ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

KANSER VE VENÖZ TROMBOZ: Tümör Gelişimi ile Tromboz İlişkisinde Koagülomun Tanımlanması

Semih DALKILIÇ

Danışman

Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

Ankara

Temmuz

2014

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Semih DALKILIÇ

İmzası

Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ danışmanlığında, Semih DALKILIÇ tarafından hazırlanan bu çalışma 23/07/2014 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Nejat AKAR	İmza:
Üye	:Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ	İmza:
Üye	:Prof. Dr. Hatice MERGEN	İmza:
Üye	:Doç. Dr. Çetin KOCAEFE	İmza:
Üye	: Doç. Dr. Erkan YILMAZ	İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Kanser ve Venöz Tromboz: Tümör Gelişimi ile Tromboz İlişkisinde Koagülomun Tanımlanması

Semih DALKILIÇ

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

Trousseau Sendromu, malignant bir durumun öncesinde veya onunla birlikte görülen trombotik bir olayı ifade etmektedir. İlk defa 1865 yılında Armand Trousseau tarafından ifade edildiği gibi, venöz tromboz ile kanser arasında güçlü bir bağlantı mevcuttur. Bu bağlantı bir çok çalışma tarafından valide edilmiş, idiopatik venöz tromboz hastalarında kanser görülme riskinin yaklaşık 10 kata kadar arttığı belirlenmiştir. Önceki dönemlerde yapılan çalışmalarda tümör veya trombosit kaynaklı olabilen müsin veya doku faktörü gibi moleküllerin bu patolojinin ortaya çıkmasından sorumlu olduğu düşünülmekteydi. Bunlara ileveten hipoksi, onkogen aktivasyonu ve inflamatuvar sitokinler gibi başka moleküller ve mekanizmalar ileri sürülmüştür. Fakat bu bağlantının altında yatan mekanizma hala net olarak ortaya konmamıştır.

Bu çalışmada, kanser ve venöz tromboz arasındaki bağlantı incelenmiş ve kanser, venöz tromboz, kanser + tromboz ve sağlıklı bireylerden oluşan grupları karakterize edebilecek bir moleküler imzanın mevcut olup olmadığı araştırılmıştır. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda her bir ikili karşılaştırma için farklı ifade edilen gen listeleri belirlenmiştir.

Daha sonra bu gen listeleri ile yapılan ileri biyoinformatik analizler ve veri madenciliğinden sonra hiyerarşik kümeleme analizleri yapılmıştır. Verilen heatmaplerde de görüleceği üzere tüm ikili karşılaştırmalarda grupları birbirinden ayıran spesifik bir profile sahip oldukları, özellikle Kanser vs. Kontrol ve Tromboz vs. Kontrol karşılaştırmalarında bu durumun daha net olduğu görülmüştür. Yapılan yolak analizlerinde özellikle kanser yolağı, lökosit transendotelyal göç yolağı, aktin hücre iskelet regülasyon yolağı ve akson yönlendirme yolağı, prostat kanser yolağı gibi yolakların öne çıktığı tespit edilmiştir.

Yolak analizlerinden sonra QRT-PCR validasyonu için bir aday gen listesi belirlenmiştir. *CASPASE 8, CEACAM8, IKBKB ve HASP90B1* genleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yaptığımız bu çalışma ile bu 4 farklı grubun ifade profillemesinde farklı

moleküler imzaya sahip olduğunu ve *CASPASE 8, CEACAM8, IKBKB ve HASP90B1* genlerinin aday moleküler biyomarkır olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Ancak bu genlerin daha fazla sayıda örnek içeren farklı bir örnek grubunda valide edilmesi gerekmektedir.

2014, 221 sayfa

Anahtar kelimeler: Kanser, Trousseau Sendromu, Gen ifade profili, Mikrodizin.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

CANCER AND VENOUS THROMBOSIS: GENOMEWIDE EXPRESSION ANALYSIS IN ORDER TO IDENTIFY NEW MOLECULAR MARKERS THAT LIE BETWEEN THROMBOSIS AND TUMORIGENESIS

Semih DALKILIÇ

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Hilal ÖZDAĞ, Prof.

Trousseau Syndrome is defined as a thrombotic event preceding or appearing concomitantly with a visceral malignancy. As first described by Armand Trousseau in 1865, there is a strong association between cancer and venous thromboembolic disease. This association has been validated in several studies demonstrating high incidence of malignancy (up to 10 fold) in individuals who present unprovoked venous thromboembolism. In the early studies were suggested that tumor or platelet derived molecules like mucins and tissue factor has a pathologic role in this association. In addition to this some other mechanisms was proposed about hypoxia, oncogene activation and inflammatory cytokines. But underlying molecular mechanisms of this association remain elusive.

In this study we have examined the association between cancer and venous thromboembolism with the objective to determine whether idiopathic venous thromboembolism, cancer, cancer plus thromboembolism cases and healthy controls have a specific molecular signature characterizing each of these groups. We have determined differentially expressed gene sets for each pairwise comparison using rigorous bioinformatic analyses.

After the bioinformatics and detailed data mining analysis. We have performed hierarchical cluster analysis with these genes. As shown in the heat maps, some compared groups especially Cancer vs. Control and Thrombosis vs. Control have exhibited a special profile that able to distinguish two sample group each other. In the second part of bioinformatics and data mining analysis results have shown that many of these genes were sitting pathways in cancer, luekocyte transendothelial migration, regulation of actin cytoskelation, axon guidance, prostate cancer etc.

After the pathway analysis, we have determined a candidate gene list for QRT-PCR validations. *CASPASE 8, IKBKB, HSP90B1* and *CEACAM8* genes were found statistically significant. We have shown that, these different pathologies have a special molecular signature that able to distinguish each group from others. *CASPASE8, IKBKB, HSP90B1*and *CEACAM8* were determined as a candidate biomarker genes that able to distinguish these groups. But these genes must be validated with bigger sample size and another sample group.

2014, 221 pages

Keywords: Cancer, Trousseau Syndrome, Expression profile, Microarray.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve doktora eğitimim sırasında bana her zaman yol gösteren, iyi bir akademisyen olmam yolunda beni yönlendiren ve sabırla destekleyen örnek aldığım kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a

2007 yılında bana akademik camiaya ve bu enstitüye girme şansı veren değerli hocam Prof. Dr. Nejat AKAR'a

Beni her zaman destekleyen, bu günlere gelmemde en çok emek harcayan ve ne yazık ki çok erken kaybettiğim babam ve anneme,

Her zaman yanımda olan ablalarım Zerrin ve Fatma'ya ve değerli eşlerine

Hayatımın son on yılını birlikte geçirdiğim, her zaman bana destek olan, hayat arkadaşım sevgili eşim Tuba'ya ve biricik oğlum Tuna'ya

Bu uzun süreçte beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum ve yardımlarını esirgemeyen Genombilim ekibinin nadide üyeleri Bil. Uz. Seda YILMAZ'a, Dr. Nevin BELDER'e, Dr.Nilgün TEKİN'e, Dr. Yeşim DOĞAN'a, Bil. Uz. Hülya Sümer Çelebi'ye, Bil. Uz. Özge CUMAOĞULLARI'na, Dr. Günseli DENİZ'e, Bil. Uz. Zeynep ÖZKESERLİ'ye, Bil. Uz. Mehmet KORKMAZ'a

Değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Ali Emre AKPINAR'a, Bil. Uz. Reza DASTOURİ'ye, Dr. Aynur KARADAĞ'a

Biyoteknoloji Enstitüsünde birlikte çalıştığımız tüm mesai arkadaşlarıma

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Annem ve Babama

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN..... i
ONAY SAYFASI……...ii
ÖZET…….iii
ABSTRACT……v
TEŞEKKÜR……vii
İÇİNDEKİLER……...ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
SİMGELER DİZİNİ xvi
I. GİRİŞ 1
II. KURAMSAL TEMELLER 3
II.1. Kanser..... 3
II.1.1. Hücre Döngüsü..... 6
II.1.2. Kanserin Moleküler Biyolojisi 9
II.1.2.1. Onkogenler 9
II.1.2.2. Tümör Baskılayıcı Genler 10
II.1.2.3. Apoptozis 12
II.1.2.4. Hücresel Yaşlanma (Senescence)..... 14
II.1.2.5. Metastaz Biyolojisi..... 15
II.1.2.6. Anjiyogenez 16
II.2. HEMOSTAZ 18
II.2.1.Koagülasyon Mekanizması 20
II.2.2. Kan Pıhtısının Erimesi (Fibrinolizis) 23
II.3. VENÖZ TROMBOZ 25
II.3.1.Venöz Tromboz İle İlişkili Risk Faktörleri 26
II.4. TROUSSEAU SENDROMU..... 29
II.4.1. Kanser ve Tromboz Arasındaki İlişkinin Tarihçesi 29
II.4.2. Kanser ve Tromboz Arasındaki İlişkinin Patogenezi..... 31
II.4.3. Kanser ve Venöz Tromboz Arasındaki İlişkinin Moleküler Temelleri 36

