eksizyon, hareketli olan ve bağırsak ortamının % 30'undan fazlasını işgal etmeyen tümörler için kullanılabilir (Nastro vd. 2005).

Genellikle orta derecede farklılaşan ve düşük riskli histolojik özelliklere sahip submukozdan (T1) ayrılmış tümörler için kullanılır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, T2 rektal kanserin tedavisinde lokal eksizyon kullanımı 1989 ve 2003 arasında yaklaşık % 50 artmıştır. Lokal eksizyon artık T1 tümörleri için yaygın olarak kabul görmüş bir tedavi iken, T2 tümörlerine de uygulanmıştır. Bununla birlikte, T1 lezyonlarına kıyasla, T2 tümörlerinin transsanal eksizyonu, lokal nüks olasılığını kabaca iki katına çıkarmıştır (Park vd. 2018; Rutter ve Jover 2020). Bu oran tümörün eksik çıkarılması ile ilgilidir.

Laparoskopik kolektomi; Erken evre maligniteler için kolektomi sırasında kolonun küçük bir bölümü çıkarılır. Minimal invaziv kolektomi olarak da bilinen laparoskopik kolektomi, karında bir dizi küçük insizyonla gerçekleştirilir. Cerrahın kolonun bir kesi yoluyla çıkarıldığı ve bir insizyondan küçük bir video kamera ve diğer yaralardan spesifik cerrahi ekipman yerleştirerek vücut dışındaki kolonda tedaviyi gerçekleştirdiği bir ameliyattır. Kolon onarımını takiben, cerrah kesi boyunca kolona yeniden yerleştirilir. Bu ameliyattan sonra bildirilen nüks oranı düşüktür (Group 2004).

Daha ileri metastaz belirtileri olmayan derin invaziv polipler için, yukarıda tarif edilen minimal invaziv prosedürler yetersizdir ve cerrahi veya açık kolektomi gibi diğer lokal tedaviler gereklidir. invaziv cerrahi prosedürler; Açık kolektomi Daha ileri kanserler, kolonun daha fazla çıkarılmasını gerektirebilir. Laparoskopik kolektomi şu anda çok iyi sonuçlar vermiyor. Laparoskopik kolektomi ile karşılaştırıldığında, açık kolektomi açık cerrahi gerektiren daha müdahaleci bir prosedürdür. Cerrahın göbekte kolona ulaşmak için daha büyük bir insizyon yaptığı, daha sonra kanseri çıkarmak için kolonun veya kolonun tamamını kestiği bir tekniktir (Group 2004; Cirocchi vd. 2017). Birkaç açık kolektomi prosedürü vardır :

- Total kolektomi sırasında tüm kolon çıkarılır.

- Kolonun bir kısmının çıkarılmasını içeren kısmi kolektomi (subtotal kolektomi).
- Hemikolektomi, kolonun sağ veya sol tarafının çıkarılmasıdır.
- Proctokolektomi hem kolonun hem de rektumun cerrahi olarak çıkarılmasıdır (Haller vd. 2005).

Potansiyel olarak tedavi edilebilir kolorektal kanserden etkilenen hastalar için cerrahi birincil tedavidir. Lokalize maligniteler için, ana ve bölgesel lenf düğümlerinin açık cerrahi eksizyonu esastır. Cerrahi, sadece karaciğer ve akciğerde rezektabl (ekstrakte edilebilir) metastaz geliştiren ve ileri metastaz semptomları göstermeyen hastaların %25 ila %40'ında iyileştiricidir (Board 2020).

2.1.8.2 KRK tanısında kullanılan ablatif yöntemler

Ablatif tedavi teknikleri, genellikle karaciğer ile sınırlı kolorektal metastazları olan insanlar için bir seçenektir. En iyi, bireylerin karaciğerlerinde her biri üç milimetreden fazla olmayan üç veya daha az lezyona sahip olduğunda kullanılır. Radyofrekans ablasyonu, mikrodalga ablasyonu ve kriyoablasyon ablatif tedavinin örnekleridir (Nosher vd. 2015). Radyofrekans ablasyonu (RFA), karaciğer kanserlerini tedavi etmek için kullanılabilen bir başka minimal invaziv tedavidir (Nosher vd. 2015; Gruber-Rouh vd. 2016). RFA, Boyutu <3 cm olan kolorektal karaciğer metastazlarında da birinci basamak tedavi olarak kullanılabilir (Kennedy vd. 2006). 900 kHz'den az rezonans frekansı ile elektromanyetik radyasyon kullanır. Pıhtılaşma nekrozu, bir elektrot hedef lezyona yerleştirilerek ve yüksek frekanslı bir akım sağlanarak gerçekleştirilir. Sonuç olarak iyonizasyon ve sürtünme neden olur. 100 °C'yi aşan sıcaklıklar elektrik empedansını artırarak teslim edilebilecek enerji miktarını sınırlar. Bu, soğutulmuş ıslak elektrotlar ve salin infüzyonu kullanılarak önlenebilir. RFA probu, ultrasonografi veya BT gibi görüntü rehberliği ile birlikte sıklıkla kullanılır (Gruber-Rouh vd. 2016).

2001 yılında Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanan RFA tedavi yöntemi, çapı 3 cm'den küçük, 3 veya daha az lezyona sahip iyi seçilmiş bireylerde 5 yıllık sağkalım oranların %33'e kadar ulaştığını bildirmiştir. Tümör boyutu, RFA'yı takiben lokal

nüksün en kritik belirleyicidir ve daha büyük lezyonların yerel olarak başarısız olma olasılığı daha yüksektir (Nosher vd. 2015). Mikrodalga ablasyonu (MWA), son yıllarda kolorektal karaciğer metastazlarının tedavisi için potansiyel bir ablatif terapötik seçenek olarak ortaya çıkmıştır (Lauby-Secretan vd. 2018). Lezyona implante edilen iğne benzeri problemlerden 900 ila 2450 MHz aralığında elektromanyetik radyasyon üreterek çalışır. MWA, RFA gibi diğer ablatif yöntemlerle karşılaştırıldığında, daha büyük lezyonları birkaç iğne probu ile tedavi etme kapasitesinden dolayı daha homojen doku ısınmasına neden olabilir. Ayrıca doku karbonizasyonunu azaltır. Mikrodalga ablasyonu ayrıca, cilt yanıklarına neden olabilecek topraklama pedlerinin gereksinimini ve operasyon sürelerinin azalmasına da sahiptir (Simon vd. 2005). MWA genellikle ultrasonografi veya BT yönünde gerçekleştirilir (Gruber-Rouh vd. 2016).

Kriyoablasyon, artık yaygın olarak kullanılmasa da, malign tümörlerin tedavisinde kullanılan ablatif prosedürlerin en eskisidir. Kriyoablasyon tümörü dondurmak için sıvı oksijen veya azot kullanır (Haller vd. 2005). Kriyoablatif tedaviler, dokulardan termal enerjinin (ısı) uzaklaştırılmasıyla indüklenen kontrollü, lokal dondurmaya dayalı tedavilerdir; bu nedenle, bir enerji yoksunluğu yaklaşımı uygulanır (Baust vd. 2014). Kriyoablasyon, argonun infüze edildiği doku sıcaklıklarının $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ düşürüldüğü ve prob konfigürasyonuna bağlı olarak çeşitli boyutlarda bir buz topu oluşturulduğu lezyon içinde bir prob kullanılarak gerçekleştirilir. Buz topunda termal sensörü kullanılarak -40 ile $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasındaki sıcaklığı ölçülebilir. Bu yöntemde, dokuların ölümü tahmini -20 ila $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında gerçekleştirilir (Pathak vd. 2011). Yaşayabilir hücreler, kriyoablasyondan sonra yakındaki vasküler yapılarda hayatta kalır ve ek yayılma ve hasta hasarına neden olur. MWA ve RFA gibi diğer ablasyon tekniklerinde durum böyle değildir. Yerel bir ablatif işlem gerekiyorsa, kriyoablasyon yerine termal ablasyon yöntemleri yapılmalıdır (Guinney vd. 2015).

2.1.8.3 Embolizasyon

Embolizasyon, 5 cm'den fazla olan ve ablasyon ile tedavi edilemeyen tümörleri tedavi etmek için kullanılabilir. Ayrıca ablasyon ile birlikte kullanılabilir. Maddeler, bir embolizasyon operasyonu sırasında kan arterlerine enjekte edilir ve karaciğerdeki

kanser hücrelerine kan akışını önlemeye veya sınırlamaya çalışmak. Embolizasyon tedavisi, karaciğere yayılmış kolorektal kanseri tedavi etmek için kullanılan üç tipe ayrılır.

TAE (transarteriyel embolizasyon) kateter bazlı bir lokalizasyon tedavisidir. Kateter, iç uyluktaki küçük bir insizyonla artere konulduktan sonra karaciğerdeki hepatik arter içine geçirilir. Böylece, hepatik artere embolize malzemelerin uygulandığı bir terapidir. TAE'nin amacı, tümör nekrozuna yol açan tam bir arteriyel tıkanıklığa neden olmaktır (Gruber-Rouh vd. 2016).

Kemoembolizasyon (TACE), mikrokürelere gömülü kemoterapötik ilaçların hepatik arter yoluyla uygulanan embolizasyon malzemeleri ile birleştiren bir lokal tedavi türüdür. TACE, kemoterapiyi doğrudan tümörü besleyen arter içine enjekte edilerek, ardından arter oklüzyonu ile de yapılabilir (Nosher vd. 2015).

TACE'in fizyolojik öncüsü radyoembolizasyon da kullanılan bir yöntemdir. Radyoembolizasyon, doğrudan tümöre radyasyon vermek için reçine veya cam mikrokürelere implante edilmiş bir radyoaktif beta yayı kullanılan lokal bir tedavi türüdür. Bu tedavi türü ile daha yüksek radyoaktif dozajlar elde edilebilmektedir. Bunun sonucunda radyasyon uygulaması daha kısa bir mesafe geçirdiğinden, sağlıklı dokular tarafından daha az emilir (Solbiati vd. 2012; Nosher vd. 2015).

2.1.8.4 Kemoterapi

Kemoterapi, güçlü kimyasallar kullanarak malign hücreleri öldüren tıbbi bir tedavidir. Sistemsel, intravenöz olarak veya oral olarak uygulanır. Ayrıca, doğrudan bedensel bir bölgeye, tümöre, doğrudan maligniteye veya doğrudan cerrahi takiben kanserin bölgesine lokal olarak enjekte edilebilir (Prasad vd. 2016; Board 2020). Kemoterapi ilaçları oldukça güçlü olduğundan, vücudun iyileşmesine izin vermek için bir dinlenme dönemi ile uygulanırlar. Bulantı, kusma, iştah eksikliği, tükenme ve rahatsızlık dahil olmak üzere kişinin yaşam kalitesini düşüren bir takım olumsuz etkileri vardır. Klinikte

sıklıkla kullanılan kolorektal kanser kemoterapisi ilaçları arasında 5-florourasil (5-FU), kapetitabin (Xeloda), irinotekan (Camptosar), oksaliplatin (eloksatin), trifluridin ve tipracil (Lonsurf) bulunur. Kullanılan kemoterapi ilaçları kanser tipi, aşaması, genel sağlık ve geçmiş kanser tedavileri ile belirlenecektir (Goyle ve Maraveyas, 2005).

2.1.8.5 Radyoterapi

Kolon kanseri tedavisinde kullanımı nadirdir, ancak ameliyattan önce tümörü küçültmek, ameliyat sırasında tümör bölgesinde geride bırakılabilecek herhangi bir kanser hücrelerini öldürmek ve ameliyattan sonra tümörü küçültmek için kullanılabilir. Kanser, iç bir organa veya karnın astarına bağlı kalmıştır. Ayrıca, hareketsiz bölgelerde tümör lokalizasyonu, lokal perforasyon ve T4 veya T3 aşaması (N1-N2 artan ve/veya azalan kolon) dahil olmak üzere yüksek riskli durumlarda da kullanılır (Board, 2020).

Radyasyon tedavisi, tümör konumundaki kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için yüksek enerjili radyasyon (X-ışınları gibi) kullanan bir kanser tedavisi prosedürüdür. Bazı kolon ve rektal tümörler için eşzamanlı kemoterapi radyasyon tedavisinin etkinliğini artırabilir (Haddock 2017). Bu iki tedavinin kombinasyonu 'kemoradyoterapi' olarak bilinir (Zenda 2018).

2.1.8.6 İmmünoterapi

Vücudun kansere karşı doğal savunmalarını artırmayı amaçlamaktadır. Kimyasallar, bağışıklık sisteminin işlevini güçlendirmek, hedeflemek veya eski haline getirmek için vücuttan veya laboratuvarında üretilen kimyasalları kullanılır. Kontrol noktası inhibitörleri, kolorektal kanseri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir immünoterapi biçimidir. Bir kontrol noktası inhibitörü olan pembrolizumab, tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminden saklanmasını önleyen bir tümör hücresi reseptörü olan PD-1'i inhibe ederek metastatik kolorektal maligniteleri tedavi etmek için kullanılır. Nivolumab, bir dizi kanser türünü tedavi etmek için ve tedaviden sonra ilerlemiş veya kolorektal kanser yayılmış olan kişiler için kullanılır. Nivolumab ve

ipilimumab (Yervoy) da anti-kanser tedavisi olarak kullanılmaktadır. Nokta inhibitörleri ve kemoterapi kombinasyonu ile tedaviyi geliştiren veya yayılan metastatik kolorektal kanserli bireylerin tedavisi için lisanslanmıştır (Ganesh vd. 2019). İmmünoterapi, daha özel, belki daha az zararlı bir tedavi olarak umut veriyor gibi görünmektedir (Bever ve Le 2017).

Çizelge 2.1 KRK'nin tradisyonel tedavi yöntemlerinin önemli semptomları (ACS 2020)

	Geleneksel Tedavi yöntemleri	Semptomları
1	Ameliyatın potansiyel semptomları	Karaciğer enfeksiyonu
		Karın veya göğüs boşluğunda kanama
		Diğer organlara yayılmak
		Bacak damarlarındaki kan pıhtıları
		Miyde ve karın ağrısı
		Kanama
2	Ablasyon ve Embolizasyon semptomları	Cilt alerjisi
		Safra kesesi iltihabı
		Mide bulantısı ve İshal
		Karaciğerin damarlarında kan pıhtıları
		Ciddi derecede komplikasyonların oluşumu
		Radyasyon ameliyetten önce verilirse hastanın yara iyileşmemesine sebep olabilir
		Dışkıdaki kan veya ağrılı bağırsak hareketleri rektal inflamasyonuna yol açabilir.
3	Kemoterapi	Rahatsızlık
		İstifra ve ishal
		Diğer organlara yayılmak
		Kolayca vücut morarma veya kanama
4	Radyoterapi	Halsizlik
		Mesane iltihabı
		Dışkı kaçağı
		Ağız yaraları
		Tedavi edilen bölgedeki dokuların birbirine yapışmasına neden olan adezyonlar
		İştah, kilo ve saç kaybı
		Diğer organlara yayılmak
5	İmmünoterapi	Kaşıntı yanı sıra deri döküntüsü
		İshal

2.2 miRNA ve Görevleri'nin Araştırılması

miRNA'lar, kodlayıcı olmayan fakat DNA'nın kodlayıcı bölgesinden çevrilmeyen kısa RNA molekülleridir (yaklaşık 20-22 nükleotit) ve gen ekspresyonunu etkiler (Wang vd. 2017). miRNA adlandırması ve fonksiyonu 2001 yılında tamamen kabul edilmiştir (Lagos-quintana vd. 2001). miRNA'lar, 3' UTR bölgelerindeki hedef genlerinin mRNA'larına bağlanarak transkripsiyonu veya translasyonu inhibe eder (Lee vd. 1993). Normalde gen ekspresyonunu azaltan miRNA'lar, son zamanlarda ER homeostazının kritik düzenleyicileri ve UPR bağımlı sinyallemede önemli katılımcılar olarak ortaya çıkmıştır (Byrd ve Brewer 2013; Maurel ve Chevet 2013).

Biriken kanıtlar, mikroRNA ekspresyon paternlerinin bazı kanserlere özgü olduğunu ve klinik olarak prognostik faktörler olarak kullanılabileceğini göstermektedir. miRNA'ları biyobelirteçler olarak kullanmanın birçok avantajı vardır:

- miRNA'lar tümörigenez sürecine katılır.
- miRNA'lar kemoterapiye spesifik yukarı veya aşağı regülasyon yanıtı gösterir.
- Bazı miRNA paternleri hastaların sağkalımı ile ilişkili olabilir (Calin vd. 2005; Yanaihara vd. 2006).

Çok sayıda malignitedeki miRNA ekspresyon profilleri, kronik lenfositik lösemi, meme kanseri, pankreas kanseri ve akciğer kanseri dahil olmak üzere klinik özelliklere dayanan farklı ekspresyon paternleri ortaya çıkarır, bu da belirli miRNA'ların tanı ve prognostik göstergeler olarak kullanılabilmesini gösterir (Takamizawa vd. 2004; Calin vd. 2005; Iorio vd. 2005; Roldo vd. 2006; Yanaihara vd. 2006). Özellikle, Lu vd. miRNA ekspresyon profili oluşturmanın, zayıf farklılaşmış numunelerin kategorize edilmesinde mRNA ekspresyon profilini daha iyi performans gösterdiğini keşfetti. Potansiyel biyobelirteçler olarak aday miRNA'ların artan raporları olduğundan, bu, kolon kanseri için ortak miRNA biyobelirteçlerini keşfetmeyi önemli kılmaktadır. Bu miRNA'lar ve hedefleri, nihayetinde yeni terapötik hedefler geliştirme potansiyeli ile birlikteliklerinin daha iyi anlaşılması için daha fazla değerlendirme gerektirir. Sonuç

olarak, miRNA profil oluşturma önemli terapötik uygulamalara sahip olabilir (Lu vd. 2005).

2.3 miRNA'ların Kolon Kanseri Tanı ve Tedavisindeki Rolü

Moleküler biyoloji araştırması, kolon kanseri patogenezi anlayışımızı geliştirmiştir. Genom çapında mikroRNA'lar (miRNA'lar) ve mikrodizi bazlı mRNA ekspresyon profili oluşturma, kolon kanserinin fenotipik yönleri hakkında hayati bilgiler sunmuştur. Birincil önleme, dünya çapında artan kolorektal kanser yükünü azaltmak için en etkili tekniktir. Teşhis kritiktir, çünkü hastaya kolorektal kanseri önlemek için optimal bir sürveyans stratejisi, uygulanabilirse ekstrakolonik kanserler için optimal bir sürveyans stratejisi, olay kolorektal kanser durumunda optimal tedavi ve risk altındaki akrabalar için uygun sürveyans tavsiyesi sağlar (Jess vd. 2012).