II.5. MİKRODİZİN TEKNOLOJİSİ 39
II.5.1. Mikrodizinlerin Kullanım Alanları 42
II.5.2. Biyoinformatik Analiz 43
II.5.2.1. Preprocessing (Ön İşleme) 44
II.5.2.2. Varyans Filtreleme, Karşılaştırma ve Farklı İfade Edilen Genlerin Belirlenmesi 47
II.5.2.4. Farklı İfade Edilen Genlerin Zenginleştirilmesi (DAVID) 48
III.GEREKÇE VE AMAÇ 51
IV.MATERYAL VE YÖNTEM 55
a.Materyal 55
V.ARAŞTIRMA BULGULARI 75
a.İzole Edilen RNA'ların Kalite ve Miktar Tayini 75
b.aRNA Sentezi 76
c.aRNA'ların Fragmentasyonu 77
d.Hibridizayon Sonuçları 78
e.Biyoinformatik Analiz Bulguları 1 (dCHIP) 78
VI.TARTIŞMA VE SONUÇ 108
VI.1. Kümeleme Analizleri 109
VI.2. Fonksiyonel Annotasyon Analizleri 110
VI.3. Yolak Analizleri 112
VIII. SONUÇ VE ÖNERİLER…….
Ek- 1: Farklı ifade edilen gen listeleri 135
Ek-2: Biyoanalizör Sonuçları 175
Ek-3: Her bir gruptaki örnekler için elde edilen % NP değerleri 183
Ek.4. Seçilen aday genlerin listesi 194
Ek.5. qRT-PCR için tasarlanan primerler…….. 193
Ek.6. qRT-PCR için tasarlanan primerler…….. 194
ÖZGEÇMİŞ 202

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal Hücrenin Malign Transformasyonu ……....4

Şekil 2.2. Kadınlarda ve erkeklerde yeni kanser vakalarının dağılımı ve ölüm oranları ……..……...5

Şekil 2.3. Erkeklerde yıllara göre kanserden ölüm oranları ..……...6

Şekil 2.4. Kadınlarda yıllara göre kanserden ölüm oranları ..……6

Şekil 2.5. Hücre döngüsü kontrol noktaları ..……....8

Şekil 2.6. Apoptozisin aktivasyonu ..……...13

Şekil 2.7. Hücresel yaşlanma .……14

Şekil 2.8. Yeni damar oluşumu .……..17

Şekil 2.9. Trombositlerin damar endoteline yapışması ve agregasyonu ..……...19

Şekil 2.10. Pıhtılaşma mekanizmasında Ekstrinsik ve İntrinsik yolaklar .……..21

Şekil 2.11. Hücre temelli koagülasyon modeline göre intrinsik ve ektrinsik yolaklar arasındaki ilişki ….……..23

Şekil 2.12. Fibrinolizis …….……...24

Şekil 2.13. Bacaktaki toplardamarlarda görülen trombozun ve embolinin şematize edilmesi ……..……...26

Şekil 2.14. Kanserin koagülom ve vasküler sistem ile olan ilişkisi ve bu ilişkide rol oynayan gen ve moleküller …..……37

Şekil 2.15. Affymetrix GeneChip ve prob hücresinin genel görünümü ..……...41

Şekil 2.16. DNA problarının sentetik bir yüzey üzerine fotolitografi tekniği ile sentezlenmesi ……..……42

Şekil 2.17. Normalizasyon öncesi ve sonrası korelasyon grafiği …..……46

Şekil 2.18. Normalizasyon öncesi ve sonrasında MA grafikleri ……..……...……47

Şekil 2.19. DAVID ile yapılan fonksiyonel annotasyon kümeleme analizi sonucunda elde edilen kümelerin bir kısmını gösteren ekran görüntüsü ……...49

Şekil 2.20. DAVID yolak analizi ekran görüntüsü ……..……..…..50

Şekil 3.1. Gerekçe ve Amaç ……..……..…….52

Şekil 4.1. GeneChip 3’ IVT kit ile cDNA sentezinin akış şeması …..……..…..60

Şekil 4.2. Biyoinformatik analiz akış şeması ……..……..….69

Şekil 5.1. Biyoanalizör cihazında yürütülen 09/26 nolu RNA örneğinin temsili sanal jel görüntüsü ……..74

Şekil 5.2. Biyoanalizör cihazında yürütülen 09/26 nolu RNA örneğinin temsili elektroferogram görüntüsü …..……75

Şekil 5.3. Fragmente edilen RNA örneklerinin % 1'lik agaroz jeldeki temsili görüntüsü ……...…76

Şekil 5.4. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Kanser ve Kontrol grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu ……79

Şekil 5.5. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Kanser ve Kanser + Tromboz grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu ……...…..…...80

Şekil 5.6. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Kanser ve Tromboz grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu …..81

Şekil 5.7. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Kanser + Tromboz ve Kontrol grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu …….82

Şekil 5.8. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Tromboz ve Kontrol grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu ……..83

Şekil 5.9. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Kanser + Tromboz ve Tromboz grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu **..**……...…….84

Şekil 5.10. DAVID gen listesi ile yapılan Kanser ve Kontrol gruplarının kümeleme analizi ……...……..91

Şekil 5.11. DAVID gen listesi ile yapılan Kanser ve Tromboz gruplarının kümeleme analizi ……..…92

Şekil 5.12. DAVID gen listesi ile yapılan Kontrol ve Kanser + Tromboz gruplarının kümeleme analizi ……..……..93

Şekil 5.13. DAVID gen listesi ile yapılan Tromboz ve Kanser + Tromboz gruplarının kümeleme analizi ……...……94

Şekil 5.14. DAVID gen listesi ile yapılan Tromboz ve Kontrol gruplarının kümeleme analizi ……95

Şekil 5.15. DAVID gen listesi ile yapılan Kanser ve Kanser + Tromboz gruplarının kümeleme analizi ……..……..96

Şekil 5.15 Caspas 8 geni amplifikasyon eğrisinin temsili görüntüsü …….……101

Şekil 5.16 Caspas 8 geni erime eğrisinin temsili görüntüsü ……..……..102

Şekil 5.17 *CASPASE8* geni için elde edilen standart eğrinin temsili görüntüsü…. …..102

Şekil 6.1 QRT-PCR validasyonu sonucunda istatistiksel olarak anlamlı çıkan dört genin herbir gruptaki ifade düzeyleri (Hata çubuklarında *Standart Error* değerleri kullanılmıştır).....114

Şekil 7.1. Tromboz ve KT gruplarının valide edilen dört gen ile yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu.....117

Şekil 7.2. Kanser ve KT gruplarının valide edilen üç gen ile yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu.....118

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Onkogenler, kodladıkları proteinlerin görevleri ve aktivasyon mekanizmaları ……...10

Çizelge 4.1. Gruplardaki örnek sayıları ……...….55

Çizelge 4.2. Örneklere ait demografik veriler ……...55

Çizelge 4.3. Kanser ve Kanser + Tromboz grubunda bulunan örneklerin kanser tipleri ……56

Çizelge 4.4. 3’ IVT Kit ile tavsiye edilen başlangıç RNA konsantrasyonları ……..61

Çizelge 4.5. Poly-A kontrol dilüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan tablo ….....61

Çizelge 5.1. İzole edilen RNA’ların temsili spektrofotometrik okumaları ……...75

Çizelge 5.2. Elde edilen aRNA’ların temsili spektrofotometrik okumaları 76

Çizelge 5.7. dCHIP ile elde edilen farklı ifade edilen gen listesinin bir kısmı …….78

Çizelge 5.8. Karşılaştırılan gruplar arasında farklı ifade edilen gen sayıları…….....78

Çizelge 5.9. DAVID fonksiyonel kümeleme analizi sonucu elde edilen küme sayıları ……85

Çizelge 5.10. Fonksiyonel kümeleme analizi sonucunda elde edilen kümeler, bu kümelerin zenginleşme skorları ve bu kümelerdeki gen sayıları (ZS: Zenginleşme Skoru) ……...85

Çizelge 5.11. Kanser ve Kontrol grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo …..86

Çizelge 5.12. Kanser ve Kanser + Tromboz grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo ……...87

Çizelge 5.13. Kanser ve Tromboz grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo...88

Çizelge 5.14. Kanser + Tromboz ve Kontrol grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo ……...89

Çizelge 5.15. Tromboz ve Kontrol grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo ..90

Çizelge 5.16. Tromboz ve Kanser + Tromboz grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo ……...90

Çizelge 5.17. Seçilen genlerin karşılaştırma grupları arasındaki kat değişim oranları ……....98