2.4 Tezin Amacı

KRK metastazında yer alan sinyal yollarının analiz edilmesi, KRK gelişimi ve tedavisinin altında yatan mekanizmayı anlamak için kritiktir. KRK gelişimi ve metastazla ilişkili hedef genlerin yanı sıra KEGG yolak analizi aracı yardımıyla çeşitli hücresel sinyal yollarına odaklanmıştır. Bu araştırmanın amacı, insan kolon kanserinde biyoinformatik analiz yöntemlerinin kullanılarak potansiyel miRNA adaylarını ve *in siliko/in vitro* koşullarda bu miRNA'ların hedef genleri belirlemektir. Kolon kanseri hücre hatlarında miRNA'nın hedeflerini belirledikten sonra, bu genlerin ifadelerini belirlemek için HT-29 (ATCC HTB-38) ve normal hücre çizgisi CCD-18CO (ATCC-CRL-1459) kullanılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu çalışma, kamuya açık Kolorektal kanser hasta dokularından elde edilmiş GEO data setlerinin *in siliko* analizi ve kolon kanseri hücre serilerinde gerçekleştirdiğimiz *in vitro* çalışmalara dayanmaktadır. Bir sonraki bölümde bildirilen sonuçları üretmek için veri madenciliği, işleme ve istatistiksel analizde kullanılan yöntemleri ve parametreleri detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

Çalışmada etanol (TEKKIM, TK.200650.05001), metanol (Sigma-Aldrich, 67-66-3), fetal bovin serum (FBS) (SERENA, S-FBS-SA-025) , fosfat tamponlu salin (PBS) (BDL-001-500ML), kloroform (Tekkim, TK.911019.01000), L-glutamin (Serena, RGL-001-100ML), MEM-Eagle (Non-essential amino acid solution) (BI-Biological industries 01-340-1B 100 ML), Tripsin/EDTA (SERANA, RTL-005-100ML), penisilin/streptomisin (P/S) (Serana 01070121RAL), dimetil sülfoksit (DMSO) (SİGMA-ALORICH, SHBJ7919), nükleaz içermeyen su (THERMO SCİENTİFİC, R0582), cDNA sentez kiti (Thermo Fisher, 00698681), SYBR Green (WizPure, 2C0721-36), TRIsure reagent (Mrcgene, TR118), İzopropil Alkol (Sigma, 650447), Aquaguard-1(BI-Biological industries, 01-867-1B), falkon tüpleri (ABDOS), pipet uçları (ABDOS), PCR tüpleri (ABDOS), santrifüj tüpleri (İsolab), PCR plakaları (costar, 3598), cryo vial (ABDOS), hücre kültürü flaskları (EURUCLONE), hücre kültürü plakları (Abdos) ve serolojik pipetler (NEST) kimyasal ve sarf malzeme olarak kullanılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan biyogüvenlik kabini (Nükleon Laboratory Equipment), inkübatör (Sanyo), sıcak su banyosu (Olimpia), saf su cihazı (Elga), inverted mikroskopu (Olympus), tek ve çok kanallı otomatik pipetler (Eppendorf), vorteks (Biosan), yüksek devirli soğutmalı santrifüj (Eppendorf), mikro santrifüj (Eppendorf) , mikro hacim spektrofotometre (Epoch tm2), RT-qPCR cihazları (Corbett Research) kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

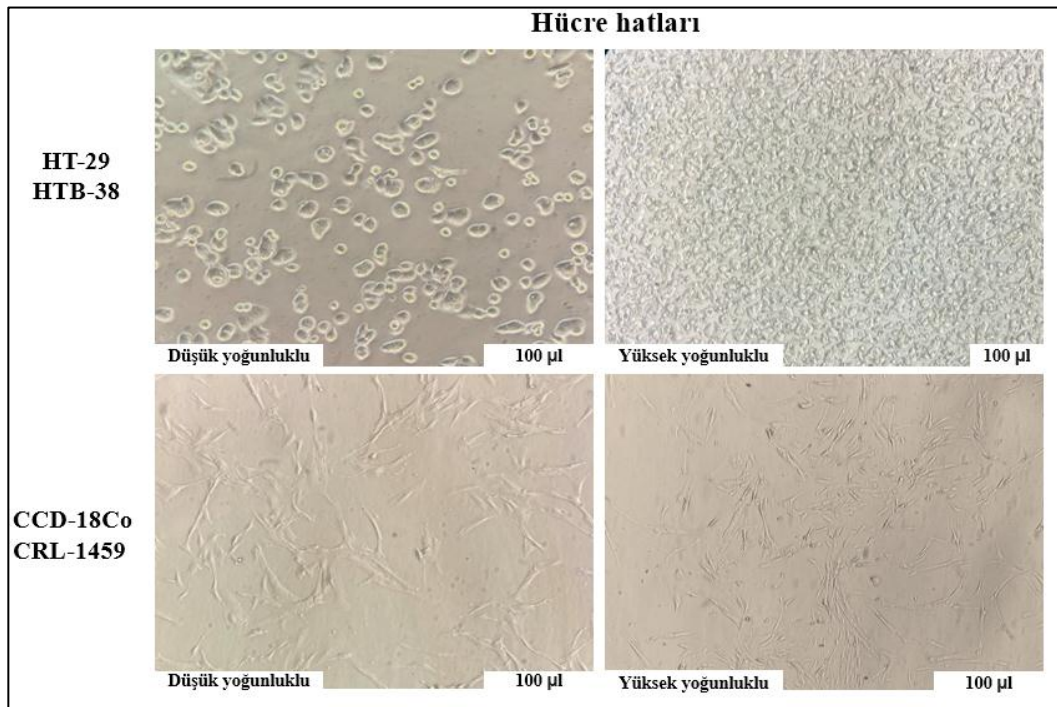
miRNA seçimi ve hedef genlerin belirlenmesi için kullanılan biyoinformatik analizler diferansiyel olarak ifade edilen miRNA'ların volkan grafikleri, GSE53592 ve GSE61741 veri setine GEO2R analiz aracıyla üretilmiştir. Kolon kanseri tanısında kullanılmak üzere yeni biyobelirteç bulmak amacıyla kolon kanseri doku ve serum örneklerinde ortak olarak ifade edilen miRNA'ları belirlemek için çevirimici Venn diyagram analizi gerçekleştirilmiştir (https://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate_venn.html).

Her iki veri setinde ortak olarak eksprese edilen miRNA'lar (hsa-let-7f-1-3p, hsa-miR-143-3p, miR-330-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-145-3p, hsa-miR-331-3p ve hsa-miR-1231) , DIANA-Tools'da (<http://www.microrna.gr/miRPathv2>) mirPath V.3 çevrimiçi aracı kullanılarak analiz edilmiştir (REFF ekle-benim makalede var). Bu çevrimiçi analiz aracı hedef miRNA'lar tarafından düzenlenen biyolojik yolları KEGG veritabanındaki (Kyoto Genler ve Genler Ansiklopedisi) sinyal yollarıyla eşleştirir.

Devamında ise hedef miRNA'lar tarafından ortak olarak en çok hedeflenen biyolojik yolak olan ECM-reseptör etkileşimi belirlendikten sonra bu sinyal yolağında diferansiyel değişmiş genler, *in siliko* web tabanlı TNMplot aracıyla (<https://tnmplot.com/analysis/>) analiz edilmiştir. Bu analiz aracı aynı kategorideki tüm örnekleri gruplayarak ve eşleştirilmiş bir Wilcoxon istatistiksel testi çalıştırarak bir Mann-Whitney U testi çalıştırarak, tüm genlerdeki farklı platform türleri arasında tümör ve normal örnekler arasındaki gen ekspresyonu değişikliklerini karşılaştırır. Sonuçlar hem kutu grafikleri hem de keman grafikleri ile görselleştirilebilir (Çimen vd. 2016). Sonrasında mRNA'ların 3'UTR'si içindeki miRNA'lar arasındaki bağlanma bölgelerinin tahmini için analiz, (<http://www.targetscan.org>) adresinde çevrimiçi olarak bulunan TargetScan veritabanı kullanılarak yapılmıştır. En son olarak ortak miRNA hedefleri belirlendikten sonra q-PCR yöntemi ile HT-29 kolon kanseri ve CCD-18Co sağlıklı kolon hücre serilerinde analiz edilmiştir.

3.2.1 Hücre kültürü

Çalışmamızda sağlıklı kolon epitel hücreleri CCD-18Co (ATCC-CRL-1459) ve insan kolon kanseri hücre hattı HT-29 (ATCC HTB-38) kullanılmıştır. Bu hücrelerden CCD-18Co, 2.5 aylık Afrika kökenli bir kız çocuğunun normal kolon dokusundan izole edilmiş fibroblast morfolojisi sergileyen bir hücre dizisidir. Bu hücre hattı için temel ortam, ATCC tarafından formüle edilmiş Eagle's Minimum Essential Mediumdur. Hücreler, bu medium içerisine %1 Penisilin/Streptomisin (P/S) 'dan, 20mM L-glutamin, %10 fetal bovin serumu eklenerek hazırlanmıştır besiyerinde büyütülmüştür. HT-29, 1964 yılında kolorektal adenokarsinomlu 44 yaşındaki Beyaz bir kadın hastadan elde edilen bir primer tümörden izole edilmiş epitel morfolojisine sahip bir hücre dizisidir. HT-29 hücreleri dondurma tüpündeki 1 ml besiyerinin üzerine 1 ml McCoy's besiyerinde ile çözüldü, santrifüj yapmadan hücreler 5 ml total besiyeri ile T25 flaskda kültür edildi ve %10 fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamin %1 penisilin/streptomisin içeren %1 non-essential amino asid içeren hücre besiyerinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren koşullarda büyütülmeye devam edildi. HT-29 epitel hücreleri ile CCD-18CO fibroblast hücrelerinin morfolojik görünümü aşağıdaki şekildeki gibi ayırt edilebilir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 İnsan kolon kanseri hücreleri HT-29 ve CCD-18Co

3.2.2 HT-29 ve CCD-18Co hücre serilerinden pellet toplaması ve saklanması

HT-29 hücreleri flasklara ekilip %80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra alt kültüre edilmiştir. Bunun için hücreler 2 kez 1xPBS ile yıkandıktan sonra %0.25 Tripsin-EDTA (inkübatörde 3 dakika bekletilerek) ile muamele edilip %10 FBS içeren uygun besi yeri içerisinde 15 ml'lik falkon tüplerde 3000 rpm hızda 3 dk santrifüjle toplanmıştır. Sonrasında %10 DMSO ve %90 FBS içeren 1 ml medium içerisinde dondurma tüplerine aktararak 1 gün -20⁰C de tutulup sonrasında -80⁰C'ye aktarıldı ve son olarak sıvı azot tankında saklandı. Genel olarak, CCD-18CO hücreleri de HT-29 hücrelerine benzer şekilde uygun yoğunluğa ulaştıktan sonra benzer 2 kez 1xPBS ile yıkandıktan sonra %0.25 Tripsin-EDTA damlacıklar şeklinde muamele edilerek 3-5 dk inkübatörde beklemiştir. İnkübatörde bekledikten sonra 5 ml %10 FBS içeren DMEM de toplanıp 15 ml falkon içerisinde 3 dk boyunca 3000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj yapıldıktan sonra supernatantı atılmıştır ve pelletler 1-2 ml hazır olan dondurma mediumu (freezing media) ile çözünüp dondurma tüpleri içerisinde -80'de saklanmıştır. Her iki hücre hattı da soğutma işlemi için -80'de 1 hafta bekletilip, sonrasında -196⁰C olan sıvı nitrojen tankına aktarılmıştır.

Bu hücrelerden 6 kuyucuklu plakalardan RNA izolasyon öncesinde pellet toplaması için eski medium uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuk için 2 ml 1xPBS ile yıkanmıştır. Sonrasında 100 µl Tripsin damlacıklar şeklinde her yere eşit şekilde dağıtılmış ve 3-5 dk inkübatörde beklemiştir. Sonrasında, tripsinin üzerine 900 µl soğuk 1xPBS ile eklenerek 2-3 kez süspanse edilmiştir ve her tüp üzerine (hücre hattı, araştırmacı adı, tarih) şeklinde yazılarak 8000 rpm'de 1 dk santrifüje tabi tutularak önce süpernatant kısmı atılmıştır. Devamında ise geri kalan 1xPBS'si uzaklaştırmak için toplanan pellet 10.000 rpm'de 10-15 sn santrifüje tabi tutularak RNA izolasyon aşamasına kadar -80⁰C de saklanmıştır.

3.2.3 CCD-18Co ve HT-29 hücre hatlarından RNA izolasyonu

RNA izolasyonu yapmak için, daha önceden -80⁰C'de bekletilen HT-29 kolon kanseri hücre hattı ve CCD-18Co normal hücre hattı pelletleri kullanılmıştır. Pelletler çıkartıp

çözülme beklenmeden üzerlerine 1 ml TRIsure (TR 118) eklemiştir ve homojenizasyon için pipetaj edilmiştir ve lizis için 20 dk oda sıcaklığında (24 °C) inkübe edilmiştir. Kullanılan 1 ml Trisure başına 200 µl kloroform veya 500 µl trisure başına 100 µl kloroform eklemiştir. Kapak tüpleri güvenli bir şekilde kapatıp ve 15 saniye boyunca vortex cihazı ile karıştırılmış ve 3-4 dk süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örnekler inkübasyon sonrası +4° C’de 15 dakika 12000 x g’de 15 dk santrifüj edilmişlerdir. Numune soluk yeşil, organik bir faz, bir interfaz ve RNA içeren renksiz bir üst sulu faza ayrıldıktan sonra sulu faz, RNA izolasyonu için kullanılmıştır.



Şekil 3.2 Manual RNA izolasyonu fazları

Faz ayırdıktan sonra RNA izolasyonu için toplanan faz 500 µl soğuk İzopropil Alkol eklenerek vorteks ile karıştırarak çöktürülmüştür. Kullanılan 1 ml trisure başına 500 µl izopropil alkol veya kullanılan 500 µl trisure için 250 µl kullanılmıştır. Örnekleri oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edip, ardından +4 °C’de 20 dakika boyunca 12.000 x g’de santrifüj yapılmıştır. Yıkama aşamasında süpernatantı atılıp, pelletler bir kez %75 etanol ile yıkanmıştır. Kalan etanol santrifüj ile uzaklaştırıldıktan sonra pellet kurultuldu uygun miktarda RNaz içermeyen su içinde çözülmüş ve nanodrop ile

konsantrasyon ölçümü yapıldıktan sonra cDNA (komplementer DNA) hazırlama aşamasına kadar -80° C de saklanmıştır.

3.2.4 RNA miktarının ölçülmesi

Nanodrop ile RNA miktarını ölçmek için -80 ° C’de bekletilen ve RNA izole edilmiş olan numuneler kullanılmıştır. Nanodrop ND-1000 spektrofotometre, numunelerdeki nükleik asitlerin kalitesini ve miktarını değerlendirmek için kullanıldı (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). cDNA, üreticinin talimatlarına göre bir ters transkripsiyon kiti (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) kullanılarak izole edilmiş RNA’dan sentezlendi. mRNA ifade analizleri için elde ettiğimiz RNA miktarları ve saflıkları çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 RNA ölçümleri ve A_{260}/A_{280} oranı

Örnek	RNA (ng/μl)	A_{260}/A_{280}
HT_29	671.953	2.006
	565.877	1.964
	1149.863	1.847
CCD_18CO	242.624	1.961
	518.717	1.949
	206.101	1.983

3.2.5 Komplementer/ Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

mRNA’ların tamamlayıcısı olarak sentezlenen DNA’ya cDNA (komplementer DNA) denir. cDNA oluşumu için gerekli olan enzim, Revers Transkriptaz enzimidir. Tüm mRNA’larda ortak olarak polyA kuyruğu bulunmaktadır. Sadece adenzin nükleotitlerinden oluşan bu uç, cDNA sentezi için gerekli olan oligo (DT) primerinin hedefidir. PolyA kuyruğuna bağlanan oligo (DT) primerinin oluşturduğu komplekse reverse transkriptaz enzimi bağlanır. Bu sayede cDNA sentezi yapılmış olur.

Real Time PCR yöntemi ile gerçekleştireceğimiz mRNA ifade analizleri öncesinde cDNA sentezi aşaması gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada 500–2000 ng RNA örneği'nden “RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit” kullanılarak tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Örnekler RT-PCR analizi öncesine kadar -20 °C’de bekletilmiştir.

3.2.6 cDNA sentez protokolü

1. Çizelgede yazan maddeler buz içerisinde eriyene kadar bekletilmiştir (Çizelge 3.2).
2. Bu basamak isteğe bağlıdır. Eğer şablon olarak kullanılan RNA çok fazla GC dizisi içeriyorsa 65°C’de 5 dakika inkübasyon yapılır.
3. Devamında 3. çizelgede yazan maddeler tüpe eklenir ve karıştırılır (Çizelge 3.3).
4. Sonrasında, 42°C’de 60 dakika inkübasyon yapılır. Eğer GC tekrarı fazla olan bir şablon ise, 45°C’ye kadar inkübasyon için sıcaklık yükseltilebilir.
5. 70°C’de ısıtma işlemi yapılır ve işlem sonlandırılır. Örnekler bu haliyle RT-PCR analizlerinde kullanılmak üzere hazır haldedir.

Çizelge 3.2 cDNA Sentezi için İlk Basamakta Gerekli Olan Maddeler

Şablon RNA	Total RNA veya poly(A) mRNA veya spesifik RNA	0.1 ng - 5 µg 10 pg - 0.5 µg 0.01 pg - 0.5 µg
Primer	Oligo (dT)18 primer veya Random Hexamer primer veya Gen-specific primer	1 µl 1 µl 15-20 pmol
Nükleaz içermeyen su		12 µl’ye tamamlayacak kadar
Total hacim		12 µl

Çizelge 3.3 cDNA Sentezi için Üçüncü Basamakta Gerekli Olan Malzemeler

5X Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNaz Inhibitor (20U/µL)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µl
Tüpte bulunan toplam karışım miktarı	20 µl

3.2.7 q-RT PCR yöntemi ile gen ifade analizleri

qRT-PCR gen ifade analizlerinde kullanılan primerler NCBI primer-blast aracı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kullanılarak tasarlanmıştır ve ticari olarak Sentebiolab Biyoteknoloji firmasından temin edilmiştir (Çizelge 3.4). Sonrasında cDNA'lar, real time (gerçek zamanlı) PCR ile spesifik primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir. qRT-PCR için Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master kullanılarak (Corbett Research) cihazında üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3-4). mRNA ifade ölçümü, $\Delta\Delta Ct$ (eşik döngüsü) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve gen ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) transkript seviyelerine göre normalize edilerek hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan primerlerin listesi

ITGA5	F-hITGA5: 5'-TCTTCCCCGCCATGTTCAACCC-3' R-hITGA5: 5'-AAGGTTGATGCAGGCCACAGGG-3'
COL4A6	F-hCOL4A6: 5'-CTCC TTGCCCTCACTCATAGC-3' R-hCOL4A6: 5'-GTCTCCCTTAGGCC CTTTAGG-3'
LAMA3	F-hLAMA3: 5'- ACCCAGGCCAAGGACCTGAGG-3' R-hLAMA3: 5'-GTGTTGCCCGATTAACATTG-3'
COL1A2	F-hCOL1A2: 5'-GAGGGCAACAGCAGGTTCACTTA-3' R-hCOL1A2: 5'-TCAGCACCACCGATGTCCAA-3'
COL5A2	F-hCol5A2: 5'-GACTGTGCCGACCCTGTAAC -3' R-hCol5A2: 5'-CCTGGACGACCACGTATGC-3'
ITGA3	F-hITGA3: 5'-GCCTGACAACAAGTGTGAGAGC-3' R-hTGA3: 5'-GGTGTTTCGTCACGTTGATGCTC-3'
GAPDH	F-GAPDH: 5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3' R-GAPDH: 5'- ACATCGCTCAGACACCATG -3'

Çizelge 3.5 qRT-PCR reaksiyon karışımı

cDNA	2 µl
Primer (F) 10mM	1 µl
Primer (R) 10mM	1 µl
dH ₂ O	1 µl
SYBR Green Master Mix	5 µl
Toplam Hacim 10 µl	

Çizelge 3.6 qRT-PCR reaksiyon koşulları

Aşamalar	Sıcaklık/Süre/Döngü
Ön Denatürasyon	95°C / 5 dk / 1
Denatürasyon	95°C / 10 sn / 40
Yapışma	52°C - 56°C / 10 sn / 40
Uzama	72°C / 30 dk / 40
Erime eğrisi	95°C / 5 sn / 1 65°C / 1 dk / 1
Bekleme	40°C / 10 sn / 1

3.3 miRNA'ların *in siliko* İfade Analizleri

Bu tez çalışmasının ana amacı doğrultusunda KRK ile bağlantılı olası miRNA biyobelirteçleri ve hedef gen ekspresyonu profilleri tanımlayabilmek için halka açık gen ekspresyonu omnibus veritabanından elde edilen (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) GSE61741 ve GSE53592 veri setleri kullanılmıştır, (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 GSE61741 ve GSE53592 veri setleri

GEO ID	Platformu	Örnekler (vakalar:kontroller)	ülke	yıl	kaynaklar
GSE61741	GPL9040 febit Homo Sapiens miRBase 13.0	28:90	ABD	2014	Keller vd.
GSE53592	GPL8786 [miRNA-1] Affymetrix Multispecies miRNA-1 Array	3:3	ABD	2014	Zhao vd.

GSE53592 ve GSE61741 mikrodizi veri kümelerini hasta ve kontrol doku/ serum örneklerini karşılaştırarak farklı şekilde ifade edilen miRNA GEO2R biyoinformatik analiz aracı kullanarak belirlenmiştir. GSE53592 veri seti 28 Nisan 2022 tarihinde GEO veritabanından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE53592>) indirilmiştir ve 3 kolorektal kanser örneği ve 3 sağlıklı/normal doku örneği içermektedir (Zhao vd. 2014). GSE61741 veri kümesi de doku örneklerine benzer şekilde GEO veri tabanı üzerinden (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE61741>) indirilerek GEO2R ile analiz edilmiştir. Bu data seti 28 hasta ve 94 sağlıklı bireylerden alınan serum örneklerini içermektedir (Keller vd. 2014). Farklı şekilde ifade edilen miRNA'lar bir $P < 0.05$ kriteri ve log kat değişimi (FC) > 0.58 kullanılarak seçilmiştir.

3.4 İstatistiksel Analiz

Tez çalışması kapsamında mRNA ekspresyon analizi $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile gerçekleştirildi (Livak ve Schmittgen, 2001). Veri analizi ve grafikler (GraphPad Prism 8) yazılım programı kullanılarak gerçekleştirildi (La Jolla, CA, ABD). Gruplar arasında karşılaştırmalar yapmak için Student t-test ve tek-yönlü ANOVA kullanılmıştır. Tekrarlanan üç deneyin ortalama \pm standart sapması elde edilen bulgularda ifade edilmiştir. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 GEO Data Setlerinin Seçilmesi ve *in siliko* Analizi

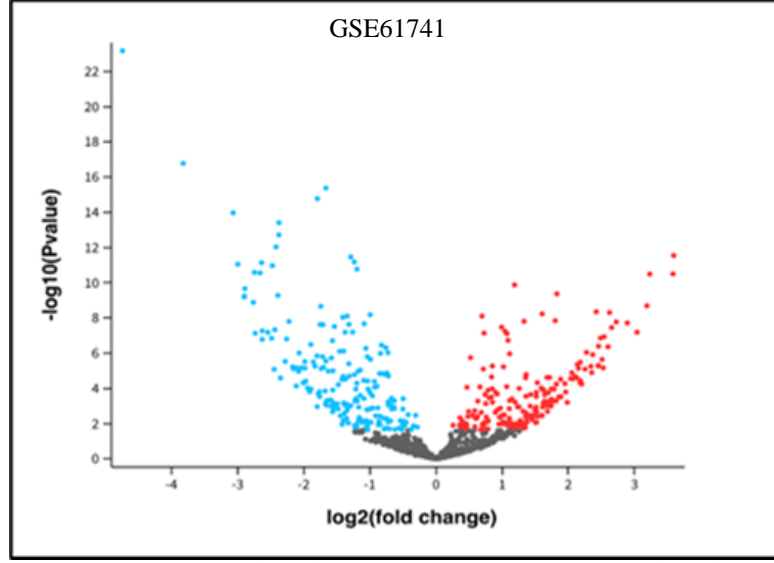
Bu tez çalışmasında halka açık GEO veri deposundan kolon kanseri ve sağlıklı bireyle doku ve serum örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiş miRNA ekspresyonu omnibus data setlerinin mikrodizi (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) verilerinden faydalanılmıştır (GSE53592, GSE61741) (Keller vd. 2014; Zhao vd. 2014). Kullandığımız GEO veri setleri ile ilgili detaylı bilgiler GSE53592 ve GSE61741 çizelge 4.1-4.2’de verilmiştir ve klinik ve patolojik verilerine de orijinal data üzerinden ulaşılabilir. GSE53592 data seti 3 tane kolon kanseri ve 3 tane sağlıklı doku örneği içerirken, GSE61741 data seti 28 kolon kanseri hasta serumu ve 90 sağlıklı bireylerden alınmış serum örneklerini içermektedir. Bu veri setlerindeki miRNA ifade değişim analizleri GEO2R çevirim içi analiz platformu üzerinden gerçekleştirilmiştir. GEO2R ile gerçekleştirdiğimiz analizler sonucunda GSE53592 data setinde 122 miRNA’nın ifadesi anlamlı şekilde değişirken GSE61741 data setinde 441 miRNA’nın ifadesi anlamlı şekilde değişmiştir. GSE53592 ve GSE61741 veri setlerine ait diferansiyel olarak değişen ilk 20 miRNA’nın listesi Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 ‘de gösterilmiştir. Çalışmamızda farklı ifade edilen miRNA’lar için anlamlı değişim $p < 0.05$ eşliğine göre log kat değişimi (FC) > 0.58 ’e olarak belirlenmiştir. GSE53592 data setinden elde edilen kolon kanseri doku örneklerinin sağlıklı doku örnekleri ile karşılaştırmalı olarak miRNA değişimlerinin Volkan grafiği Şekil 4.1’de, GSE61741 kolon kanseri hastalarının serum örneklerinin sağlıklı bireylerin serum örneklerine göre miRNA ifade değişimleri ise Volkan grafiği Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 GSE53592 en çok artan ve azalan miRNA'lar

miRNA_ID_LIST	P.Value	logFC
hsa-mir-182	3.19E-07	-2.99959
hsa-mir-195	2.06E-06	1.952579
hsa-mir-18a	1.32E-05	-1.40413
hsa-mir-181a-1	1.33E-05	1.557043
hsa-mir-1308	1.37E-05	-1.91075
hsa-mir-552	2.56E-05	-1.38637
hsa-mir-93	3.01E-05	-1.52409
hsa-mir-503	3.88E-05	-1.22777
hsa-mir-106b	4.13E-05	-1.20106
hsa-mir-132	4.36E-05	1.402346
hsa-mir-30a	4.81E-05	1.546431
hsa-mir-93	5.85E-05	-1.11964
hsa-mir-886	6.95E-05	-1.32744
hsa-mir-1307	7.00E-05	-1.30023
hsa-mir-181c	9.47E-05	1.462918
hsa-mir-128-1	1.21E-04	-1.2177
hsa-mir-422a	1.48E-04	1.042891
hsa-mir-18b	1.80E-04	-1.2852
hsa-mir-663b	2.04E-04	-1.26674
hsa-mir-21	2.04E-04	-1.07933

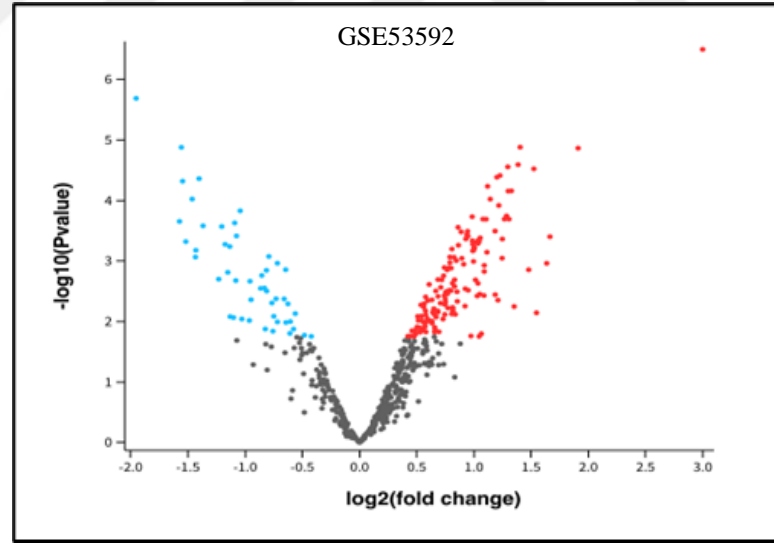
Çizelge 4.2 GSE61741 en çok artan ve azalan miRNA'lar

miRNA_ID_LIST	P.Value	logFC
hsa-miR-34a*	3.01E-24	4.83866
hsa-miR-934	1.69E-18	3.96762
hsa-miR-20b	6.17E-16	1.68206
hsa-miR-20a	1.91E-15	1.81852
hsa-miR-214*	3.22E-15	3.16534
hsa-miR-1251	4.12E-14	2.40975
hsa-miR-1324	8.42E-14	2.44363
hsa-miR-596	2.46E-13	2.50747
hsa-miR-216b	5.04E-12	2.69804
hsa-miR-545	5.21E-12	2.54652
hsa-miR-135a*	5.58E-12	-3.59863
hsa-miR-106a	6.75E-12	1.25565
hsa-miR-604	8.6E-12	2.7607
hsa-miR-640	9.34E-12	3.0417
hsa-miR-107	1.04E-11	1.27527
hsa-miR-1247	1.08E-11	2.83539
hsa-miR-17	3.64E-11	1.19421
hsa-miR-1246	5.89E-11	-3.58782
hsa-miR-892a	6.32E-11	-3.23171
hsa-miR-720	7.46E-11	-1.22119



Şekil 4.1 Volkan grafiği

GSE61741: Hastalar ve kontrollerde miRNA profilleri, kolon kanseri serum örnekleri vs normal, $p < 0.05$



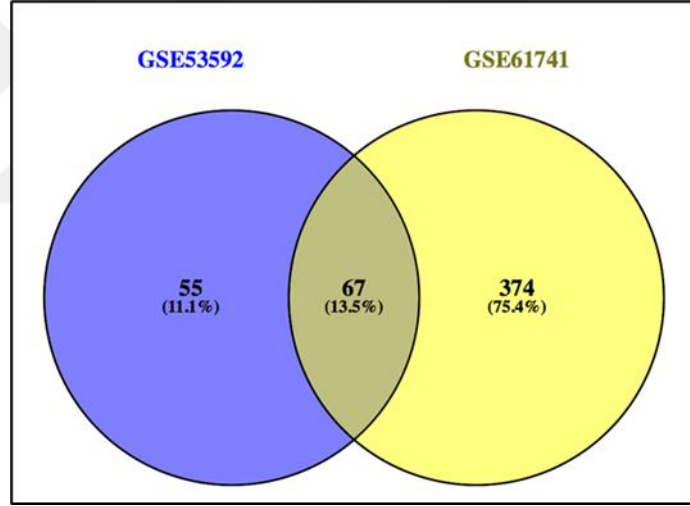
Şekil 4.2 Volkan grafiği

GSE53592: Kolon kanseri örneklerinden ekspresyon verileri, kolon kanseri (serum örnekleri) doku vs Tespit kontrol dokusu, $p < 0.05$

4.2 miRNA Biyoinformatik Analizleri

4.2.1 GSE53592 ve GSE61741 veri setlerinde ortak diferansiyel olarak ifade edilen miRNA'ların tanımlanması

In silico miRNA ifade analizi sonucu GSE53592 ve GSE61741 data setlerine ait anlamlı ifade değişimi gösteren miRNA'ları belirledikten sonra kanser dokusu ve serum örneklerinde ortak olarak değişen miRNA'ları belirlemek için çevrimiçi analiz metodları yardımıyla Venn şeması oluşturmuştur (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Venn şeması analiz sonucuna göre kolon kanseri doku ve serum örneklerini içeren her iki veri setinde ortak olan ve potansiyel kolon kanser biyobelirteci olarak kullanılabilen 67 miRNA belirlemiştir (Şekil 4.3).



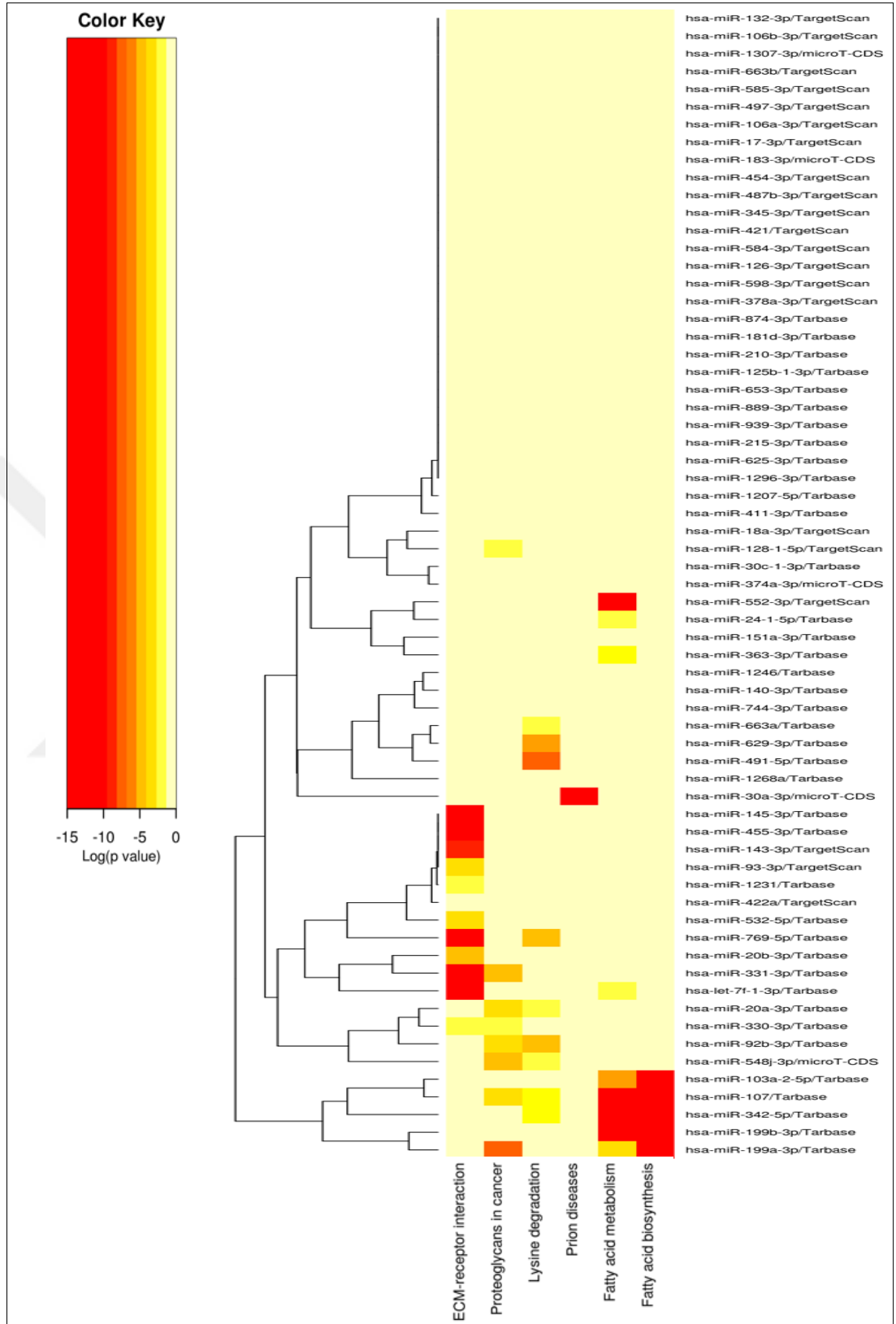
Şekil 4.3 Venn şeması ile gösterilen ortak değişen miRNA'lar

4.2.2 Belirlenen potansiyel biyobelirteç miRNA'ların hedeflediği sinyal yollarının *in silico* analizi

Kolon kanseri doku ve serum örneklerinde sağlıklı bireylerde gerçekleştirdiğimiz *in silico* analizlerinden elde edilen ve diferansiyel olarak ortak ifade edilen miRNA'ların biyolojik rolünü değerlendirmek için, yol zenginleştirme analizi için DIANA mirPath V.3 web tabanlı aracı kullanılmıştır

(<https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/mirpathv3/index.php?r=mirpath>) (Ioannis vd. 2017). DIANA-mirPath, DIANA-microT-CDS algoritması tarafından sağlanan tahmini miRNA hedeflerini (CDS veya 3'-UTR bölgelerinde) veya hatta DIANA-TarBase'den türetilen ve deneysel olarak doğrulanmış miRNA etkileşimlerini doğru istatistiksel analiz metotlarını kullanarak gösterebilen çevirim içi bir analiz aracıdır. Venn şeması analizi sonucu belirlediğimiz 67 miRNA ile ilişkili sinyal yollarını analiz ettiğimizde toplamda ortak diferansiyel olarak ifade edilen miRNA'larla ilgili 5 sinyal yolu ortaya çıkarıldı. Bu yollar Şekil 4.4'te bir Isı haritası olarak gösterilmiştir.