Çizelge 5.18. Kat değişimi değerlerine göre **Kontrol > KT > Kanser > Tromboz** şeklinde bir profil sergileyen genler ……..99

Çizelge 5.19. Kat değişimi değerlerine göre **Kontrol > Kanser > KT > Tromboz** şeklinde bir profil sergileyen genler ……..99

Çizelge 5.20. Kat değişimi değerlerine göre **Kontrol > KT > Tromboz > Kanser** şeklinde bir profil sergileyen genler ...……...…….100

Çizelge 5.21 QRT-PCR hesaplama sonuçları ……...……..103

Çizelge 5.22 QRT-PCR istatistik analiz sonuçları ……..104

Çizelge 5.23 Caspas 8 geninin Kanser ve KT ikili karşılaştırmasındaki p değeri …..104

Çizelge 5.24 İkinci aşamada seçilen 10 gen için yapılan QRT-PCR analiz sonuçları……...106

Çizelge 5.25 Anlamlı bulunan genlerin ikili karşılaştırmalardaki p değerleri ……....106

Çizelge 6.1. İkili karşılaştırmalarda öne çıkan metabolik yolaklar 111

SİMGELER DİZİNİ

ºC	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ADP	Adenozin di fosfat
ANG-1	Anjiyotensin-1
APC	Aktive protein C
aPTT	Aktivated partial thromboplastin time
aRNA	Amplified Ribonükleik asit
ATP	Adenozin tri fosfat
CDK	Cyclin dependent kinases
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CEL	Cell intensity file
CP	Cancer procoagulant
DAT	Data file
DNA	Deoksiribonükleik asit
DVT	Derin ven trombozu
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HIF-1	Hipoxia inducible factor-1
HMWK	High molecular weight kininogen
IL-8	Interluekin-8
IVT	In vitro transkripsiyon
MM	Mismatch
MMP	Matrix metalloproteinaz
MTHFR	Metilentetrahidrofolatredüktaz
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAR-1	Protease activated receptor-1
PAR-2	Protease activated receptor-2
PCR	Polimerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Fosfotidil etanolamin

PIGF	Placental growth factor
PM	Perfect match
PS	Fosfatidilserin
PSGL-1	P-selektin glikoprotein reseptör-1
RNA	Ribonükleik asit
TF	Doku faktörü
TGF-β	Transforming growth factor beta
t-PA	Doku-plazminojen aktivatör
TXA2	Tromboksan A2
UTR	Untranslated region
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VTE	Venöz tromboz
vWF	von Willebrand Factor

I. GİRİŞ

İkinci bin yılın başlarında olduğumuz bu dönemde, insan sahip olduğu zeka ve düşünme yeteneği sayesinde dünya üzerinde hakimiyet kurmuş bir varlıktır. Gelişmiş bir organizma çok hassas bir denge içerisinde çalışan ve birbirine bağlı karmaşık sistemlerden oluşur. Böyle bir sistemler bütününde ortaya çıkabilecek bozukluklar yani hastalıklar da karmaşık bir yapıya sahiptir. Sadece bulunduğu doku veya organı değil, uzak organları da etkileyebilen ve çok basamaklı bir süreç sonunda ortaya çıkan kanser bu hastalıkların başında gelmektedir.

Kanser, bir hücrenin sahip olduğu kontrol mekanizmalarından kurtularak normal hücrelerde gözlenmeyen kontrolsüz bölünme, diğer dokuları işgal etme, apoptozis mekanizmasından kurtulma ve ölümsüzlük özelliklerini kazanması olarak ifade edilebilir. Organizmanın herhangi bir dokusunda kontrolsüz olarak çoğalan bir hücre yığını öncelikle primer tümör olarak adlandırılır. Primer tümörde bulunan bazı hücreler metastaz olarak adlandırılan bir mekanizma ile başka doku veya organlara yerleşirler. Böyle bir durumda organizmanın genel durumu bozulmakta ve hastalıkla mücadele etmek daha zor olmaktadır.

Dünyada milyonlarca kişi bu hastalık ve oluşturduğu komplikasyonlarla mücadele etmek zorunda kalmaktadır. Bilimadamları bir yandan kanseri tedavi etmeye yönelik araştırmalar yaparken bir yandan da kanser hastalarının yaşam kalitesini arttırmaya ve kanserin komplikasyonlarını hafifletmeye yönelik çalışmalar yapmaktadırlar.

Kanser hastalarında en sık ortaya çıkan komplikasyonların başında venöz tromboz gelmektedir (1). Venöz tromboz, derin ven trombozu ve pulmoner embolizm gibi patolojileri de içine alan ve damar içerisinde pıhtılaşma olarak tanımlanan durumdur (2).

Kanser ve venöz tromboz arasındaki ilişki ilk defa yaklaşık bir asır önce Fransız bir hekim olan Armand Trousseau tarafından bildirilmiştir. Günümüzde Trousseau Sendromu olarak adlandırılan bu yakın ilişkinin varlığı net bir şekilde ortaya

konmuştur (3). Ancak bu bağlantının moleküler temelleri ve altında yatan mekanizmalar halen belirsizliğini korumaktadır.

Bu tezin konusunu oluşturan Trousseau sendromunun moleküler analizi ile ilgili araştırma stratejisi ve bulgulara geçmeden önce, kuramsal temeller bölümünde çalışmanın hipotez ve bilimsel dayanaklarını ayrıntılı olarak açıklayabilmek üzere Trousseau sendromunun bileşenleri içinde yer alan kanser, hemostaz ve venöz tromboembolizm ayrı başlıklar altında incelendikten sonra Trousseau sendromu ile ilgili bugüne kadar yürütülmüş olan çalışmalara değinilecektir. Bu bölümün son kısmında ise tez çalışmasının araştırma metodolojisi olarak kullanılan mikrodizin teknolojisi ve biyoinformatik analiz yaklaşımlarının temelleri açıklanacaktır.

II. KURAMSAL TEMELLER

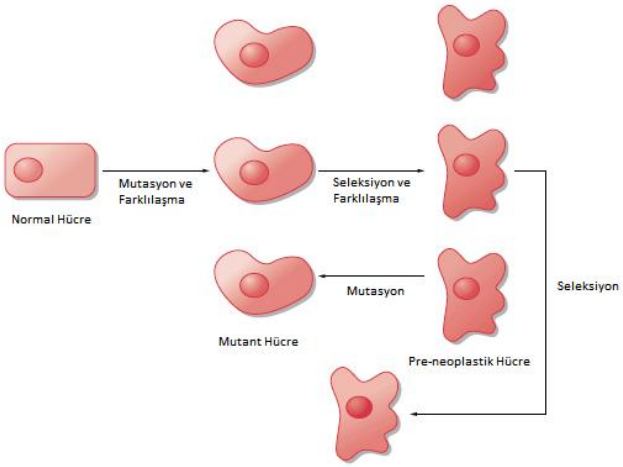
II.1. Kanser

Kanser, normal bir hücrenin genomunda meydana gelen mutasyonlar sonucunda yeni özellikler kazanarak kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmasıyla karakterize olan bir hastalıktır. Hücrenin genomik bütünlüğünün bozulması kansere yol açmaktadır. Gen veya kromozom düzeyinde olan bu bozukluklar özellikle iki grup gende meydana gelen mutasyonlar sonucu olmaktadır. Hücrede büyüme ve farklılaşmadan sorumlu olan genler mevcuttur. Bu genler normal şartlarda proto-onkogen olarak adlandırılırlar. Bu genleri etkileyen bir mutasyon olması durumunda onkogene dönüşerek hücrenin kontrolsüz bir şekilde büyümesine ve bölünmesine yol açarlar. İkinci grup genler olan tümör baskılayıcı genler ise genomu koruyan genlerdir. Hücre bölünmesi, DNA replikasyonu gibi normal prosedürlerde ortaya çıkan hataların düzeltilmesini sağlayarak genomik bütünlüğü devam ettirirler. Bu genlerde meydana gelen bir işlev kaybı hücreyi mutasyonlara karşı daha korunmasız bırakacaktır. Bu şekilde insanların yaşamları boyunca maruz kaldıkları çevresel faktörlerin etkisi ve ortaya çıkan mutasyonların zaman içindeki birikimiyle kanser ortaya çıkmaktadır. Kanserin görülme oranı yaşla doğru orantılı olarak artmaktadır (4). İnsanlar yaşlandıkça toksik maddelere maruz kalma süreleri uzamakta ve kansere yakalanma riski artmaktadır (5). Şekil 2.3. ve Şekil 2.4'de, kadın ve erkeklerin kanserden ölüm oranlarının yıllara göre dağılımı ve kanser tipleri görülmektedir. Ortaya çıkan kanserin türü ırk, cinsiyet ve bölgesel olarak da farklılık gösterebilmektedir. Şekil 2.2.'de de görüldüğü üzere erkeklerde en fazla görülen kanser türü prostat iken kadınlarda meme kanseridir.

Neoplastik bir hücrede, dört önemli hücresel fonksiyonun regülasyonu bozulmuştur. Bunlar;

1- Hücre proliferasyonu üzerindeki normal kısıtlayıcı etki ortadan kalkmıştır.
2- Diferensiyasyon programı bozulmuştur.
3- Kromozomal ve genetik organizasyon destabilize olmuştur.
4- Sıkı şekilde kontrol edilen apoptozisin regülasyonu bozulmuştur.

Şekil 2.1.'de de görüldüğü üzere mutasyona uğrayan hücre prolifere olarak pre-neoplastik hücreye dönüşür. Daha sonraki adımlarda neoplastik hücrenin sahip olduğu özellikleri de kazanarak tümör hücresine dönüşür. Bu şekilde kontrolsüz biçimde çoğalan tümör hücreleri bir kitle oluşturmaktadır. Hemen hemen tüm kanser türleri erken safhada hiçbir belirti vermezler. Ancak ileri safhalarda bir kitle oluştuğu zaman semptomlar ortaya çıkmaktadır. Kanserin hayat kalitesini düşüren ve nihayetinde hayatı tehdit eden semptomlarının ortaya çıkmasında birçok mekanizma rol oynayabilir. Oluşan kitlenin herhangi bir damarda kan akımını etkilemesi, bir sinire baskı yapması veya özellikle beyinde intrakranial basınç değişiklikleri gibi etkenler çeşitli semptomların ortaya çıkmasına sebep olabilir (6).

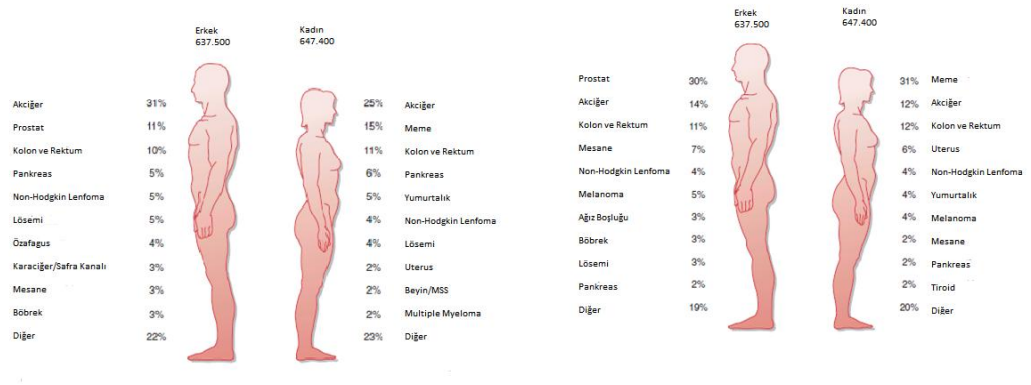


Şekil 2.1. Normal Hücrenin Malign Transformasyonu (6).

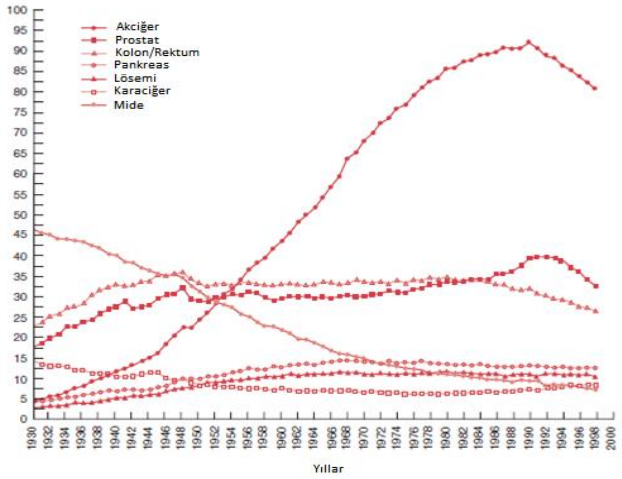
Kanserin etiyolojisiyle ilgili pekçok hipotez öne sürülmüştür. Bunların taşıdığı ortak özellik ise kanserin genetik bir hastalık olduğu, pek çok faktörün etkisiyle ortaya çıktığı ve kanser oluşumunun tek bir basamakta değil de çok basamaklı bir süreçte gerçekleştiğidir (4). Günümüzde teknolojinin ve buna bağlı olarak tıbbın ilerlemesi, yeni teşhis ve tedavi tekniklerinin geliştirilmesi insan hayatını olumlu yönde etkilemektedir.

Geçmişte, insanlığın tedavisini bilmediği hastalıklardan veya basit enfeksiyonlardan dolayı ölümler çok yaygın olmaktaydı. Ancak antibiyotiklerin keşfedilmesi, insanların enfeksiyonlarla savaşından galip çıkmasını sağlamıştır. Bütün bu gelişmeler ışığında insanların ortalama yaşam süreleri uzamış bu da insanların çeşitli kimyasallara ve olumsuz çevresel koşullara maruz kalma sürelerini uzatmıştır. Kısacası insanlar artık kanser geliştirebilecek kadar uzun süre yaşamaktadır. Bunun temel kaynağını ise,

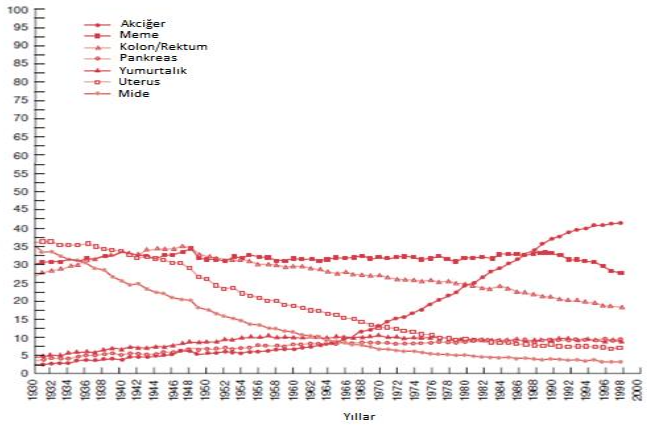
insanoğlunun hayatı boyunca geçirdiği mutasyonların zaman içerinde birikerek kansere yol açtığı görüşü oluşturmaktadır (4). Özellikle hücrenin gelişimini ve farklılaşmasını sağlayan mekanizmalarda meydana gelen mutasyonlar kansere sebep olmaktadır. Hanahan ve Weinberg bunu bazı ayırtedici özellikler olarak tanımlamışlardır. Bunlar; hücrenin dıştan gelen sinyallere duyarsızlaşması, kendi büyüme sinyallerini oluşturabilmesi, programlı hücre ölüm mekanizmasında bozulma, başka dokuları istila etme ve anjiyogenezi indükleme (7).



Şekil 2.2. Kadınlarda ve erkeklerde yeni kanser vakalarının dağılımı ve ölüm oranları (6).



Şekil 2.3. Erkeklerde yıllara göre kanserden ölüm oranları (6).



Şekil 2.4. Kadınlarda yıllara göre kanserden ölüm oranları (6).

II.1.1. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, bir hücrenin yaşam döngüsünü ifade eden bir terimdir. Hücreler başka bir hücrenin bölünmesiyle oluşur, gelişip olgunlaşır, bu aşamadan sonra ya tekrar bölünür ya da istirahat evresi denilen bir faza girerek bu şekilde yıllarca kalabilir en sonunda ise ölürler. Hücre döngüsü çok düzenli ve sıkı kontrol altında tutulan bir süreçtir. Bu sürecin işleyişinde hücre dışı büyüme sinyalleri, hücrenin boyutu ve DNA bütünlüğü önemli rol oynamakta ve çeşitli kontrol noktaları ile denetlenmektedir. (8). Hücre döngüsündeki olaylar 5 safhada incelenir.

1. G1 Evresi: Bu evrelerde hücre bir duraklama fazına girmektedir. Hücre döngüsündeki bu aşamaya G evresi denilmesinin sebebi İngilizce Gap (Ara) sözcüğünden kaynaklanmaktadır. Bu evrede DNA sentez safhasına hazırlıklar yapılır.

2. S Evresi: Hücrenin bölünmesi sırasında kullanacağı enzimlerin ve DNA sentezinin yapıldığı fazdır. S evresi denmesinin sebebi sentez kelimesinden gelmektedir.

3. G2 Evresi: Bu duraklama evresinde hücre bir sonraki mitoz bölünme safhası için hazırlanır.

4. M Evresi: Hücre bu evrede bölünme sürecine girer. Mitoz bölünme yoluyla gerçekleştiği için bu evre M evresi adını alır.