Şekil 4.4 Farklı olarak eksprese edilen miRNA'ların ısı haritası vs KEGG yolları

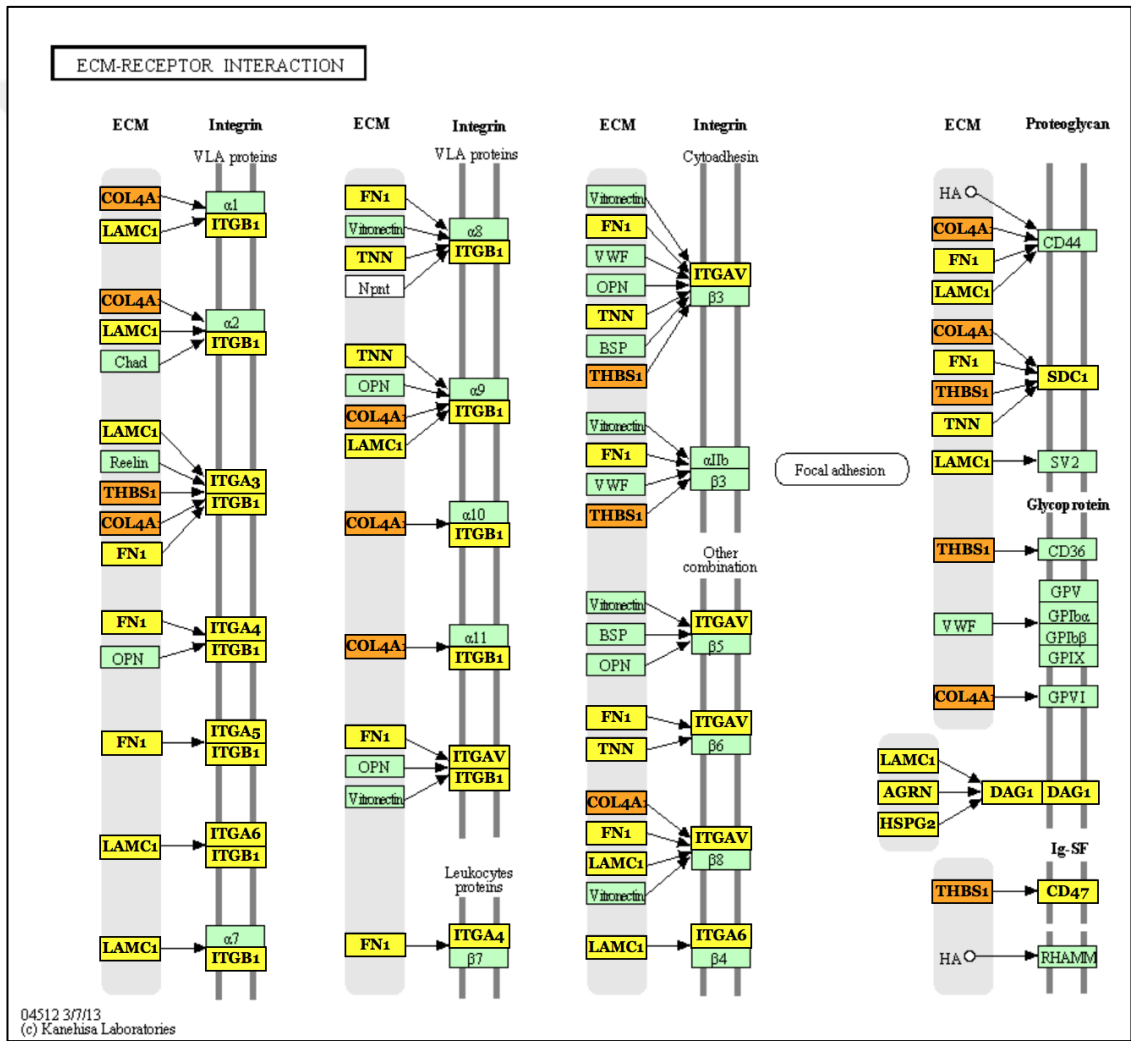
İsı haritası Diana-Mirpath V3.0 analiz aracı ile oluşturulmuştur. Düşük zenginleştirme p-değerleri turuncu ve kırmızı ile temsil edilirken, daha büyük zenginleştirme p-değerleri sarı renklerle temsil edilir

Daha sonra mirPath V.3 Diana-Tools üzerinden 67 miRNA ile bağlantılı olarak KEGG yollarını analiz edilmiştir. Bu program sorgulanan miRNA'ların ifadesinden etkilenen biyolojik yolları bulmak için KEGG veri tabanından yararlanılır (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) (genlerin kyoto ansiklopedisi ve Genomlar) (Vlachos ve Hatzigeorgiou 2017). Elde ettiğimiz bulgular sonucunda; Yağ asidi biyosentezi, Yağ asidi metabolizması, ECM-reseptör etkileşimi, Prion hastalıkları ve Lizin bozulması yollarının bu miRNA değişimlerinden anlamlı şekilde etkilenebileceğini belirlemiştir. Çizelge 4.3 KEGG yolları ve miRNAlar tarafından hedeflenen genlerin listesi verilmiştir. ECM-reseptör etkileşimi sinyal yolağı analiz sonuçlarımıza göre hem en çok miRNA'lar tarafından hedeflenen hem de istatistiksel olarak da anlamlı olması açısından ileri analizlerimizde kullanılmak üzere seçilmiştir (Şekil 4.5).

Çizelge 4.3 KEGG analizi sonucu en çok miRNA tarafından hedeflenen yollar ve genler

KEGG yolağı	p-değeri	#genler	#miRNAlar
Yağ asidi biyosentezi	<1e-325	FASN, ACSL3, ACSBG1, ACSL4, ACSL1	hsa-miR-103a-2-5p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-1999b-3p, hsa-miR-107
Yağ asidi metabolizması	<1e-325	FASN, ACADSB, ACSL3, PTPLB, ACOX1, ACSBG1, HADH, ACAA1, HADHA, CPT2, ACADVL, SCD, ACSL4, ACSL1, EHHADH, HSD17B12, ECHS1, ACAT1CDS, TECR, MECR	hsa-miR-552-3p, hsa-let-7f-1-3p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-103a-2-5p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-24-1-5p, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-107
ECM-reseptör etkileşimi	<1e-325	LAMB2, ITGB1, LAMA3, LAMB1, SDC1, THBS1, COL4A5, COL24A1, AGRN, ITGA5, ITGA3, HSPG2, COL6A1, LAMC3, ITGAV, COL4A, COL6A2, COL5A1, COL1A1, DAG1, COL1A2, LAMC1, COL6A3, COL4A6, FN1, TNC, ITGA4, ITGA6, TNN, COL5A2, CD47, COL4A1	hsa-miR-93-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-20b-3p, hsa-let-7f-1-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-145-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-1231
Prion hastalıkları	0.000664796	PRNP	hsa-miR-30a-3p
Lizin bozulması	0.01092594	WHSC1L1, SETD7, SETD1B, PLOD3, HADH, SETD2, NSD1, ASH1L, HADHA, SETDB1, SETD8, KMT2D, SUV420H1, DOT1L, WHSC1, SUV420H2, KMT2A, ALDH9A1, ECHS1, ACAT1, KMT2E, PLOD1, KMT2C, SETD1A, COLGALT1, ALDH2, EHMT1, KMT2B	hsa-miR-548j-3p, hsa-miR-92b-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-20a-3p, hsa-miR-107, hsa-miR-629-3p, hsa-miR-663a

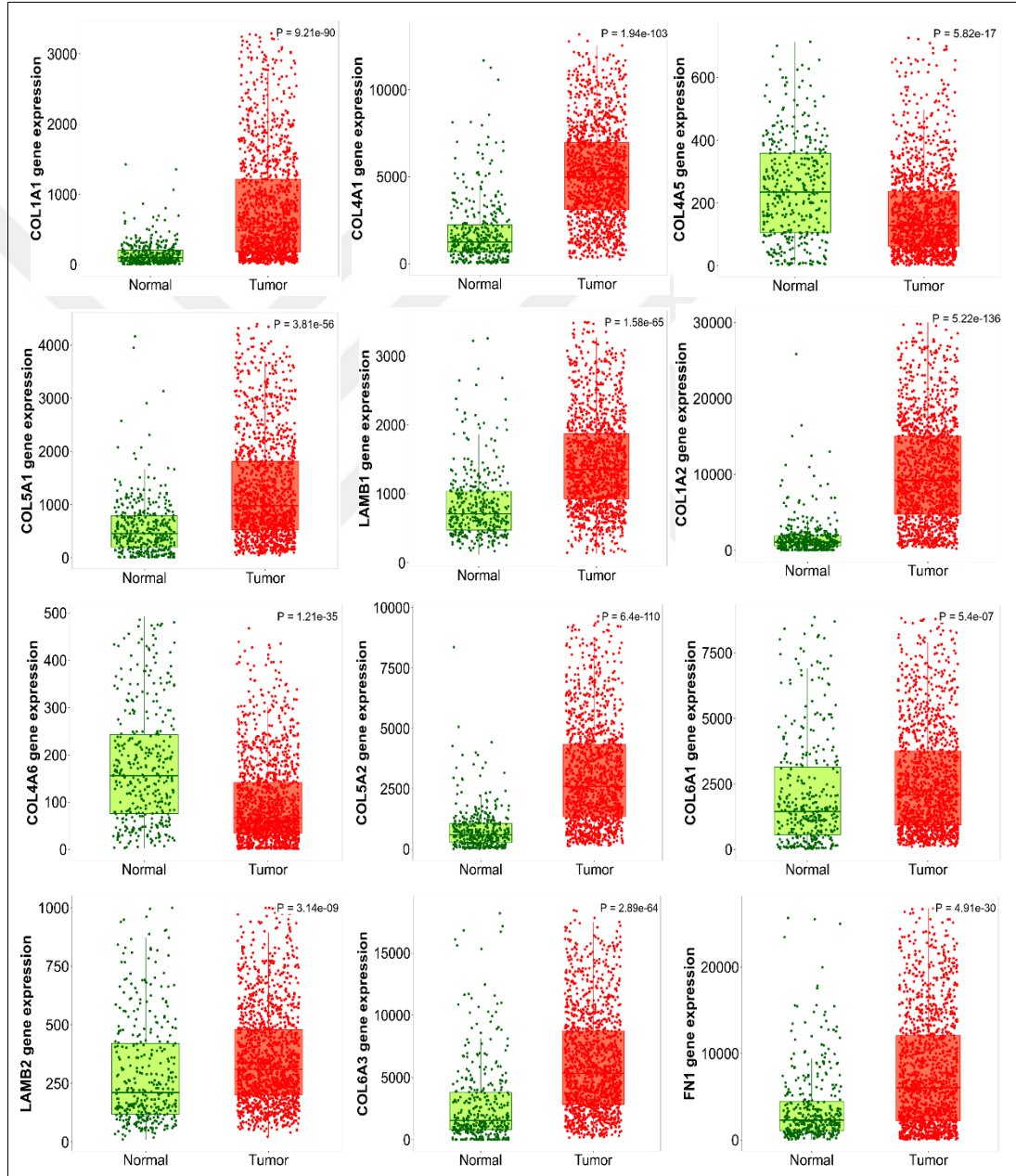
Kanser gelişimi süresince kanser hücrelerinin diğer doku ve organlara metastaz yaparak yayılabilmesi için ekstrasellüler matriksin (ECM) değişime uğrayarak ve ECM-hücre ilişkilerin zayıflatılması gerekmektedir. Bu işlem oldukça karmaşıktır ve hem translasyonel hem de transkripsiyonel olarak düzenlenmektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında ECM-reseptör etkileşimi sinyal yolağı üzerine odaklanılmıştır (Şekil 4.5). Öncelikle Çizelge 4.3’de gösterilen ortak miRNA hedef genlerinin TNMplot çevirimiçi analiz aracı yardımıyla kolon kanser dokuları ve kontrol/sağlıklı dokulardaki ifadelerini değerlendirilmiştir (Şekil 4.6 A ve B, Çizelge 4.4).



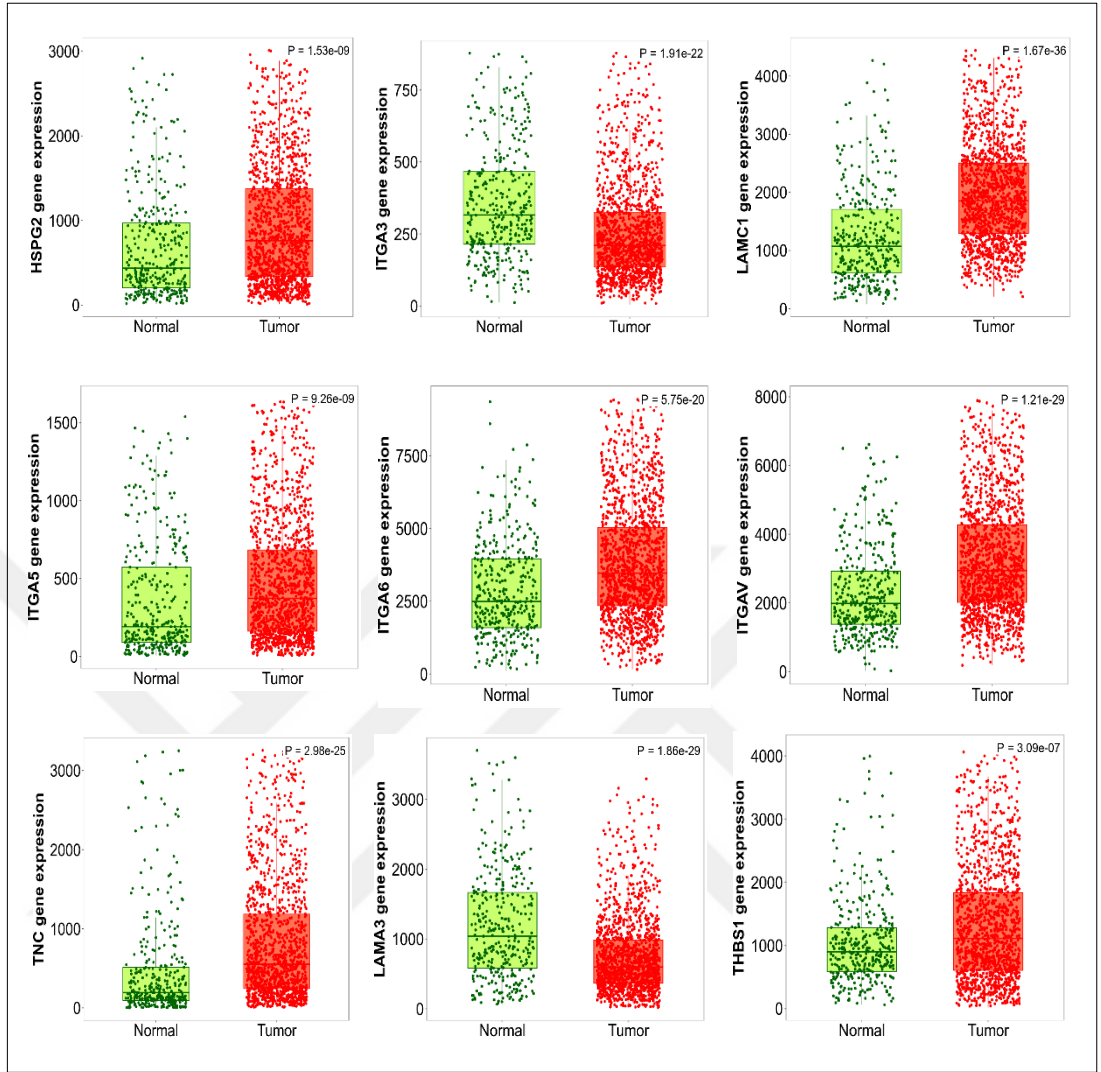
Şekil 4.5 ECM Reseptör etkileşim yolağının Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi KEGG yolak haritası

Yolak haritası KEGG veri tabanından indirilmiştir (<https://www.kegg.jp/>)

TNM çizgi analiz aracı, halka açık RNA-Seq tabanlı veriler kullanılarak seçilen bir doku tipinde seçilen bir gen için ayrıntılı analiz sağlar. TNMplot diferansiyel gen analizi verilerine göre normal ve kolon kanseri tumor dokularında LAMA3, ITGA5 ve COL4A6 genlerinin sırayla 0.53, 0.65 ve 0.42 kat ifadeleri azalırken, ITGA3, COL1A2 ve COL5A2 gen ifadelerinin de sırayla 1.96, 8.7 ve 4.62 kat arttığını bulgulamıştır (Çizelge 4.4).



Şekil 4.6 Normal ve Kolon Kanseri Dokularında diferansiyel gen ekspresyon analizinin TNM çizim analizi



Şekil 4.6 Normal ve Kolon Kanseri Dokularında diferansiyel gen ekspresyon analizinin TNM çizim analizi (devam)

Çizelge 4.4 Mann-Whitney analizine göre, TNM çizim analizine göre ekspresyon değişiklikleri görüntülenen ECM-Reseptör Etkileşim yolağında yer alan genlerin kat değişimlerinin sayısal verileri

GEN	Mann_Whitney.p.	Fold.change..median.
LAMB2	3.14e-09	1.42
ITGB1	1.24e-06	1.07
LAMA3	1.86e-29	0.54
LAMB1	1.58e-65	1.93
SDC1	3.99e-09	0.85
THBS1	3.09e-07	1.28
COL4A5	5.82e-17	0.55
AGRN	5.91e-03	1.23
ITGA3	9.26e-09	1.96
ITGA5	1.91e-22	0.65
HSPG2	1.53e-09	1.66
COL6A1	5.4e-07	1.46
LAMC3	7.73e-05	0.82
ITGAV	1.21e-29	1.5
COL4A1	1.94e-103	4.06
COL6A2	5.22e-03	0.95
COL5A1	3.81e-56	2.39
COL1A1	9.21e-90	6.27
DAG1	3.33e-03	0.95
COL1A2	5.22e-136	8.7
LAMC1	1.67e-36	1.68
COL6A3	2.89e-64	3.57
COL4A6	1.21e-35	0.42
FN1	4.91e-30	2.69
TNC	2.98e-25	2.92
ITGA4	3.44e-01	0.92
ITGA6	5.75e-20	1.43
TNN	2.04e-04	0.85
COL5A2	6.4e-110	4.62
CD47	9.05e-02	1.1
COL4A1	1.94e-103	4.06

Tez çalışmasının devamında TNM çizgi analizine paralel olarak her iki data setinde ortak olarak değişen miRNA'ların KEGG yolağı analiz sonuçlarına göre ECM-reseptör

interaksiyon yolağında ifade edilen genlerin 3'UTR (3'kodlanmayan bölge, İng:Untranslated Region)'larına bağlanıp bağlanmadığını tahmin etmek için çevirim içi analiz aracı olan Targetscan (<http://www.targetscan.org>) programını kullandık. Elde ettiğimiz sonuçlara göre TNM çizgi analizine göre ECM-reseptör interaksiyon yolağı ile ilgili ve anlamlı ifade değişimi gördüğümüz genlerin (LAMA3, ITGA3, ITGA5, COL1A2, COL4A6, COL5A6) 3'UTR bölgelerinin ortak ifade edilen miRNA'lerden bazıları ile (hsa-miR-331-3p, hsa-miR-145-3p, hsa-miR-1231, hsa-let7f-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-331-3p) etkileşime girip bu genleri transkripsiyonel seviyede düzenleyebileceğini göstermiştir (Şekil 4.7 A ve B).

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context+ score
A Position 151-157 of ITGA5 3' UTR hsa-miR-331-3p	5' ... CUUGAAGGGCCAGAGCCAGGGGG... 3' AAGAUCCUAUCCGGGUCCCG	7mer-m8	-0.03
Position 598-604 of ITGA5 3' UTR hsa-miR-145-3p	5' ... AGCCCAGCUCCAAGGGGAUUCAG... 3' UCUUGUCAUAAAGGUCCUUAGG	7mer-A1	-0.02
Position 347-353 of ITGA5 3' UTR hsa-miR-1231	5' ... UCACAGUUCUUUGGCGCAGACAU... 3' CGUCGACAGGCGGGUCUGUG	7mer-m8	-0.06
Position 820-826 of ITGA5 3' UTR hsa-miR-1231	5' ... GGAACCUCAGCCUGGCCAGACAC... 3' CGUCGACAGGCGGGUCUGUG	7mer-m8	-0.02
Position 954-960 of ITGA5 3' UTR hsa-miR-1231	5' ... UCCUCACCCUUGGCACAGACAC... 3' CGUCGACAGGCGGGUCUGUG	7mer-m8	-0.08
Position 1280-1286 of COL4A6 3' UTR hsa-miR-1231	5' ... UAAACUGUGCCAAUACAGACAAA... 3' CGUCGACAGGCGG--GUCUGUG	7mer-A1	-0.12
Position 102-108 of LAMA3 3' UTR hsa-miR-1231	5' ... CACUCAGGACACAAACCAGACAG... 3' CGUCGACAGGCGGGUCUGUG	7mer-m8	-0.04
Position 765-771 of COL1A2 3' UTR hsa-let-7f-1-3p	5' ... UAAAUUGUACCUAUUUUGUAU... 3' CCCUCCGUUAUCUAACAUUUC	7mer-m8	-0.02
Position 122-128 of COL5A2 3' UTR hsa-let-7f-1-3p	5' ... GAUCCUGCAUCAGCAUUGUAU... 3' CCCUCCGUUAUCU-AACAUUUC	7mer-m8	-0.04

Şekil 4.7 GSE53592 ve GSE61741 data setlerinde ortak ifade edilen miRNA'ların ECM-Reseptör İnteraksiyon yolağı ile ilişkili genlerin 3' UTR dizileri arasındaki öngörülen bağlanma bölgelerinin TargetScan analizi

A) hsa-miR-331-3p, hsa-miR-145-3p, hsa-miR-1231, hsa-let7f-1-3p miRNA'larının ITGA5, COL4A6, LAMA3, COL1A2 ve COL5A2 genleri arasındaki olası bağlanma bölgeleri

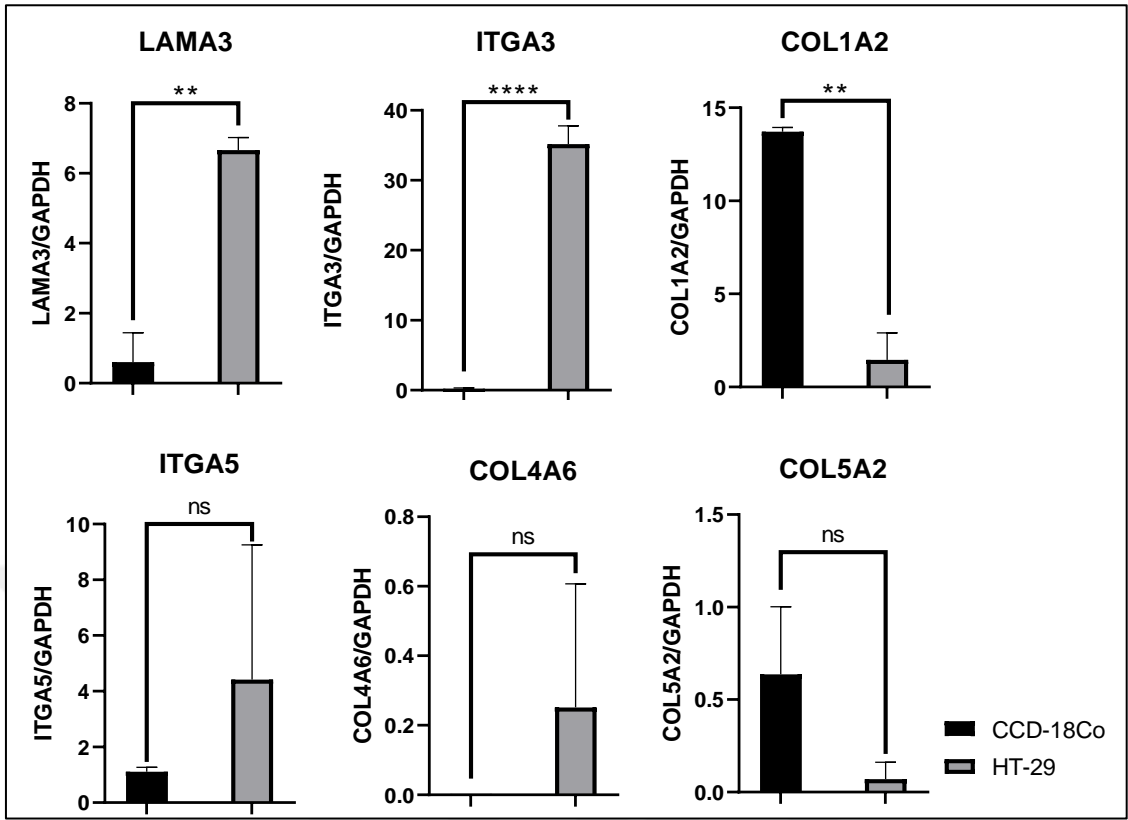
	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score
B	Position 3369-3375 of ITGA3 3' UTR hsa-miR-769-5p	5' ...UUUUUUUUGAGACCGGGUCUCAG... 3' UCGAGUCUUGGGUCUCCAGAGU	7mer-A1 -0.03
	Position 4251-4257 of ITGA3 3' UTR hsa-miR-1231	5' ...GGAAGAAAGAAUGAUCCAGACAG... 3' CGUCGACAGGCGGGUCUGUG	7mer-m8 -0.04
	Position 1687-1693 of ITGA3 3' UTR hsa-miR-145-3p	5' ...CUGGCCCCUGCUCUCAGGAAUCC... 3' UCUUGUCAUAAAGGUCCUAGG	7mer-m8 -0.02
	Position 3450-3456 of ITGA3 3' UTR hsa-miR-145-3p	5' ...GACCUCUGGGGCUCAAGGAAUCU... 3' UCUUGUCAUAAAGGUCCUAGG	7mer-m8 -0.02
	Position 765-771 of COL1A2 3' UTR hsa-let-7f-1-3p	5' ...UAAAUUGUACCUUUUUGUAU... 3' CCCUCCGUUAUCUACAUAUC	7mer-m8 -0.04
	Position 122-128 of COL5A2 3' UTR hsa-let-7f-1-3p	5' ...GAUCCUGCAUCAGCAUUGUAU... 3' CCCUCCGUUAUCU-AACAUAUC	7mer-m8 -0.04

Şekil 4.7 GSE53592 ve GSE61741 data setlerinde ortak ifade edilen miRNA'ların ECM-Reseptör İnteraksiyon yolağı ile ilişkili genlerin 3' UTR dizileri arasındaki öngörülen bağlanma bölgelerinin TargetScan analizi (devam)

B) miR-769-5p, hsa-miR-1231, hsa-miR-145-3p, hsa-let7f-1-3p miRNA'larının ITGA3, COL1A2 ve COL5A2 genleri arasındaki olası bağlanma bölgeleri

4.3 q-RT PCR Yöntemi ile ECM-Reseptör İnteraksiyon Yolağında İfade Edilen Bazı miRNA Hedef Genlerinin *in vitro* Analizi

In silico TNM çizim analizi ve Targetscan miRNA-mRNA bağlanma tahmin analiz verilerini göz önüne alarak, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-145-3p, hsa-miR-1231, hsa-let7f-3p, hsa-miR-769-5p, ve hsa-miR-331-3p miRNA'larının hedeflediği ve ECM-Reseptör İnteraksiyon yolu ile ilgili genlerinin ekspresyonlarını araştırmak için ITGA5, COL4A6, LAMA3, COL1A2 ve COL5A2 gen ifadelerine kolon kanseri hücre hattı HT-29 ve CCD18-co sağlıklı kolon hücrelerinde q-RT PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. LAM3 ve ITGA3 gen ifadelerinin kolon kanseri hücre hatlarındaki ifadesinin sağlıklı kolon hücre hatları ile kıyasla anlamlı bir şekilde artarken COL1A2 gen ifadesinin ise önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. ITGA5, COL4A6 ve COL5A2 ifadelerinin ise önemli oranda değişmediği bulunmuştur. Bu sinyal yolağında yer alan genlerin kanserdeki rolleri çizelge 4.5'de özetlenmiştir.



Şekil 4.8 ITGA5, COL4A6, LAMA3, COL1A2 ve COL5A2 miRNA hedef genlerinin HT-29 kolon kanseri hücrelerindeki ifadelerinin ve CCD-18Co sağlıklı kolon hücrelerine göre olan nispi ifade değişimlerinin q-RT-PCR yöntemi ile analizi (* $P \leq 0.05$).

Çizelge 4.5 Hedef genlerin hücresel işlevleri

	Genler	Kaynakları	İşlevleri
1	COL1A2	(Li vd. 2016; Niu vd. 2021)	COL1A2, kolon kanserinde anahtar gen olarak davranır. CRC dokularındaki COL1A2 mRNA ekspresyonu, tümör farklılaşması, invazyon derinliği ve lenf nodu metastazı ile pozitif korelasyon gösterilmiştir.
2	COL4A6	(Ikeda ve Iyama, 2006)	Hücre davranışında tip IV kollajenin $\alpha 6(IV)$ (COL4A6) anjiyogenez, hücre büyümesi, hücre yapışmasında ve tümör hücre istilasında aktif rol oynadığı bilinmektedir.
3	COL5A2	(Fischer vd. 2001; Chen vd. 2018; Zeng vd. 2018)	Kollajen Tip V $\alpha 2$ zinciri (COL5A2), kolorektal kanser, meme tümörü ve osteosarkom gelişiminde rol alır. Görevleri arasında bağışıklık sistemi regülasyonu, anjiyogenez ve tümör metastazını düzenleme vardır.
4	ITGA3	(Denadai vd. 2013; Lustosa vd. 2014)	ITGA3 geni ile lenf nodu ve uzak metastaz arasında bir bağlantı vardır. (TNM III ve IV).
5	ITGA5	(Yu vd. 2019)	Integrin $\alpha 5$ (ITGA5) Integrin ailesinin bir üyesidir. Hücre dışı matris (ECM) ile farklı hücreler arasında veya hücreler arasındaki iletişimi indükleyerek kanser hücresi metastazını ve istilasını teşvik etmede önemli bir rol oynar.
6	LAMA3	(Parsons vd. 2008)	LAMA3 geni, hücre yapışması, sinyal transdüksiyonu ve hücre farklılaşmasında rol oynar ve mutasyonları daha önce beyin kanserinde bildirilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kolon kanseri, küresel olarak erken ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Yeni tedavi seçenekleri ve hastalığı önleme konusundaki önemli araştırmalara rağmen, ölümlerin sayısı artmaya devam etmektedir. 2020 verilerine göre, kolorektal kanser, tüm dünyada erkeklerde kanser mortalitesinin ikinci, kadınlarda ise üçüncü nedenidir (Dyba vd. 2021). Dünyada ve ülkemizde toplam ölüm sayısında da ikinci sırada yer almaktadır. Dünyadaki her altı ölümden yaklaşık birinden ve topluluğumuzdaki her beş ölümden birinden sorumludur (TÜİK 2016; WHO 2018). 2020’de 1.9 milyondan fazla kolorektal kanser vakası tespit edilirken ve ayrıca kolon ve rektum kanseri nedeniyle 935,000 ölüm bildirilmiştir (WHO 2020). Kolorektal kanser en sık görülen gastrointestinal kanserdir. Kanserle ilişkili ölümlerde üçüncü sırada, ortalama %55 sağkalım oranına sahiptir (IARC 2018). Sebze ve meyve içermeyen gıdaların tüketimi, fiziksel aktivite/egzersiz eksikliği, tütün ürünleri, aşırı alkol tüketimi ve tehlikeli kimyasallara maruz kalma gibi değişen çevresel faktörler nedeniyle kolon kanseri insidansı günümüzde sürekli artmaktadır. Bu faktörler en büyük çevresel kanser risk faktörlerinden bazılarıdır (Ouakrim vd. 2015). Bununla ek olarak, kanser insidansının 2040 yılına kadar 28,5 milyon olguya yükselmesi beklenmektedir. Ayrıca her üç kişinin hayatlarının bir noktasında kanser yakalanması öngörülmektedir (Sung vd. 2021).

Teşhis süreci oldukça kritiktir, çünkü hastaya kolorektal kanseri önlemek için optimal bir sürveyans stratejisi uygulanabilirse ekstrakolonik kanserler için optimal bir sürveyans stratejisi ve risk altındaki akrabalar için de uygun sürveyans tavsiyesi sağlar. IARC, halihazırda mevcut dışkı bazlı testler (guaiac testi ve fekal immünokimyasal test [FIT]) ve düşük endoskopi (sigmoidoskopi ve kolonoskopi) ile kolorektal kanser taramasının kolorektal kanserden ölüm riskini azalttığı ve faydaların risklerden daha ağır bastığı sonucuna varmıştır (Lauby-Secretan vd. 2018).

Çoğu hasta genellikle hastalık orta veya geç aşamalarda tıbbi yardım almaktadır ve bu nedenle tedavi ve prognoz süreci kasvetlidir (Barton vd. 2007). Kolon kanseri hastalarının ölümlerinin çoğu tümör metastazının bir sonucudur (Rl vd. 2017).

Semptomlar ortaya çıktıktan sonra kolon kanseri olan kişilerin çoğunluğu kolayca teşhis edilir. Kolon kanseri şüphesi olan hastalarda asemptomatik veya şüpheli mide rahatsızlığı, meteorizm, değişken bağırsak hareketleri ve erken evrelerde rektal kanama semptomları olabilir (Özbal vd. 2003).

Uygun tarama yöntemiyle erken evrelerde tespit edilecek birçok KRK vakası ve sebep olacağı ölümler önlenebilir (Fenoglio-Preiser vd. 1999; Rosai 2004; Christine vd. 2005). Yapılan çalışmalar, uygun tarama yöntemleri ve tedavi ile kolorektal kanserden kaynaklı ölüm sayılarının azaltılabileceğini göstermiştir. 50 yaş ve üzerindeki bireyler ortalama kolorektal kanser riskine sahip olduğundan, düzenli olarak malignite ve polipler için taranmalıdır (Read ve Kodner, 1999). Meester ve arkadaşları, KRK tarama prevalansının 2018 yılına kadar % 80'e çıkarılması durumunda, 2030 yılına kadar da 277.000 KRK vakasını ve 203.000 ölümü önleyeceğini öngörmüşlerdir (Meester vd. 2015).

Kolorektal kanser, başlıca üç primer moleküler gruplara sahip heterojen bir hastalıktır (Prenen vd. 2013). En yaygın tür, belirli onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonların birikimi ile tanımlanan kromozomal instabilitedir (Lengauer vd. 1997; Pino ve Chung 2010). İkincisi, genetik hipermutabiliteye yol açan DNA uyuşmazlığı onarım genlerinin disfonksiyonunun neden olduğu Mikrosatellit Instant grup'dur. CpG adası (C;sitozin-P;fosfat-G;Guanin) metilasyon fenotipe ise hipermetilasyon ile ayırt edilen üçüncü gruptur. Kolorektal kanser alt tipi, genom çapında gen ekspresyon profili kullanılarak büyük hasta kohortlarında da incelenmiş ve çok sayıda moleküler sınıflandırma şeması geliştirilmiştir (Chan vd. 2002). 2012 yılında, Kanser Genom Atlası (TCGA) projesi kapsamında gerçekleştirilen ekzom sekanslaması sonucunda, DNA kopya sayısı, promotör metilasyonu, mRNA ve miRNA ekspresyonu dahil olmak üzere 276 kolorektal kanser örneğinin tam genomik profillemesinin sonucunu yayınlanmıştır (Muzny vd. 2012).

miRNA'lar, gen ekspresyonunu düzenleyen, kodlayıcı olmayan ve DNA'nın kodlayıcı bölgesinden çevrilmeyen yaklaşık 20-22 nükleotit uzunluğunda kısa RNA

molekülleridir (Wang vd. 2017). miRNA adlandırması ve fonksiyonu 2001 yılında kabul edilmiş ve günümüzdeki halini almıştır (Lagos-quintana vd. 2001).