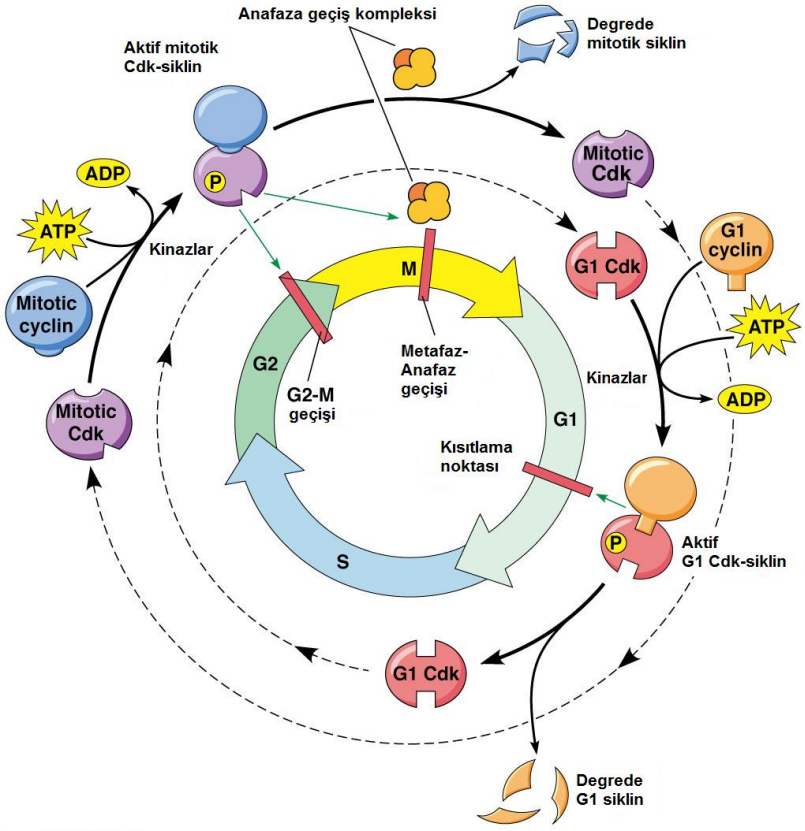
5. G0 Evresi: Vücuttaki hücrelerin büyük çoğunluğu G0 evresinde bulunmaktadır. Hücre G0 evresine girdiği zaman bölünme sürecini askıya almış demektir. Döngü bu durumda bekler. Ancak herhangi bir dış uyaran olduğu zaman hücre tekrar bölünme döngüsüne girebilir. Bu döngü yoluyla organizma yeterli sayıda hücreye sahip olduğunda hücreler dış uyarılar yoluyla bölünmeyi durdurup bekleme fazına girerler. Bu sayede gereksiz hücre bölünmesi ve çoğalması meydana gelmez. Ancak kanser hücrelerinde durum böyle değildir. Kanser hücreleri kontrolsüz bir biçimde sürekli çoğalırlar. Bu nedenle hücre döngüsü ve bunun kontrolü tümör oluşumunda önemli bir süreçtir (8).

Hücre döngüsünün regülasyonunda siklin bağımlı kinazlar (CDK) adı verilen bir enzim grubu ve bunlara refakat eden siklin proteinleri görev almaktadır. CDK ve siklinler hücre döngüsünün pozitif regülatörleridir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ise bu döngüyü negatif olarak regüle eden proteinlerdir (8).

Hücre döngüsü hatalı seyretmesi durumunda, döngüyü durduran veya hücreyi ölüme götüren mekanizmalarla çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Ortaya çıkan problem düzeltilemeyecek kadar büyükse hücre programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis mekanizmasına yönlendirilir. Apoptozis evrimsel süreçte korunmuş ve çok hücreli organizmalarda hücrelerin programlı ölüm mekanizmasına verilen addır. (9).

Hücre döngüsünün temel aşamalarının gösterildiği Şekil 2.5'deki denetleme bölgeleri *kontrol noktaları* olarak ifade edilir. Bu kontrol noktalarında hücre

bölünmesinde bir faz tamamlanmadan diğer faza geçme engellenir. Bu aşamalarda döngü durdurulur ve fazın tamamlanması sağlanır. Bu noktalardan birisi G2 fazından M fazına geçmeden önce DNA replikasyonun tamamlanıp tamamlanmadığını kontrol eder. Eğer bu fazda DNA replikasyonu tamamlanmadıysa döngü durur ve replikasyonun tamamlanması sağlanır.



Şekil 2.5. Hücre döngüsü kontrol noktaları (10) dan adapte edilmiştir.

Bir diğer kontrol mekanizması ise DNA hasarını kontrol eder. Bu kontrol noktaları S, geç G2 ve geç G1 fazlarında bulunmaktadır. Bu noktada p53 proteini merkezi bir rol oynamaktadır. Eğer DNA'da bir hasar mevcutsa p53 proteini bu aşamada döngüyü durdurur ve hasarın giderilmesini sağlar. Eğer hasar onarılamayacak kadar büyükse bu durumda p53 apoptozis mekanizmasıyla hücreyi ölüme yönlendirir.

II.1.2. Kanserin Moleküler Biyolojisi

II.1.2.1. Onkogenler

Kanserin, normal görevleri aslında hücre büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eden genlerde meydana gelen yapısal ve/veya fonksiyonel bir takım değişikliklerden dolayı ortaya çıktığı bilinmektedir (11, 12). Çeşitli kimyasallar, radyasyon ve virüsler gibi pek çok etken DNA'yı hedef alarak bu yapısal ve fonksiyonel bozulmalara sebep olmaktadır. Hangi etkenle olursa olsun sonuçta bir takım genlerde meydana gelen mutasyonlar normal bir hücreyi kanser hücresine dönüştürebilmektedir.

Hücre büyümesini kontrol eden genler proto-onkogenler olarak adlandırılırlar. Bu genler normal hücresel faaliyetleri idare eden genlerdir. Ancak herhangi bir etkenle mutasyona uğradıkları zaman onkogene dönüşmekte ve kanser oluşturma özelliği kazanmaktadırlar. Genel olarak bu olay "işlev kazanımı" olarak ifade edilmektedir. Çünkü bu genler kanser oluşturabilecek bir fonksiyon kazanmaktadırlar.

Çeşitli mekanizmalar yoluyla proto-onkogenler onkogenlere dönüşüp kanser oluşturma özelliği kazanırlar. Bu mekanizmalar;

1- Nokta Mutasyonları
2- Gen Amplifikasyonları
3- Yeniden düzenlemeler
4- İnsersiyonel Mutasyonlar'dır.

Onkogenler ürettiği proteinlerin fonksiyonel ve biyokimyasal özelliklerine göre 5 ana grupta toplanabilir.

1- Transkripsiyon Faktörleri
2- Büyüme Faktörleri
3- Büyüme Faktör Reseptörleri
4- Sinyal İletici Moleküller
5- Diğerleri (Apoptozisi Düzenleyen Proteinler vb.)

Çizelge 2.1. Onkogenler, kodladıkları proteinlerin görevleri ve aktivasyon mekanizmaları.

Onkogenler		
Gen	**Fonksiyonu**	**Kanserdeki Aktivasyon Mekanizması**
RAS	Mitojenik sinyal yolağında GTPaz	GTPaz'ı bloke eden mutasyon
MYC	Mitojenik sinyal yolağında gen regülatör faktörü	Yüksek düzeyde ifade
FOS, JUN	Mitojenik sinyal yolağında gen regülatör faktörü	Yüksek düzeyde ifade
RAF	Mitojenik sinyal yolağında protein kinaz	Aktive edici mutasyon
EGFR	Mitojen EGF reseptörü	Mutasyon veya yüksek düzeyde ifade
PDGF	Mitojen	Yüksek düzeyde ifade
BCL2	Apoptozis inhibitörü	Yüksek düzeyde ifade
ABL	Çok fonksiyonlu protein kinaz	Mutasyon veya yüksek düzeyde ifade
SRC	Çok fonksiyonlu protein kinaz	Aktive edici mutasyon
PIK3CA	PI3 Kinazın katalitik altbirimi	Mutasyon veya yüksek düzeyde ifade
AKT	Çok fonksiyonlu protein kinaz	Mutasyon veya yüksek düzeyde ifade

II.1.2.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Kanser oluşumunda önemli bir yere sahip olan ve onkogenlerin tersi bir görevi olan genler de mevcuttur. Bu genler tümör baskılayıcı genler olarak isimlendirilirler. Tümör baskılayıcı genler hücrede proliferasyonu baskılayan ve apoptozisi indükleyen genlerdir. Bu genlerin kaybı veya inaktive olması sonucu hücre proliferasyonu artar ve hücre ölüm mekanizması çalışamaz hale gelir. Bu durum da genel olarak "işlev kaybı " olarak ifade edilir (13).