Öncesinde 1993 yılında miRNA'ların keşfedilmesi ilk kez *C. elegans* organizmasında gerçekleştirilmiştir (Lee vd. 1993). miRNA'lar, hücrel gelişim ve konakçı patojen etkileşimleri gibi çeşitli organizmalarda faaliyet gösteren düzenleyici süreçlerde önemli rol oynar ve hücre farklılaşması, proliferasyon, apoptoz mekanizmaları üzerinde kanser ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Cai vd. 2009; Nicoloso vd. 2009). miRNA; serum, plazma, gözyaşı veya idrar gibi vücut sıvılarından veya dokularından kolaylıkla izole edilebilir. miRNA'lar, kolon kanseri de dahil olmak üzere bir dizi kanser türüyle ilişkilendirilmiştir. miRNA'lar, transkripsiyon sonrası gen ekspresyon regülatörleri için gerekli olan bir tür endojen, küçük protein dışı kodlama RNA molekülüdür. miRNA'ların embriyonik kök hücrelerin ve KKH'nin regülasyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir (Gal vd. 2008; Shimono vd. 2009). Let-7'nin, özellikle meme kanserlerinde, kendi kendini yenileme ve çoklu farklılaşma kabiliyeti gibi meme KKH özellikleri için önemli olduğu belirlenmiştir (Yu vd. 2007). Önceki araştırmalar, miRNA'ların kolon KKH'lerinin gelişiminde ve devamlılığında kritik rol oynayabileceğini göstermektedir. Kolon KKH'lerde miRNA ekspresyon paternlerinin araştırılması, KKH'leri hedeflemek için ilaçların veya diğer tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır (Zhang vd. 2011).

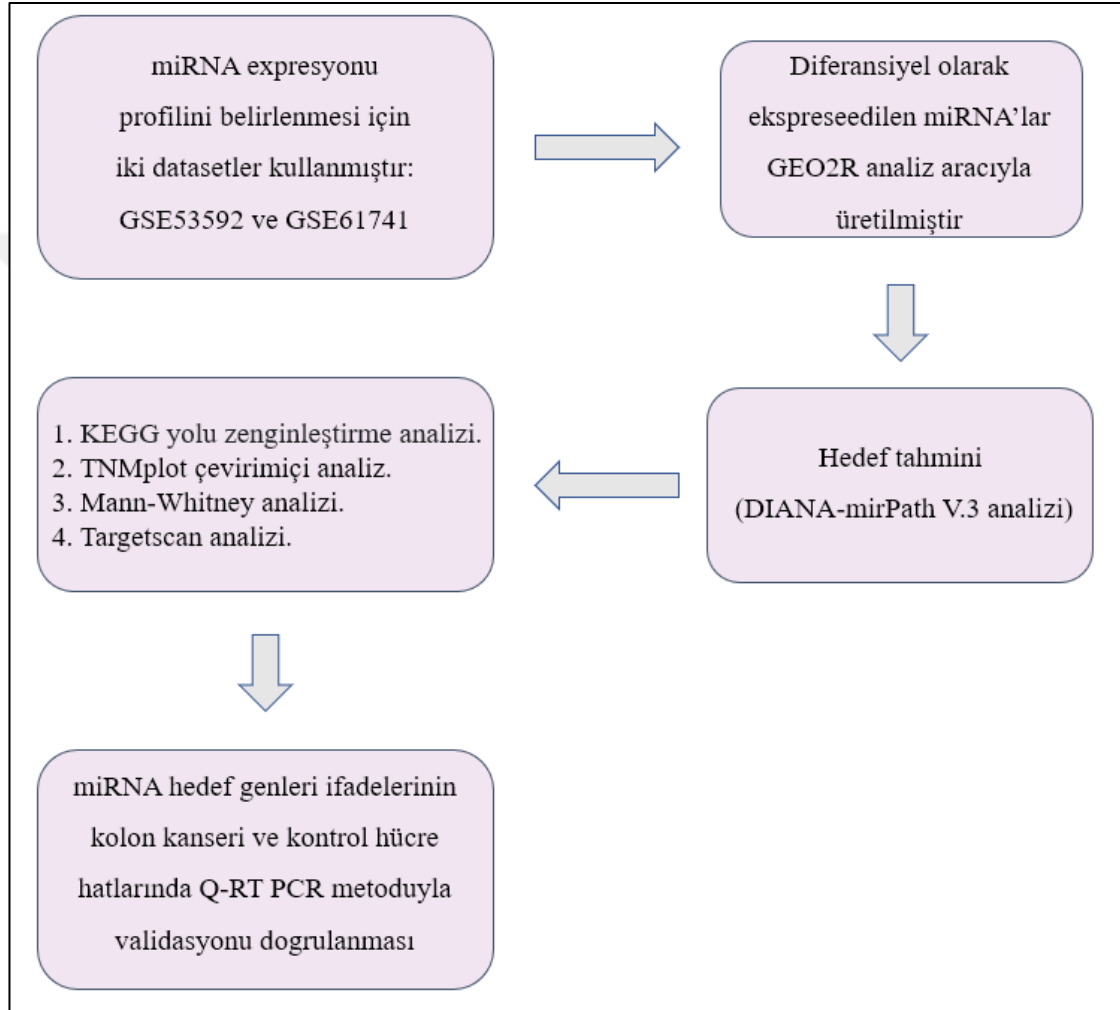
Lawrie ve arkadaşları 2008'de ilk kez hasta serumundan izole edilen miRNA'ları büyük B hücreli lenfoma analizi için kullanılmıştır ve hastaların serumunda tümörle ilişkili mikroRNA'ların yüksek seviyelerde olduğunu saptanmışlardır (Lawrie vd. 2008). Tespit edilen her yeni miRNA'lar çeşitli hastalıkların tespitinde biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Genetik düzeyde hastalık teşhisine yönelik taramalar son yıllarda araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Kansere özgü farklı hücre tiplerindeki farklı miRNA'ların ekspresyon seviyeleri, miRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceğinin kanıtı olarak tanımlanmıştır. Normal ve hastalıklı dokular arasındaki miRNA'lardaki farklılıklar araştırıldığında kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere göre farklı şekilde ifade edilen miRNA'ların tümör büyümesi ve metastazında belirli bir fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir (Lehmann vd. 2008; Saito vd. 2006; Saydam vd.

2011). Calin ve ark. miRNA'ların kanser oluşumu üzerindeki etkisi üzerine etkisini ile kez araştırmışlar ve kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalarda miR-15a ve miR-16-1 ekspresyon seviyelerinin azaldığını veya bulunmadığını göstermişlerdir (Calin vd. 2002). Başka bir çalışmada, Calin ve ark. 2004 yılına 186 miRNA geninin DNA üzerindeki yerini göstermişlerdir. miRNA genleri tipik olarak heterozigotluğun kaybolduğu alanlar olan kırılma kısımlarda bulunur. Bunlar düşük amplifikasyonlu veya genel kromozomal kırılma noktalarına sahip yerlerdir ve moleküler lezyonların neden olduğu genetik hasar belirli maligniteler üretir (Calin vd. 2004). Michael ve ark. 2003 yılında; insan solid tümörlerinde (kolonik ve rektal adenokarsinomlar) miRNA'ların normal dokulara göre değişmiş ekspresyon seviyelerini ortaya çıkaran ilk kişilerdir (Michael vd. 2003). Çalışmalarında, miRNA düzeylerinin meme kanseri, malign beyin tümörleri, tiroid kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri ve hepatosellüler karsinomda yıllar içinde değiştiğini göstermişlerdir (Michael vd. 2003). miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın özelliklerine bağlı olarak tümör baskılayıcı özelliklerini değiştirebilir. Kanser genetik bir hastalık olduğu için, 'tümör inhibitörü' ve 'proton geni' olarak adlandırılan bu genlerin uygunsuz işleyişi, kanser oluşumu ve gelişiminden sorumlu olmaya önemli ölçüde ve farklı şekillerde katkıda bulunur.

miRNA'lar üzerinde yapılan son çalışmaların, kanserin biyolojik süreçlerinin altında yatan mekanizmaların ortaya çıkarılmasında faydalı olması oldukça dikkat çekicidir. Yapılan çalışmalarda, insan kolon kanserlerinde de miRNA ekspresyon profillerini analiz edilmiş ve potansiyel klinik alakalarını incelemiştir. Birden fazla biyolojik belirteci tek bir modele entegre etmek, tek bir biyolojik belirteç ile karşılaştırıldığında prognostik değeri önemli ölçüde arttıracaktır. Bu nedenle yeni biyobelirteç adaylarının ortaya çıkarılması oldukça önem arz etmektedir.

Kolon kanserine özgü biyobelirteç bulma amacıyla gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışması kapsamında özetle, kolon kanseri ile ilgili yapılmış ve halka açık bir şekilde yayınlanan GEO veri deposuna GSE53592 VE GSE61741 kodu ile yüklenen miRNA ifade veri setleri öncelikle online analiz aracı GEO2R ile analiz edilmiştir ve kolon kanseri hasta doku ve serum örneklerinde ortak değişen miRNA adaylarını belirlemiştir. Sonrasında miR-PATH, TNMplot, Targetscan gibi çeşitli online analiz araçları ile miRNA hedef

genleri tahmin edilerek, bu genlerin etkilediği sinyal yolları belirlenmiştir. Belirlediğimiz 6 hedef gen ifadeleri (LAMA3 , ITGA5, COL4A6, ITGA3, COL1A2, COL5A2) kolon kanserini temsilen HT-29 (ATCC HTB-38) hücre hattı ve sağlıklı kolon epitel hücre CCD-18Co (ATCC-CRL-1459) hatlarında q-RT PCR yöntemi ile analiz edilmiştir (Şekil 5.1 çalışmamızı metodu ve yapılan analizleri gösterilmiştir).



Şekil 5.1 Çalışma tasarımının iş akışı

Öncelikli olarak gerçekleştirdiğimiz analizlerde, normal kolon dokularına kıyasla ekspresyonu kolon kanserinde önemli ölçüde değişen olan 67 miRNA belirlenmiştir (Şekil 4.3). Bu miRNA'ları belirlemek için kullandığımız GEO data setlerinin (GSE53592 ve GSE61741) klinik ve patolojik verilerinde orijinal data üzerinden ulaşılabilir (Keller vd. 2014; Zhao vd. 2014). GSE53592 veri seti 3 kolon kanseri örneği

ve 3 sağlıklı doku örneği, GSE61741 veri seti ise 28 kolon kanseri serum ve 90 kontrol serum örneği içerdiği içermektedir. GEO2R ile gerçekleştirdiğimiz analizler sonucunda GSE53592 data setinde 122 miRNA'nın ifadesi anlamlı şekilde değişirken GSE61741 data setinde 441 miRNA'nın ifadesi anlamlı şekilde değişmiştir. Bu ver setleri arasında serum ve doku örneklerinde ortak değişen miRNA'ları venn diagram analizi ile belirledikten sonra (67 miRNA) bu miRNA'lar ile bağlantılı sinyal yollarını incelediğimizde, toplamda ortak diferansiyel olarak ifade edilen miRNA'larla ilgili ilişkili 5 sinyal yolu keşfettik. Şekil 4.4'te, bu yollar bir ısı haritası olarak gösterilmektedir. Elde ettiğimiz bulgular sonucunda; yağ asidi biyosentezi, yağ asidi metabolizması, ECM-reseptör etkileşimi, Prion hastalıkları ve Lizin bozulması yollarının miRNA değişimlerinden anlamlı şekilde etkilenebileceğini belirlemiştir. Çalışmamızı, bu yollar arasında en çok miRNA tarafından hedeflenen (11 miRNA) genlerin bulunduğu ve istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde ettiğimiz ($p < 1e-325$) ECM-reseptör etkileşimi yolağı üzerine devam edilmiştir. Hücre dışı matris (ECM), hücreleri biyokimyasal ve yapısal olarak destekleyen hücre dışı bir doku bileşenidir. ECM, kollajenler, lamininler ve fibronektinler gibi birkaç glikoproteinden oluşur ve entegrinler ve kaderinler gibi ECM bileşenleriyle doğrudan etkileşime giren yüzlerce hücresel reseptör vardır (Achilleas vd. 2016; Barczyk vd. 2010). Yapılan çeşitli çalışmalar, kolorektal kanser gelişimi ve metastaz oluşumunda ECM -reseptör etkileşiminin önemli bir rolünü ortaya koymuştur (Stankevicius vd. 2016).

ECM-reseptör etkileşimi sinyal yolağı ile ilişkili belirlediğimiz miRNA'lar; hsa-miR-93-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-20b-3p, hsa-let-7f-1-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-145-3p, hsa-miR-331-3p ve hsa-miR-1231'dir (Çizelge 4.3). Önceden yapılan çalışmalarda, miR-143-3p ifadelerinin kolon kanserlerinde önemli ölçüde arttığı, miR-330-3p ise KRK doku ve hücre hatlarında önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Ardila vd. 2019; Huang vd. 2020). Ek olarak, miR-769-5p'nin malign ilerleme ve farklı tümörlerin zayıf tanısı ile yakından ilişkili olduğunu gösteren çok fazla kanıt vardır. Birçok tümörde miR-769-5P yukarı regülasyon bildirilmiştir (Chang vd. 2019; Xian vd. 2019). Bu bulgular, çalışmamızın sonucunda hedef olarak belirlediğimiz ve ileri analizlerle araştırdığımız bu miRNA'ların serum ve dokudaki ifadelerinin belirlenmesinin mevcut KRK tarama

yaklaşımlarını destekleyebileceğini ve karsinogenez yolları hakkında yeni bilgiler verebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızın devamında, 11 miRNA tarafından hedeflenen ve analiz sonuçlarımıza göre ECM- reseptör etkileşimi sinyal yolağında görev alan gen ifadelerini öncelikle *in siliko* TNM çizim analizi ile incelemiştir (Şekil 4.6 A ve B) devamında ise bu genlerin tespit ettiğimiz hedef miRNA'lar ile 3'UTR bölgelerine bağlanıp bağlanmadığını Targetscan miRNA-mRNA bağlanma tahmin aracı ile analiz edilmiştir (Şekil 4.7 A ve B). Analiz sonucumuzda kolon kanserinde ifadesi artan ve hedef miRNA'lar ile ortak bağlanma bölgesi olan ECM-reseptör etkileşimi ilişkili ITGA5, COL4A6, LAMA3, COL1A2 ve COL5A2 genlerini belirlemiştir.

ECM reseptöründeki değişimler, hücre ilişkilerinin zayıflaması ve kanserde metastaz ile sonuçlanmaktadır (Guarino vd. 2007). TNMplot analiz sonuçlarına göre normal ve kolon kanseri tümör dokularındaki LAMA3 , ITGA5 ve COL4A6 genlerinin ifadelerinin sırasıyla 0.53, 0.65 ve 0.42 kat azaldığı , ITGA3, COL1A2, ve COL5A2 gen ifadelerinin ise sırayla 1.96, 8.7, ve 4.62 kat arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.4). Analiz sonuçlarımıza göre belirlediğimiz genler ile ilgili daha önceden yapılan çalışmalar, tez bulgularımızın önemini güçlendirmektedir. Örneğin yapılan bu çalışmalardan bir tanesinde, ilk kez kolorektal bir adenom ile ilişkili bazı somatik mutasyonlar olduğunu bildirilmiştir. Bu mutasyonlar arasında, hücre yapışması, sinyal transdüksiyonu ve farklılaşmasında rol oynayan LAMA3'teki bir lösinden serine değiştirilmiş missense mutasyonu yer almaktadır. LAMA3'ün ayrıca beyin, over kanseri ve melanomada rol oynadığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Parsons vd. 2008; Wei vd. 2011; Cancer ve Atlas 2011). Ek olarak, COL4A6 dahil olmak üzere kolon kanserlerinde daha önce başka mutasyona uğramış genler bildirilmiştir (Bass vd. 2011). Kolon kanseri ile ilgili başka bir çalışmada sonuçlar bu genlerin COL4A6 ve COL1A2 ekspresyonlarında anormal değişiklikler olduğunu göstermiştir; Sonuçlar, COL4A6 ekspresyonunun tümör dokularında aşağı regüle edildiğini, COL1A2 ekspresyonunun ise yukarı regüle edildiğini göstermektedir (Liang vd. 2020).

Diğer çalışmalardan elde edilen bulgular, ITGA3 ekspresyonunun KRK dokularında ve hücre hatlarında yukarı regüle edildiğini ve tümör mikro çevresinin düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Tian vd. 2020). ITGA3'ün ayrıca hücre proliferasyonu, göç ve invazyon ile ilgili olabileceği bildirilmiştir ve aşırı ITGA3 ifadesinin ise mide karsinomlarında invazyon ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Ura vd. 1998; Song vd. 2016). Ayrıca, bir diğer çalışmada, ITGA3 skuamöz hücreli karsinom ve servikal lenf nodu metastazı için bir biyobelirteç olarak kabul edilmiştir (Kurokawa vd. 2008). Bağırsak rejenerasyonu ve tümör oluşumunda STAT3'ün rolünü belirlemek için fare bağırsak epitel hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki değişiklikler incelenmiştir. Özellikle, ITGA5 ekspresyonunun izole edilmiş STAT3^{Δiec} fare bağırsak kripterinde önemli ölçüde aşağı düzenlendiği doğrulanmıştır (Oshima vd. 2019). Kolorektal kanserde kollajen tip V α2 (COL5A2) artışı ile ilgili başka bir çalışmada, COL5A2 mRNA ve proteinin KRK'de önemli ölçüde yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Wang vd. 2021).