İlk olarak karakterize edilen tümör baskılayıcı gen, kalıtsal retinoblastoma hastalığından sorumlu olan *RB* genidir. Bu gen tarafından kodlanan protein yani Rb proteini, büyüme faktörlerinin yokluğunda hücre farklılaşmasını baskılayan bir proteindir. Bu gende meydana gelen bir mutasyon sonucu retinada tümör oluşmaktadır. Bu hastalıkta dikkat çeken durum ailesinde retinoblastoma olan çocuklarda bu hastalığın görülme sıklığının artmasıdır. Bu durum hastalığın iki formu olduğunu göstermiştir; ailesel ve sporadik retinoblastoma. Ailesel retinoblastomada mutant allel ebeveynlerden çocuklara aktarılmakta ve bu hastalığın çocuklarda ortaya çıkma oranını arttırmaktadır. Ancak sporadik türde durum böyle değildir bir başka deyişle aktarılan bir mutant allel yoktur. Bu durum 1971 yılında Alfred Knudson'ın ileri sürdüğü "two-hit model" ile açıklanmıştır. Bu modele göre, retinoblastomanın ortaya çıkması için genin iki allelinin de mutasyona uğramış olması gerekmektedir. Sporadik formda aileden aktarılan mutant bir allel yoktur ve mutasyonların aynı hücrede sporadik olarak ortaya çıkması gerekir. Ancak ailesel retinoblastomada, en az bir mutant allel ebeveynlerden biri tarafından çocuğa aktarılmakta böylece çocuklarda bu hastalığın görülme riski artmaktadır (13). Yine bu bireylerin kromozomları incelenmiş ve somatik hücrelerinin 13. kromozomunda biri mutant olmak üzere iki allelin bulunduğu ancak bu hastaların tümör dokularında bu genin yalnızca bir allelinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu durum "*Heterozigotluğun Kaybı*" olarak ifade edilmektedir. Bu durum, anormal kromozomun reduplikasyonunun ardından normal kromozomun kaybolması, normal kromozomdaki delesyon veya rekombinasyon gibi mekanizmalar yoluyla gerçekleşmektedir (14).

1980'lerde *RB* geninin tanımlanmasından sonra diğer birçok tümör baskılayıcı gen belirlenmiştir. Örneğin; adenomatöz poliposis coli (*APC*), *BRCA1* ve *BRCA2*, Wilms Tumör geni (*WT1*), Nörofibromatosis (*NF1*) ve tümör protein 53 (*TP53* veya *p53*). Bunlardan en önemlisi ise *p53* proteinini kodlayan *P53* genidir. Birçok kanser türünde bu gende mutasyonlara rastlanmıştır (15). *P53* geni hücreyi DNA hasarlarına karşı korumaktadır. Bu yüzden *P53* geni "genomun gardiyanı" olarak tanımlanır (16).

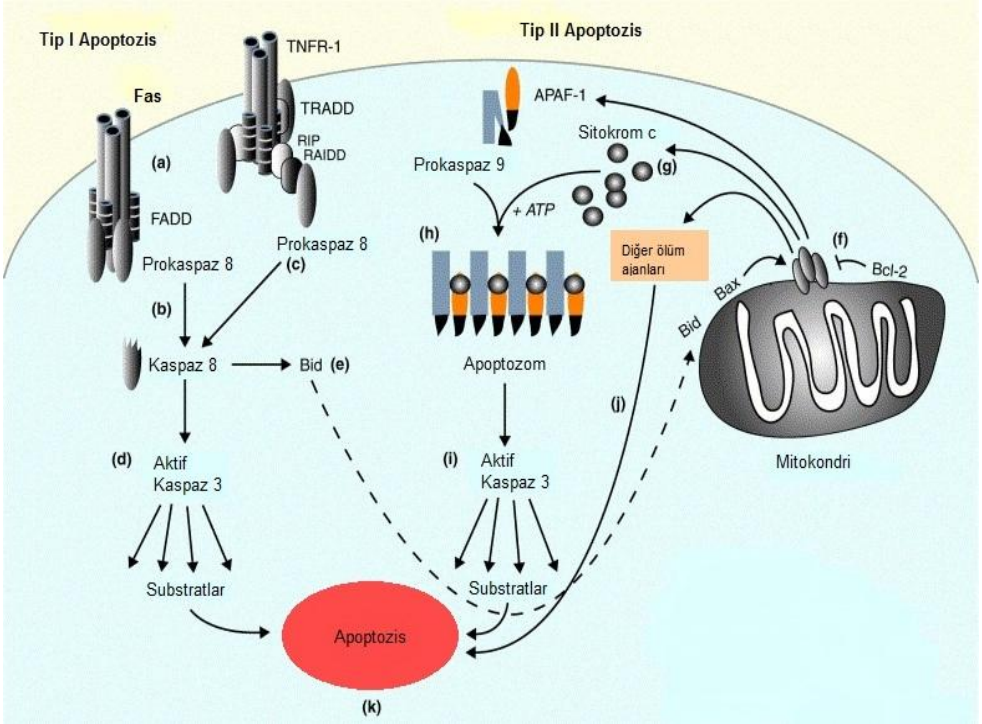
Yapılan çalışmaların sayısı arttıkça bu genler hakkındaki bilgilerimiz de buna paralel olarak artmıştır. Farklı yolaklarda birçok farklı fonksiyona sahip olabilen bu genler trankripsiyon faktörleri, transkripsiyon regülatörleri, kinaz inhibitörleri,

fosfatazlar ve hücre yapısal komponentleri olarak görev yapabilirler. Vogelstein ve Kinzler tümör baskılayıcı genleri **koruyucu** (Gatekeeper) ve **bakıcı** (Caretaker) olarak iki büyük gruba ayırmışlardır. Koruyucu genler, direk olarak tümör gelişimi üzerine sınırlayıcı etkileri bulunan genlerdir. Tümör oluşumu için bu genin her iki kopyasının da inaktive olması gerekir. Buna karşılık, bakıcı genlerdeki bir inaktivasyon direk olarak tümör gelişimini etkilemez. Bu durumda genomun kararsızlığından dolayı genetik materyal mutasyonlara daha açık hale gelir. Bu da mutasyon oluşum oranını arttırır. Birçok sporadik tümörde bu genler mutasyon sonucu inaktive olmuştur (17).

II.1.2.3. Apoptozis

Apoptozis kelimesi eski Yunancada "kopup dökülmek" anlamına gelmektedir. Özellikle sonbaharda ağaçların yapraklarını dökmesi için kullanılan bir terimdir. Bugün ise hakkında binlerce araştırma yapılmış ve halen yapılmakta olan sıcak bir alandır. Apoptozis çok hücreli organizmalarda özellikle gelişimin erken evrelerinde görülen programlı hücre ölümünü ifade etmektedir. Gelişimini tamamlamış organizmalarda da hasarlı veya yaşam süresini doldurmuş hücrelerin çevre doku ve hücrelere zarar vermeden yok edilmesini sağlayan fizyolojik bir mekanizmadır.

Apoptozis, sitoplazma, nükleus ve hücre zarında görülen biyokimyasal ve fizyolojik olaylar bütünüdür. Apoptozisin erken evrelerinde hücre küçülmeye başlar, komşu hücrelerle olan bağlantısını kaybeder, endoplazmik retikulum genişler ve sisternaları vezikül ve vakuoller oluşturmaya başlar. Nükleusta ise kromatin yapısındaki genetik materyal yoğunlaşır ve agregatlar halinde toplanmaya başlar. Genetik materyal endonükleazlar tarafından kesilerek fragmentlere ayrılır (18). Tüm bu değişiklikler sonucunda çekirdek parçalanır ve değişik boyutlarda apoptotik veziküller içerisinde toplanır. Hücre zarındaki bağlantılar kopar, ve tomurcuklanma yoluyla parçalanma başlar. Bu tomurcuklar yine apoptotik veziküller halinde organize olurlar (19). Plazma zarı ile tamamen sarılan bu veziküller sayesinde hücre içeriğinin dışarıya sızması önlenir ve diğer hücreler bu durumdan zarar görmezler.

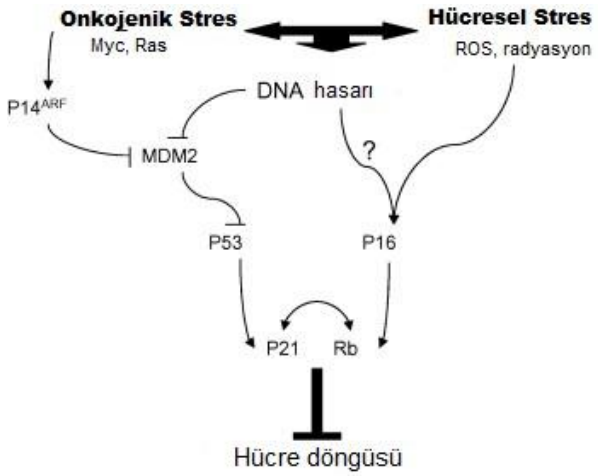


Şekil 2.6. Apoptozisin aktivasyonu (20)'den adapte edilmiştir.

Apoptozis mekanizmasını kontrol eden anahtar moleküller sistein aspartik asit proteazlar yani "Kaspazlar" adı verilen enzimlerdir. Bu enzim grubunun kontrolünde apoptozis iki ayrı yoldan gerçekleşebilir. Bunlardan birincisi reseptör aracılı yani ekstrinsik yolaktır. Bu yolakta Fas ve TNF-R gibi reseptör moleküller hücre membranında lokalize olmuştur. Şekil 2.6'da da görüldüğü üzere Fas-L ligandı Fas reseptörüne bağlanır. Reseptör molekülü trimerize olur, bu yapıya daha sonra prokaspaz-8 molekülü bağlanır. Aktifleşen kaspaz-8, kaspaz-3'ü ve Bid proteinini aktive eder. Kaspaz-3'ün aktive olması ile hücre apoptotik yolağa girmiş olur. Kaspaz-8'in Bid proteinini aktifleştirmesi ile apoptozisin ikinci yolağı intrinsik yolak devreye girer. Aktive olan bu protein mitokondriye taşınır ve mitokondriden sitokrom c salınımına yol açar. Sitokrom c ise kaspaz-9 ve kaspaz-3 enzimlerini aktive olmasını sağlar. Bu şekilde hücre farklı bir yoldan apoptoz sürecine girer. İntrinsik yani mitokondri aracılı apoptoz yolağı oksidatif stres veya sitotoksik ilaçların etkisi ile de aktive olabilir. Bu tür stres durumları mitokondri membranından sitozole sitokrom c sızmasına neden olur. Sitozole geçen sitokrom c ise kaspaz-9 ve kaspaz-3 enzimlerini aktive ederek hücreyi apoptoza yönlendirir (20).

II.1.2.4. Hücresel Yaşlanma (Senescence)

Hücresel yaşlanma p53 ve pRB gibi tümör baskılayıcı genler tarafından kontrol edilen ve hücrenin proliferasyon yeteneğinin geri dönüşümsüz olarak kaybı ile karakterize olan bir mekanizmadır. Hücresel yaşlanma aynı zamanda potansiyel bir anti-kanser mekanizmadır.



Şekil 2.7. Hücresel yaşlanma (9).

Bu mekanizma DNA hasarı, onkogenik uyarılar ve mitojenik sinyaller ile indüklenebilir. Şekil 2.7.'de hücresel yaşlanmaya yol açan etkenler ve bu yolakta rol oynayan genler görülmektedir. Bu süreç genellikle hücre döngüsünün durdurulmasıyla sonuçlanmaktadır. Yaşlanan hücrelerde, hücre genişlemesi ve vakuolizasyon gibi bir takım karakteristik morfolojik değişikliklerin yanında, SA-β-Gal gibi yaşlanma bağımlı belirteçlerin ifade düzeyinin artması, büyümenin geri dönüşümsüz olarak inhibisyonu, kalıcı DNA hasar odakları ve apoptozise karşı direncin artması gibi ayırtedici özellikler de görülmektedir (21). İnsan hücrelerinde görülen replikativ yaşlanmanın en önemli sebeplerinden birisi kromozom uç kısımlarının dereceli olarak kısalmasıdır (22). Telomer olarak adlandırılan bu uç kısımlar, oldukça özelleşmiş koruyucu dizilerdir. Fonksiyonları kromozom bütünlüğünün sağlanması ve genomun stabil kalmasını sağlamaktır (23). Telomerler tüm omurgalılarda evrimsel olarak korunmuş dizilerdir ve hücre bölünmesi ve asimetrik DNA replikasyonu sonucu kademeli olarak kısalırlar.

II.1.2.5. Metastaz Biyolojisi

Metastaz, bir kanser hücresinin primer tümör dokusundan ayrılıp, kan veya lenfatik dolaşım yoluyla uzak bir doku veya organa yerleşip orada gelişmesi ve klinik olarak belirlenebilir bir lezyon oluşturmasıdır. Kanser hastalarında en başta gelen ölüm sebeplerinin primer tümör kaynaklı değil de, metastatik hastalık sonucu olması metastazın kanserle mücadele etmede ne kadar önemli olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (24). Son yapılan çalışmalar, metastaz sürecinin ilk safhalarının daha hastalığın yani primer tümörün ilk teşhis edildiği dönemde bile başlayabileceğini göstermiştir (25). Metastaz sürecinde bir hücrenin primer tümör dokusundan ayrılıp, uzak bir dokuda çoğalabilmesi için bir takım aşamalardan geçmesi gerekir (24). Bu aşamalar şu şekilde sıralanabilir;

1- Primer Tümör Kitlesinin Büyümesi (Proliferasyon)
2- Ayrılma
3- İnvazyon ve Motilite
4- İntravazasyon
5- Agregasyon ve Embolizasyon
6- Adezyon ve Ekstravazasyon
7- Hedef Organda Çoğalma

Bu aşamalardan herhangi biri başarısız olursa metastaz gerçekleşmez. Bundan ötürü, primer tümör dokusundan hergün milyonlarca tümör hücresi kan dolaşımına verilmektedir (26). Kanser hastalarındaki sekonder tümörlerin prevalansı göz önüne alındığında, metastazın aslında verimsiz bir proses olduğu görülecektir. Ancak bu durum primer tümörden ayrılıp dolaşıma geçen hücre sayısı ile telafi edilmektedir (24). Kan dolaşımına geçen hücrelerin, hemodinamik güçler tarafından yok edilmesi bu verimsizliğin en büyük kaynağıdır (27). Ancak, son yapılan araştırmalar, bunun her zaman böyle olmadığını, kan dolaşımına giren kanser hücresinin hayatta kalıp, daha sonra kapiller yataktan sekonder bir dokuya yerleşse bile orada bir lezyon oluşturmayıp uzun süreler dormant halde sessiz kalabileceğini göstermiştir (28, 29). Metastaz, kanserin prognozuyla yakından ilişkili bir faktördür. Metastaz olmadığı durumlarda bazı primer tümörlerde tedavi daha başarılı olmakta ve sağkalım oranları artmaktadır. Bundan dolayı metastaz,

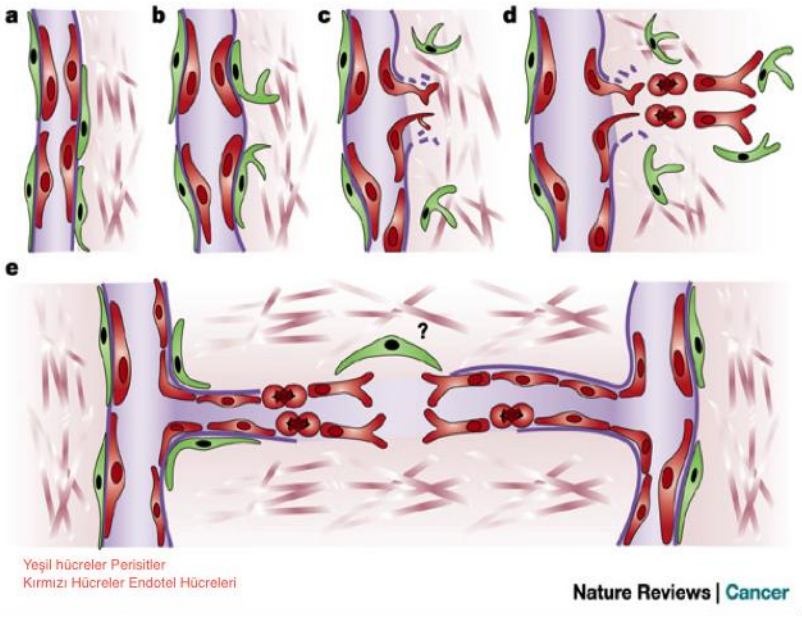
kanser tedavisindeki en önemli ve mekanizması hala tam olarak aydınlatılmamış bir problemdir (24).

Gerek primer tümörün büyümesi sırasında gerekse metastaz yapan hücrenin yerleştiği dokuda çoğalması sırasında, hücrelerin ihtiyaç duyulan besinleri sağlamasında en önemli faktör o bölgedeki kan akımı ve damar ağıdır. Yeni ortaya çıkan tümör dokusu bu ihtiyacını karşılamak için yeni damarlara ihtiyaç duyar ve salgıladığı bir takım moleküller yoluyla dokuda yeni damar oluşumunu başlatır. Bu mekanizma anjiyogenez olarak adlandırılır.