Hem biyoinformatik analiz sonuçlarımız hem de yukarıda bahsettiğimiz literatür bilgisine dayanarak ECM-reseptör etkileşimi ilişkili genlerden ITGA5, COL4A6, LAMA3, COL1A2 ve COL5A2 ifadelerine kolon kanseri hücre hattı HT-29 ve CCD18-co sağlıklı kolon hücrelerinde q-RT PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. CCD-18Co normal ve HT-29 kolon kanser hücre hatlarındaki 6 genin ifadelerinin sonuçları karşılaştırılmasında qRT-PCR datalarımıza göre; LAMA3 genin HT-29 kolon kanser hücre hatlarında, normal hücreye kıyaslandığında ifadesinin 6 kat arttığı bulunmuştur (şekil 4.8). ITGA3 geninin ise normal hücre hattına göre HT-29 hücre hattındaki ifadesi 35 kat değişim göstermiştir. Genlerden bir diğeri olan COL1A2'nin ifadesi ise CCD-18Co hücre hattındaki ile kıyaslandığında HT-29 hattında 14 kat azalmıştır. Geriye kalan üç genin (ITGA5, COL4A6 ve COL5A2) ifadelerinde kayda değer bir istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Elde ettiğimiz q-RT PCR verileri TNM PLOT analiz sonuçlarımız ile karşılaştırdığımızda ITGA3 ifadesi benzer şekilde artarken LAMA3 ve ITGA3 ifade değişimlerinde tam tersi bir sonuç alınmıştır. Bu durumda, farklı kolon kanseri hücre hattı ve kolon epitel hücre hattı ile yeni validasyon denemeleri yapılarak elde ettiğimiz *In siliko* ve *in vitro* hücre hattı verileri tekrar karşılaştırılabilir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre kolon kanserlerin ITGA3 hem *in vitro*

hem de *In siliko* analiz sonuçlarına göre anlamlı şekilde değişmektedir. İleri moleküler analizler, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar yapılarak ITGA3'ün ve bunu hedefleyen miRNA'ların biyobelirteç adayı olarak kullanılabilirliği doğrulanabilir. Tüm bu ileri analiz sonuçları ile elde ettiğimiz verilen doğrulanabilirse kolon kanserlerinin erken evrede saptanmasına ve daha hızlı tedavi etme stratejilerini kolaylaştırılmasına yardımcı olabilecek terapötik hedefler olarak kullanılabilirler.



KAYNAKLAR

- Achilleas, D., Skandalis, S.S. and Chrysostomi Karamanos, N.K. (2016) 'Extracellular matrix structure', *Adv Drug Deliv Rev*, 1(97), pp. 4–27.
- Aggarwal, B.B. and Shishodia, S. (2006) 'Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer', *Biochemical pharmacology*, 71(10), pp. 1397–1421.
- Akbani, R. (1997) 'A case-control study of diet and colorectal cancer in a multiethnic population in Hawaii (United States): Lipids and foods of animal origin', *Cancer Causes and Control*, 8(4), pp. 637–648. doi:10.1023/A:1018406716115.
- Alabaster, O. *et al.* (1995) 'Effect of β -carotene and wheat bran fiber on colonic aberrant crypt and tumor formation in rats exposed to azoxymethane and high dietary fat', *Carcinogenesis*, 16(1), pp. 127–132.
- Almeida, L.C. De *et al.* (2022) 'AD80 , a multikinase inhibitor , as a potential drug candidate for colorectal cancer therapy', 308(May), pp. 1–9. doi:10.1016/j.lfs.2022.120911.
- Al-Sohaily, S. *et al.* (2012) 'Molecular pathways in colorectal cancer', *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 27(9), pp. 1423–1431. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x.
- Althumairi, A.A. and Gearhart, S.L. (2015) 'Local excision for early rectal cancer: transanal endoscopic microsurgery and beyond', *Journal of gastrointestinal oncology*, 6(3), p. 296.
- Anonim. 2020 (WHO), W.H.O. 'Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country andby Region, 2000-2019'. WHO. Erişim Tarihi: 03.08.2021
- Anonymous. 2004. (www.mayoclinic.org Erişim Tarihi:21.04.2019 (Group, 2004).Erişim Tarihi: 30.08.2021
- Anonymous. 2005. (www.mayoclinic.org Erişim Tarihi:21.04.2019) (Haller vd. 2005). Erişim Tarihi: 30.08.2021
- Ardila, H.J. *et al.* (2019) 'Circulating miR-141-3p, miR-143-3p and miR-200c-3p are differentially expressed in colorectal cancer and advanced adenomas', *Molecular and Clinical Oncology*, 11(2), pp. 201–207. doi:10.3892/mco.2019.1876.
- Balkwill, F. and Coussens, L.M. (2005) 'An Inflammatory Lineage', *Science*, 310(5750), pp. 945–945. doi:10.1126/science.310.5750.945a.
- Barczyk, M., Carracedo, S. and Gullberg, D. (2010) 'Integrins', *Cell and tissue research*, 339(1), pp. 269–280.
- Barton, S.H., Kelly, D.G. and Murray, J.A. (2007) 'Nutritional deficiencies in celiac disease', *Gastroenterology Clinics of North America*, 36(1), pp. 93–108.

- Bass, A.J. *et al.* (2011) ‘Genomic sequencing of colorectal adenocarcinomas identifies a recurrent VTI1A-TCF7L2 fusion’, *Nature genetics*, 43(10), pp. 964–968.
- Baust, J. G., Gage, A. A., Bjerklund Johansen, T. E., & Baust, J. M. (2014). Mechanisms of cryoablation: Clinical consequences on malignant tumors. *Cryobiology*, 68(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.11.001>
- Bever, K.M. and Le, D.T. (2017) ‘An expanding role for immunotherapy in colorectal cancer’, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 15(3), pp. 401–410.
- Bogaert, J. and Prenen, H. (2014) ‘Molecular genetics of colorectal cancer’, *Annals of gastroenterology*, 27(1), p. 9.
- Botteri, E. *et al.* (2008) ‘Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis’, *Jama*, 300(23), pp. 2765–2778.
- Boudjadi, S., Carrier, J.C. and Beaulieu, J.-F. (2013) ‘Integrin $\alpha 1$ subunit is up-regulated in colorectal cancer’, *Biomarker Research*, 1(1), pp. 1–7.
- Bray, F. (2014) ‘Transitions in human development and the global cancer burden’, *World cancer report*, 34.
- Bray, F. *et al.* (2021) ‘The ever- increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide’, *Cancer*, 127(16), pp. 3029–3030.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, Rebecca L, *et al.* (2018) ‘Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries’, *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), pp. 394–424.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, Rebecca L., *et al.* (2018) ‘Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries’, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), pp. 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- Brenner, H., Kloor, M. and Pox, C.P. (2014) ‘Colorectal cancer’, *The Lancet*, 383(9927), pp. 1490–1502. doi:10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
- Brown, T. (2008) ‘Deisign thinking’, *Harvard Business Review*, 86(6), pp. 84–92. doi:10.1002/med.
- Bruce, W.R., Giacca, A. and Medline, A. (2000) ‘Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer’, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 9(12), pp. 1271–1279.
- Bry, L. *et al.* (1996) ‘A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem’, *Science*, 273(5280), pp. 1380–1383.
- Buset, M. *et al.* (1986) ‘Inhibition of human colonic epithelial cell proliferation in vivo and in vitro by calcium’, *Cancer research*, 46(10), pp. 5426–5430.
- Byrd, A.E. and Brewer, J.W. (2013) ‘Micro (RNA) managing endoplasmic reticulum stress’, *IUBMB life*, 65(5), pp. 373–381.

- Caderni, G. *et al.* (1999) 'Dietary determinants of colorectal proliferation in the normal mucosa of subjects with previous colon adenomas', *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 8(3), pp. 219–225.
- Cai, S. *et al.* (2014) 'Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death', *European Journal of Cancer Prevention*, 23(6), pp. 532–539.
- Cai, Y. *et al.* (2009) 'A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation', *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 7(4), pp. 147–154. doi:10.1016/S1672-0229(08)60044-3.
- Calin GA, Ferracin M, C.A. *et al.* (2005) A. microRNA *et al.* (2005) 'A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia', *New England Journal of Medicine*, 353(17), pp. 1793–1801.
- Calin, G.A. *et al.* (2002) 'Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia', *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(24), pp. 15524–15529.
- Calin, G.A. *et al.* (2004) 'Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9), pp. 2999–3004.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012;487:330-337.
- Castell, A. and Larsson, L.G. (2015) 'Targeting MYC Translation in Colorectal Cancer', *Cancer discovery*, 5(7), pp. 701–703. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0660.
- Chan, A.O.-O. *et al.* (2002) 'CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum', *The American journal of pathology*, 160(5), pp. 1823–1830.
- Chan, D.S.M. *et al.* (2011) 'Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies', *PloS one*, 6(6), p. e20456.
- Chang, M. *et al.* (2019) 'MicroRNA-769-5p promotes the growth of glioma cells by targeting lysine methyltransferase 2A', *Oncotargets and therapy*, 12, p. 9177.
- Chau, I. and Cunningham, D. (2006) 'Adjuvant therapy in colon cancer—what, when and how?', *Annals of Oncology*, 17(9), pp. 1347–1359.
- Chen, H. *et al.* (2018) 'J o u r n a l o f C a n c e r NKX2-2 Suppresses Osteosarcoma Metastasis and Proliferation by Downregulating Multiple Target Genes', 9(7). doi:10.7150/jca.26382.
- Chen, P. *et al.* (2015) 'Identifying critical differentiation state of MCF-7 cells for breast cancer by dynamical network biomarkers', *Frontiers in Genetics*, 6(JUL), pp. 1–7. doi:10.3389/fgene.2015.00252.
- Chen, S. *et al.* (2019) 'The function of RAS mutation in cancer and advances in its drug research', *Current pharmaceutical design*, 25(10), pp. 1105–1114.

- Christine, A., Lacobuzio, D. and Elizabeth, M. (2005) 'Epithelial neoplasms of the colorectum', *Gastrointestinal and Liver Pathology*. Churchill Livingstone Elsevier, pp. 367–394.
- Cirocchi, R. *et al.* (2017) 'Laparoscopic versus open colectomy for obstructing right colon cancer: a systematic review and meta-analysis', *Journal of Visceral Surgery*, 154(6), pp. 387–399.
- Correa, G. and Montero, A.V. (2013) 'No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title', (September), pp. 1–10.
- Cottet, V. *et al.* (2012) 'Long-term risk of colorectal cancer after adenoma removal: a population-based cohort study', *Gut*, 61(8), pp. 1180–1186.
- Crotti, S. *et al.* (2017) 'Extracellular matrix and colorectal cancer: how surrounding microenvironment affects cancer cell behavior?', *Journal of cellular physiology*, 232(5), pp. 967–975.
- Czene, K., Lichtenstein, P. and Hemminki, K. (2002) 'Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish family- cancer database', *International journal of cancer*, 99(2), pp. 260–266.
- Çimen, I. *et al.* (2016) 'Prevention of atherosclerosis by bioactive palmitoleate through suppression of organelle stress and inflammasome activation', *Science Translational Medicine*, 8(358), pp. 1–15. doi:10.1126/scitranslmed.aaf9087.
- Davoodian, P. *et al.* (2017) 'Effect of TGF- β /smad signaling pathway blocking on expression profiles of miR-335, miR-150, miR-194, miR-27a, and miR-199a of hepatic stellate cells (HSCs)', *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench*, 10(2), p. 112.
- Dekker, E., Tanis, Pieter J, *et al.* (2019) 'Pure-AMC', *Lancet*, 394, pp. 1467–1480.
- Dekker, E., Tanis, Pieter J., *et al.* (2019) 'Colorectal cancer', *The Lancet*, 394(10207), pp. 1467–1480. doi:10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
- Denadai, M.V.A. *et al.* (2013) 'Expression of integrin genes and proteins in progression and dissemination of colorectal adenocarcinoma', *BMC Clinical Pathology*, 13(1), pp. 1–9.
- Deng, S. *et al.* (2008) 'Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer ND ES SC CE RIB ND ES SC', *Landes Bioscience*, 7(17), pp. 2643–2646.
- Dyba, T. *et al.* (2021) 'The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers', *European Journal of Cancer*, 157, pp. 308–347. doi:10.1016/j.ejca.2021.07.039.
- Feagins, L.A. (2019) 'Colonoscopy, polypectomy, and the risk of bleeding', *Medical Clinics*, 103(1), pp. 125–135.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990) 'A genetic model for colorectal tumorigenesis', *cell*, 61(5), pp. 759–767.

- Fenoglio-Preiser, C.M. *et al.* (1999) 'Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine', *Gastrointestinal pathology an atlas and text. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers*, pp. 909–1068.
- Fidler, M.M., Soerjomataram, I. and Bray, F. (2016) 'A global view on cancer incidence and national levels of the human development index', *International journal of cancer*, 139(11), pp. 2436–2446.
- Fischer, H. *et al.* (2001) 'Colorectal carcinogenesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2', *Carcinogenesis*, 22(6), pp. 875–878.
- Gal, H. *et al.* (2008) 'MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells', *Biochemical and biophysical research communications*, 376(1), pp. 86–90.
- Galatenko, V. V *et al.* (2018) 'Cumulative prognostic power of laminin genes in colorectal cancer', *BMC Medical Genomics*, 11(1), pp. 77–81.
- Ganesh, K. *et al.* (2019) 'Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential', *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(6), pp. 361–375.
- Gersten, O. and Wilmoth, J.R. (2002) 'The cancer transition in Japan since 1951', *Demographic Research*, 7(December), pp. 271–306. doi:10.4054/DemRes.2002.7.5.
- Giovannucci, E. *et al.* (1995) 'Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 87(4), pp. 265–273.
- Gong, Y. *et al.* (2019) 'Diagnostic and prognostic values of integrin α subfamily mRNA expression in colon adenocarcinoma', *Oncology reports*, 42(3), pp. 923–936.
- Goyle, S. and Maraveyas, A. (2005) 'Chemotherapy for colorectal cancer', *Digestive surgery*, 22(6), pp. 401–414.
- Grady, W.M. (2005) 'Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer', *Biochemical Society Transactions*, 33(4), pp. 684–688.
- Grady, W.M. and Markowitz, S.D. (2002) 'Genetic and epigenetic alterations in colon cancer', *Annual review of genomics and human genetics*, 3(1), pp. 101–128.
- Group, C.O. of S.T.S. (2004) 'A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer', *New England Journal of Medicine*, 350(20), pp. 2050–2059.
- Gruber-Rouh, T. *et al.* (2016) 'Current strategies in interventional oncology of colorectal liver metastases', *The British Journal of Radiology*, 89(1064), p. 20151060.
- Guarino, M., Rubino, B. and Ballabio, G. (2007) 'The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology', *Pathology*, 39(3), pp. 305–318. doi:10.1080/00313020701329914.

- Guinney, J. *et al.* (2015) ‘The consensus molecular subtypes of colorectal cancer’, *Nature Medicine*, 21(11), pp. 1350–1356. doi:10.1038/nm.3967.
- Haddock, M.G. (2017) ‘Intraoperative radiation therapy for colon and rectal cancers: a clinical review’, *Radiation Oncology*, 12(1), pp. 1–8.
- Haller, D.G. *et al.* (2005) ‘Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089’, *Journal of Clinical Oncology*, 23(34), pp. 8671–8678.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) ‘The hallmarks of cancer’, *cell*, 100(1), pp. 57–70.
- Heitman, D.W. and Cameron, I.L. (1990) ‘Reduction of colon cancer risk by dietary cellulose supplementation’, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), pp. 1154–1155.
- Henrikson, N.B. *et al.* (2015) ‘Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review’, *Genetics in medicine*, 17(9), pp. 702–712.
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2013. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2016.
- Huang, Y. *et al.* (2020) ‘HLA-F-AS1/miR-330-3p/PFN1 axis promotes colorectal cancer progression’, *Life Sciences*, 254, p. 117180. doi:10.1016/j.lfs.2019.117180.
- Huang, Z. *et al.* (2017) ‘A novel serum microRNA signature to screen esophageal squamous cell carcinoma’, *Cancer Medicine*, 6(1), pp. 109–119.
- IARC. 2018. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. <https://www.iarc.who.int> Erişim tarihi: 12.09.2018
- Ikeda, K. and Iyama, K. (2006) ‘Loss of Expression of Type IV Collagen $\alpha 5$ and $\alpha 6$ Chains in Colorectal Cancer Associated with the Hypermethylation of Their Promoter Region’, *The American Journal of Pathology*, 168(3), pp. 856–865. doi:10.2353/ajpath.2006.050384.
- Iorio, M. V *et al.* (2005) ‘MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer’, *Cancer research*, 65(16), pp. 7065–7070.
- Jess, T., Rungoe, C. and Peyrin–Biroulet, L. (2012) ‘Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies’, *Clinical gastroenterology and hepatology*, 10(6), pp. 639–645.
- Jiao, S. *et al.* (2014) ‘Estimating the heritability of colorectal cancer’, *Human molecular genetics*, 23(14), pp. 3898–3905.
- Keller, A. *et al.* (2014) ‘miRNAs can be generally associated with human pathologies as exemplified for miR-144’, *BMC medicine*, 12(1), pp. 1–12.

- Kennedy, A. S., Coldwell, D., Nutting, C., Murthy, R., Wertman Jr, D. E., Loehr, S. P., Overton, C., Meranze, S., Niedzwiecki, J., & Sailer, S. (2006). Resin 90Y-microsphere brachytherapy for unresectable colorectal liver metastases: modern USA experience. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 65(2), 412–425.
- Kindblom, L.G. et al. (1998) ‘Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): Gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal’, *American Journal of Pathology*, 152(5), pp. 1259–1269.
- Ko, K.V.E. (2008) ‘Odtü fen b i l i m l e r i e n s t i t ü s ü ’, pp. 1–79.
- Koch, M., Nielsen, G.P. and Yoon, S.S. (2008) ‘Malignant tumors of blood vessels: Angiosarcomas, hemangioendotheliomas, and hemangiopericytomas’, *Journal of Surgical Oncology*, 97(4), pp. 321–329. doi:10.1002/jso.20973.
- Kreuser, wopfner and (1986) ‘No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title’, 0182(86), pp. 1–18.
- Kumar V, Robbins S, Cotran R (Çeviri: U. Çevikbaş). *Temel Patoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000: 505-514).
- Kurokawa, A. et al. (2008) ‘Diagnostic value of integrin $\alpha 3$, $\beta 4$, and $\beta 5$ gene expression levels for the clinical outcome of tongue squamous cell carcinoma’, *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 112(6), pp. 1272–1281.
- Kyrgiou, M. et al. (2017) ‘Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature’, *Bmj*, 356.
- Labianca, R. et al. (2010) ‘Colon cancer’, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74(2), pp. 106–133. doi:10.1016/j.critrevonc.2010.01.010.
- Lagos-quintana, M. et al. (2001) ‘Lagos-QuintanaM01Science.pdf’, 294(October), pp. 853–858.
- Lanza, G. et al. (1998) ‘Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer’, *International journal of cancer*, 79(4), pp. 390–395.
- Lauby-Secretan, B. et al. (2018) ‘The IARC perspective on colorectal cancer screening’, *New England Journal of Medicine*, 378(18), pp. 1734–1740.
- Lawrie, C.H. et al. (2008) ‘Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma’, *British Journal of Haematology*, 141(5), pp. 672–675. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) ‘The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*’, *cell*, 75(5), pp. 843–854.

- Lehmann, U. *et al.* (2008) 'Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa- mir- 9- 1 in human breast cancer', *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 214(1), pp. 17–24.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1997) 'Genetic instability in colorectal cancers', *Nature*, 386(6625), pp. 623–627.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) 'Genetic instabilities in human cancers', *Nature*, 396(6712), pp. 643–649. doi:10.1038/25292.
- Levi, F. *et al.* (1999) 'Food groups and colorectal cancer risk', *British journal of cancer*, 79(7), pp. 1283–1287.
- Li, J., Ding, Y. and Li, A. (2016) 'Identification of COL1A1 and COL1A2 as candidate prognostic factors in gastric cancer', *World Journal of Surgical Oncology*, pp. 1–5. doi:10.1186/s12957-016-1056-5.
- Liang, Y. *et al.* (2020) 'Prognostic significance of abnormal matrix collagen remodeling in colorectal cancer based on histologic and bioinformatics analysis', *Oncology Reports*, 44(4), pp. 1671–1685. doi:10.3892/or.2020.7729.
- Lichtenstein, P. *et al.* (2000) 'Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland', *New England journal of medicine*, 343(2), pp. 78–85.
- Lin, J.-K. *et al.* (2003) 'Loss of heterozygosity and DNA aneuploidy in colorectal adenocarcinoma', *Annals of surgical oncology*, 10(9), pp. 1086–1094.
- Lindner, M.A. (1991) 'A fish oil diet inhibits colon cancer in mice'.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method', *methods*, 25(4), pp. 402–408.
- Loeb, L.A., Springgate, C.F. and Battula, N. (1974) 'Errors In Dna Replication As A Basis Of Malignant Changes 1', *Cancer Research*, 34(9), pp. 2311–2321.
- Lopez-Camarillo, C. *et al.* (2012) 'MetastamiRs: non-coding microRNAs driving cancer invasion and metastasis', *International journal of molecular sciences*, 13(2), pp. 1347–1379.
- Lu, J. *et al.* (2005) 'MicroRNA expression profiles classify human cancers', *nature*, 435(7043), pp. 834–838.
- Lu, T.X. and Rothenberg, M.E. (2018) 'MicroRNA', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(4), pp. 1202–1207. doi:10.1016/j.jaci.2017.08.034.
- Lustosa, S.A.S. *et al.* (2014) 'Expression profiling using a cDNA array and immunohistochemistry for the extracellular matrix genes FN-1, ITGA-3, ITGB-5, MMP-2, and MMP-9 in colorectal carcinoma progression and dissemination', *The Scientific World Journal*, 2014.
- Maltseva, D. V and Rodin, S.A. (2018) 'Laminins in metastatic cancer', *Molecular Biology*, 52(3), pp. 350–371.

- Maurel, M. and Chevet, E. (2013) 'Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 304(12), pp. C1117–C1126.
- Meester, R.G.S. *et al.* (2015) 'Public health impact of achieving 80% colorectal cancer screening rates in the United States by 2018', *Cancer*, 121(13), pp. 2281–2285.
- Michael, M.Z. *et al.* (2003) 'Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia', *Molecular cancer research*, 1(12), pp. 882–891.
- Moss, A. and Nalankilli, K. (2017) 'Standardisation of polypectomy technique', *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 31(4), pp. 447–453.
- Muzny, D.M. *et al.* (2012a) 'Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer', *Nature*, 487(7407), pp. 330–337. doi:10.1038/nature11252.
- Muzny, D.M. *et al.* (2012b) 'Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer', *Nature*, 487(7407), pp. 330–337. doi:10.1038/nature11252.
- Nastro, P. *et al.* (2005) 'Local excision of rectal cancer: review of literature', *Digestive surgery*, 22(1–2), pp. 6–15.
- Nguyen-Ngoc, K.-V. *et al.* (2012) 'ECM microenvironment regulates collective migration and local dissemination in normal and malignant mammary epithelium', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), pp. E2595–E2604.
- Nicoloso, M.S. *et al.* (2009) 'MicroRNAs—the micro steering wheel of tumour metastases', *Nature Reviews Cancer*, 9(4), pp. 293–302.
- Niu, L., Gao, C. and Li, Y. (2021) 'Identification of potential core genes in colorectal carcinoma and key genes in colorectal cancer liver metastasis using bioinformatics analysis', *Scientific Reports*, pp. 1–14. doi:10.1038/s41598-021-03395-5.
- Noordhuis, P. *et al.* (2004) '5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers', *Annals of oncology*, 15(7), pp. 1025–1032.
- Nosher, J.L. *et al.* (2015) 'Non-operative therapies for colorectal liver metastases', *Journal of gastrointestinal oncology*, 6(2), p. 224.
- O'Connell, J.B., Maggard, M.A. and Ko, C.Y. (2004) 'Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging', *Journal of the National Cancer Institute*, 96(19), pp. 1420–1425. doi:10.1093/jnci/djh275.
- Omran, A. (1971) 'The Epidemiological Transition: A Theory of Epidemiological Population Changes', *The Milbank Memorial Fund Quarterly*, 49(1), pp. 509–538. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16279965> 0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2690264.
- Oshima, H. *et al.* (2019) 'Stat3 is indispensable for damage-induced crypt regeneration but not for Wnt-driven intestinal tumorigenesis', *FASEB Journal*, 33(2), pp. 1873–1886. doi:10.1096/fj.201801176R.

- Ouakrim, D.A. *et al.* (2015) ‘Trends in colorectal cancer mortality in Europe: Retrospective analysis of the WHO mortality database’, *The BMJ*, 351, pp. 1–10. doi:10.1136/bmj.h4970.
- Özbal AN, Karahasanoğlu T. Kolon Kanserinde Klinik. Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D (Editörler). Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. İstanbul: Türk Kolon ve Rektum Cerrahi Derneği; 2003.s.421- 5.
- Pacal, I. *et al.* (2020) ‘A comprehensive review of deep learning in colon cancer’, *Computers in Biology and Medicine*, 126(August), p. 104003. doi:10.1016/j.combiomed.2020.104003.
- Pardee, A.B. and Stein, G.S. (2011) *The biology and treatment of cancer: Understanding cancer*. John Wiley & Sons.
- Park, S.M. *et al.* (2018) ‘Are we doing too much?: local excision before radical surgery in early rectal cancer’, *International journal of colorectal disease*, 33(4), pp. 383–391.
- Parker, W.B. and Cheng, Y.C. (1990) ‘Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil’, *Pharmacology & therapeutics*, 48(3), pp. 381–395.
- Parsons, D.W. *et al.* (2008) ‘An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme’, *science*, 321(5897), pp. 1807–1812.
- Parsons, D.W. *et al.* (2008) ‘An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme’, *science*, 321(5897), pp. 1807–1812.
- Pathak, S., Jones, R., Tang, J. M. F., Parmar, C., Fenwick, S., Malik, H., & Poston, G. (2011). Ablative therapies for colorectal liver metastases : a systematic review. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2011.02695.x>
- Pencheva, N. and Tavazoie, S.F. (2013) ‘Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks’, *Nature cell biology*, 15(6), pp. 546–554.
- Pienta, K.J., Partin, A.W. and Coffey, D.S. (1989) ‘Cancer as a Disease of DNA Organization and Dynamic Cell Structure’, *Cancer Research*, 49(10), pp. 2525–2532.
- Pino, M.S. and Chung, D.C. (2010) ‘The chromosomal instability pathway in colon cancer’, *Gastroenterology*, 138(6), pp. 2059–2072.
- Ponz de Leon, M. and Roncucci, L. (2000) ‘The cause of colorectal cancer’, *Digestive and Liver Disease*, 32(5), pp. 426–439. doi:10.1016/s1590-8658(00)80265-0.
- Prasad, V., Fojo, T. and Brada, M. (2016) ‘Precision oncology: origins, optimism, and potential’, *The Lancet Oncology*, 17(2), pp. e81–e86.
- Prenen, H., Vecchione, L. and Van Cutsem, E. (2013) ‘Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer’, *Targeted oncology*, 8(2), pp. 83–96.
- R, C.M. *et al.* (1999) ‘Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine’, *Gastrointestinal pathology an atlas and text. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers*, pp. 909–1068.

- Rachid, M.M. *et al.* (2002) 'Effect of yogurt on the inhibition of an intestinal carcinoma by increasing cellular apoptosis', *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 15(3), pp. 209–216.
- Rawla, P., Sunkara, T. and Barsouk, A. (2019) 'Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors', *Przegląd Gastroenterologiczny*, 14(2), pp. 89–103. doi:10.5114/pg.2018.81072.
- Read, T.E. and Kodner, I.J. (1999) 'Colorectal cancer: risk factors and recommendations for early detection', *American Family Physician*, 59(11), p. 3083.
- Rehm, J. and Gmel, G. (2007) 'Alcohol consumption and public health in Russia.'
- Release, P. (2018) 'Latest global cancer data : Cancer burden rises to 18 . 1 million new cases and 9 . 6 million cancer deaths in 2018 Latest global cancer data : Cancer burden rises to 18 . 1 million new cases and 9 . 6 million cancer deaths in 2018', (September), pp. 13–15.
- Rl, S. *et al.* (2017) 'Colorectal cancer statistics, 2017', *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(3), pp. 177–193.
- Roldo, C. *et al.* (2006) 'MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior', *Journal of Clinical Oncology*, 24(29), pp. 4677–4684.
- Rosai, J. (2004) 'Special techniques in surgical pathology', *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, pp. 37–91.
- Rupnarain, C. *et al.* (2004) 'Colon cancer: Genomics and apoptotic events', *Biological Chemistry*, 385(6), pp. 449–464. doi:10.1515/BC.2004.053.
- Rutter, M.D. and Jover, R. (2020) 'Personalizing Polypectomy techniques based on polyp characteristics', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18(13), pp. 2859–2867.
- Saito, Y. *et al.* (2006) 'Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells', *Cancer cell*, 9(6), pp. 435–443.
- Sandhu, I.S. and Bhutani, M.S. (2002) 'Gastrointestinal endoscopic ultrasonography', *Medical Clinics*, 86(6), pp. 1289–1317.
- Saydam, F., Değirmenci, İ. and Güneş, H.V. (2011) 'MikroRNA\'lar ve kanser', *Dicle Tıp Dergisi*, 38(1).
- Shimono, Y. *et al.* (2009) 'Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells', *cell*, 138(3), pp. 592–603.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2019) 'Cancer statistics, 2019', *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(1), pp. 7–34.
- Simon, C.J., Dupuy, D.E. and Mayo-Smith, W.W. (2005) 'Microwave ablation: principles and applications', *Radiographics*, 25(suppl_1), pp. S69–S83.

- Slattery, M.L. *et al.* (1988) ‘Physical activity, diet, and risk of colon cancer in Utah’, *American Journal of Epidemiology*, 128(5), pp. 989–999.
- Solbiati, L. *et al.* (2012) ‘Small liver colorectal metastases treated with percutaneous radiofrequency ablation: local response rate and long-term survival with up to 10-year follow-up’, *Radiology*, 265(3), pp. 958–968.
- Song, B. *et al.* (2016) ‘Co-expressed differentially expressed genes and long non-coding RNAs involved in the celecoxib treatment of gastric cancer: An RNA sequencing analysis’, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(4), pp. 2455–2468.
- Stankevicius, V. *et al.* (2016) ‘Extracellular matrix-dependent pathways in colorectal cancer cell lines reveal potential targets for anticancer therapies’, *Anticancer Research*, 36(9), pp. 4559–4567.
- Street, W. Cancer facts & figures 2019. Am Cancer Soc, 76.,2019.
- Sung, H. *et al.* (2021) ‘Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries’, *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), pp. 209–249.
- T.C. Halk Sağlığı Kurumu (2018) ‘Türkiye Kanser İstatistikleri 2015’, *T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Müdürlüğü*, pp. 1–64. Available at: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf.
- Takamizawa, J. *et al.* (2004) ‘Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival’, *Cancer research*, 64(11), pp. 3753–3756.
- Thomas, M.G., Thomson, J.P.S. and Williamson, R.C.N. (1993) ‘Oral calcium inhibits rectal epithelial proliferation in familial adenomatous polyposis’, *Journal of British Surgery*, 80(4), pp. 499–501.
- Tian, L. *et al.* (2020) ‘MicroRNA-199a-5p suppresses cell proliferation, migration and invasion by targeting ITGA3 in colorectal cancer’, *Molecular Medicine Reports*, 22(3), pp. 2307–2317. doi:10.3892/mmr.2020.11323.
- TÜİK (2020) ‘Ölüm Ve Ölüm Nedeni İstatistikleri , 2019’, *Türkiye İstatistik Kurumu*, pp. 7–12. Available at: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710>.
- TÜİK. 2016. Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2016. <https://data.tuik.gov.tr/> Erişim tarihi: 27.04.2017
- Ura, H. *et al.* (1998) ‘Separate functions of $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins in the metastatic process of human gastric carcinoma’, *Surgery today*, 28(10), pp. 1001–1006.
- Vickers, A. (2000) ‘Recent advances: complementary medicine’, *BMJ: British Medical Journal*, 321(7262), p. 683.

- Vlachos, I.S. and Hatzigeorgiou, A.G. (2017) 'Functional analysis of miRNAs using the DIANA tools online suite', *Methods in Molecular Biology*, 1517, pp. 25–50. doi:10.1007/978-1-4939-6563-2_2.
- Wagholikar, K.B. *et al.* (2012) 'Clinical decision support with automated text processing for cervical cancer screening', *Journal of the American Medical Informatics Association*, 19(5), pp. 833–839. doi:10.1136/amiajnl-2012-000820.
- Wang, Hui *et al.* (2017) 'Digital quantitative analysis of microRNA in single cell based on ligation-dependent polymerase colony (Polony)', *Biosensors and Bioelectronics*, 95, pp. 146–151. doi:10.1016/j.bios.2017.04.001.
- Wang, J. *et al.* (2021) 'Increased collagen type v α 2 (Col5a2) in colorectal cancer is associated with poor prognosis and tumor progression', *Oncotargets and Therapy*, 14, pp. 2991–3002. doi:10.2147/OTT.S288422.
- Wang, W. *et al.* (2007) 'Mechanisms of acquired chemoresistance to 5-fluorouracil and tomudex: thymidylate synthase dependent and independent networks', *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 59(6), pp. 839–845.
- Wang, W. *et al.* (2010) 'Prognostic values of chromosome 18q microsatellite alterations in stage II colonic carcinoma', *World journal of gastroenterology: WJG*, 16(47), p. 6026.
- Webber, E.M. *et al.* (2015) 'Systematic review of the predictive effect of MSI status in colorectal cancer patients undergoing 5FU-based chemotherapy', *BMC cancer*, 15(1), pp. 1–12.
- Wei, X. *et al.* (2011) 'Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma', *Nature genetics*, 43(5), pp. 442–446.
- Wen, Z. *et al.* (2014) 'MCentridFS: A tool for identifying module biomarkers for multi-phenotypes from high-throughput data', *Molecular BioSystems*, 10(11), pp. 2870–2875. doi:10.1039/c4mb00325j.
- Wirtzfeld, D.A., Petrelli, N.J. and Rodriguez-Bigas, M.A. (2001) 'Hamartomatous polyposis syndromes: molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations', *Annals of surgical oncology*, 8(4), pp. 319–327.
- World Health Organization. 2018. Global Health Observatory. <http://www.who.int./data/gho> Erişim tarihi: 21.06.2018
- Wu, C.-W. and Storey, K.B. (2018) 'Regulation of Smad mediated microRNA transcriptional response in ground squirrels during hibernation', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 439(1), pp. 151–161.
- Xian, Y. *et al.* (2019) 'MicroRNA-769-5p contributes to the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by attenuating RYBP', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, p. 109343.
- Xie, J. and Itzkowitz, S.H. (2008) 'Cancer in inflammatory bowel disease', *World journal of gastroenterology: WJG*, 14(3), p. 378.

- Yanaihara, N. *et al.* (2006) 'Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis', *Cancer cell*, 9(3), pp. 189–198.
- Yang, K. *et al.* (1996) 'Cytokeratin, lectin, and acidic mucin modulation in differentiating colonic epithelial cells of mice after feeding Western-style diets', *Cancer research*, 56(20), pp. 4644–4648.
- Yoo, K.Y. *et al.* (1999) 'Reproductive factors related to the risk of colorectal cancer by subsite: a case-control analysis', *British journal of cancer*, 79(11), pp. 1901–1906.
- Yu, F. *et al.* (2007) 'let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells', *Cell*, 131(6), pp. 1109–1123.
- Yu, M. *et al.* (2019) 'O-GlcNAcylation of ITGA5 facilitates the occurrence and development of colorectal cancer', *Experimental Cell Research*, 382(2), p. 111464. doi:10.1016/j.yexcr.2019.06.009.
- Zaridze, D. *et al.* (2009) 'Alcohol and cause-specific mortality in Russia: a retrospective case-control study of 48 557 adult deaths', *The Lancet*, 373(9682), pp. 2201–2214.
- Zatonski, W.A. and Bhala, N. (2012) 'Changing trends of diseases in Eastern Europe: closing the gap', *Public health*, 126(3), pp. 248–252.
- Zenda, S. (2018) 'Chemoradiotherapy, the Standard Treatment at Present', *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy*, 45(3), pp. 412–415.
- Zeng, X.-T. *et al.* (2018) 'The clinical significance of COL5A2 in patients with bladder cancer: A retrospective analysis of bladder cancer gene expression data', *Medicine*, 97(10).
- Zhang, H. *et al.* (2011) 'MicroRNA expression profile of colon cancer stem-like cells in HT29 adenocarcinoma cell line', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(1), pp. 273–278. doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.106.
- Zhao, Y. *et al.* (2014) 'MicroRNA 130b suppresses migration and invasion of colorectal cancer cells through downregulation of integrin $\beta 1$ ', *PloS one*, 9(2), p. e87938.
- Zhou, J. *et al.* (2017) 'miR-224 controls human colorectal cancer cell line HCT116 proliferation by targeting Smad4', *International Journal of Medical Sciences*, 14(10), p. 937.
- (Board, P. A. T. E. Colon Cancer Treatment (PDQ®). In PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. National Cancer Institute (US),2020).