II.1.2.6. Anjiyogenez

Primer tümördeki hücreler normal hücreler gibi canlılıklarını sürdürebilmek için oksijen ve besin almaya ve metabolik artıklarını uzaklaştırmaya ihtiyaç duyarlar (30). Belirli bir aşamaya kadar bu hücreler ihtiyaç duydukları besin ve oksijeni normal hücrelerin yaptığı gibi bulundukları dokudaki kılcal damar ağından difüzyon yoluyla temin ederler. Tümör kitlesi büyüdükçe ihtiyaç duyulan besin ve oksijen miktarı artar ve mevcut damar ağı yetersiz gelmeye başlar. Bu durumda tümör dokusunda yeni kapiller damarlar oluşmaya başlar. İşte bu süreç anjiyogenez olarak adlandırılır.

Anjiyogenez sırasında, kemik iliğindeki endotelyal öncü hücreler mobilize edilir, kan dolaşımı yoluyla yeni damar ağı oluşacak bölgedeki kapiller damarların duvarlarına yerleşirler (31). Bu şekilde mevcut damar ağında yeni dallanmalar yaparak kılcal damar ağının genişlemesi sağlanır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), plasental büyüme faktörü (PIGF) ve anjiyopoetin-1 (ANG-1) gibi moleküllerin bu süreçte uyarıcı olarak rol oynadıkları tespit edilmiştir (32, 33).



Şekil 2.8. Yeni damar oluşumu (34).

Şekil 2.8'de, var olan bir kapiller yatakta yeni bir damarın oluşumu şematize edilmiştir. Bu şekilde yeşil renkli perisitler bağlı oldukları membrandan ayrılırlar, damar genişler ve ekstraselüler matrix parçalanmaya başlar. Bu durum damar yapısındaki endotel hücrelerin (kırmızı renkli) anjiyogenik sinyaller yoluyla perivasküler alana yönelmelerini sağlar. Perivasküler alana göç eden bu endotel hücreler perisitlerin varlığında farklılaşmaya başlarlar. Bu göç kolonu boyunca endotel hücreler birbirlerine yakın kısımlarından birleşmeye başlarlar ve bir lümen oluştururlar. Son olarak bu yeni damar uzantıları diğer uzantılarla birleşerek yeni bir damarı oluştururlar (34). Bu şekilde anjiyogeneziste rol oynayan bir takım faktörleri ya sentezleyerek ya da aktive ederek tümör dokusu hızlı gelişimini destekleyebilecek bir damarlar sistemine sahip olur. Tümör dokularında büyüme faktörleri ve anjiyogenetik faktörlere ilaveten koagülasyon sistemine etki eden bir takım moleküllerin de sentezlendiği bilinmektedir. Bu şekilde organizmada hiperkoagülasyon durumunun ortaya çıkması ve hemostatik dengenin bozulması özellikle metastaz sürecinde önemli bir rol oynamaktadır (35, 36).

II.2. HEMOSTAZ

İnsanlarda kan, kapalı bir damarlar sistemi içerisinde dolaşır ve bu damar sistemi içerisinde dolaşan kanın akışkanlığını koruması gerekir. Bunu sağlayan, kanın içerisinde bulunan antikoagulan özellikteki moleküllerdir. Ancak bir travma veya damarın hasar görmesi durumunda kan kaybını önlemek amacıyla bir takım moleküller devreye girer ve hasar bölgesinde kanın pıhtılaşmasını sağlarlar. Bu tür moleküller prokoagulan özellik taşırlar. Bu şekilde kanın damar içerisinde akışkanlığının korunması, bir damar hasarı durumunda ise kan kaybının önlenmesi *Hemostazis* olarak adlandırılır. Hemostaz genel olarak, birincil hemostaz ve ikincil hemostaz olmak üzere iki aşamada ele alınır. Birincil hemostaz, hasar yerinde trombosit tıkacının oluşmasıdır. Hasardan hemen sonra saniyeler içerisinde başlar. İkincil hemostaz ise koagülasyon reaksiyonlarını ve sonuçta fibrin oluşumunu kapsar. Bu sürecin oluşması dakikalar içerisinde gerçekleşir ve oluşan trombosit tıkacına destek olur (37).

Birincil hemostaz sırasında trombosit tıkacının oluşması trombositlerin rol oynadığı dört basamakta gerçekleşir. Bunlar;

1. Trombosit Yapışması: Bir hasar durumunda, trombositlerin endotel altı bağ dokunun ekstraselüler matriksine yapışmasında von Willebrand Faktörü (vWF) rol oynamaktadır. Endotel hücrelerinden ve megakaryositlerden salgılanan vWF, trombositlerin yüzey reseptörleri ile bağ dokunun kollajeni arasında bir köprü vazifesi görerek, trombositlerin hasar görmüş damar duvarının matriksine bağlanmasını sağlar. Trombositler endotel altı bağ dokunun özelliğinden dolayı buraya kolayca bağlanabilirler. Fakat damardaki kan akımının mekanik etkilerinden korunmak için daha güçlü bir bağlantıya gereksinim vardır. vWF gereken bu güçlü bağlantının sağlanmasında önemli bir role sahiptir.

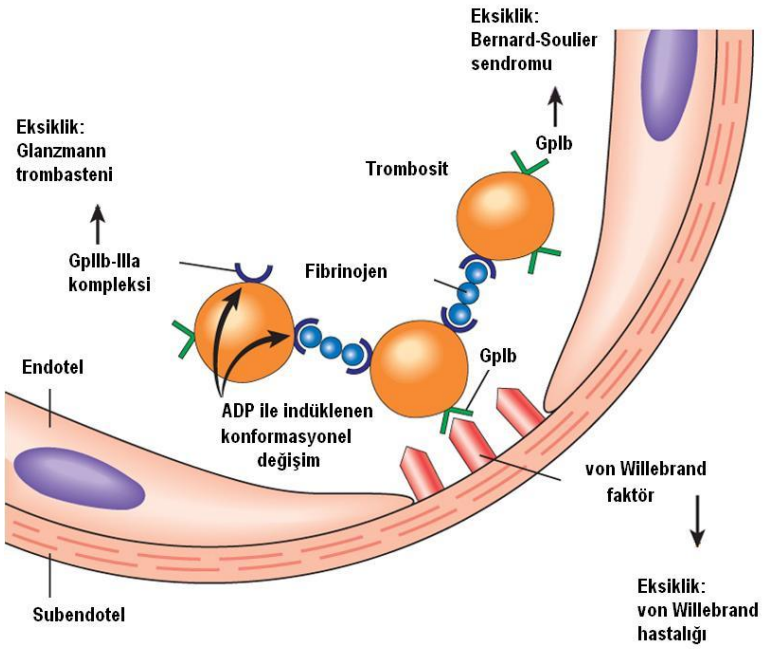
2. Şekil Değişikliği: Trombositlerin endotel altı bağ dokuya yapışmasından hemen sonra şekil değişikliği meydana gelir. Hücre küresel bir şekil alarak yüzey alanını genişletir ve ince pseudopodlar oluşturur. Yapılan bu düzenlemeler ile hücre bir sonraki salınım aşamasına hazırlanmaktadır.

3. Salınım Reaksiyonu: Bu aşamada damar duvarına yapışmış ve aktive olmuş trombositlerden çeşitli granüller salınır. Bu granüller yoğun granüller, alfa-granülleri ve lizozomlardır.

Lizozomlardan; endoglikozidazlar ve heparini parçalayan enzimler, Yoğun granüllerden; kalsiyum, serotonin ve ADP, Alfa-granüllerden ise; vWF, fibronektin, trombospondin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, heparini nötralize eden protein (trombosit faktör 4) salınır.

4. Trombosit Agregasyonu: Trombositler, ADP'ye ilaveten trombosit agregasyonunu uyaran tromboksan-A_2 (TXA_2)'de sentezlerler. ADP ve TXA_2, daha fazla trombositi uyayarak trombosit tıkacının büyümesini sağlarlar. Büyüyen tıkacın damar içindeki kan akımından etkilenip yer değiştirmemesi için fibrin ile kuvvetlendirilmesi gerekir (37). Bu aşamada pıhtılaşma faktörü XIII polimerize olan fibrin iplikçikleri arasında çapraz bağlar oluşturur ve fibrine elastik ve sağlam bir yapı kazandırır.

Yukarıda bahsedilen tüm bu birincil hemostaz olayları damar hasarından saniyeler sonra meydana gelmektedir. Şekil 2.9'da bu olayların mekanizması özetlenmektedir. Bu aşamadan sonra, trombosit tıkacının kuvvetlendirilmesinde rol oynayacak fibrin oluşumu yani koagülasyon yolağı aktive olacaktır.



Şekil 2.9. Trombositlerin damar endoteline yapışması ve agregasyonu (38).

II.2.1.Koagülasyon Mekanizması

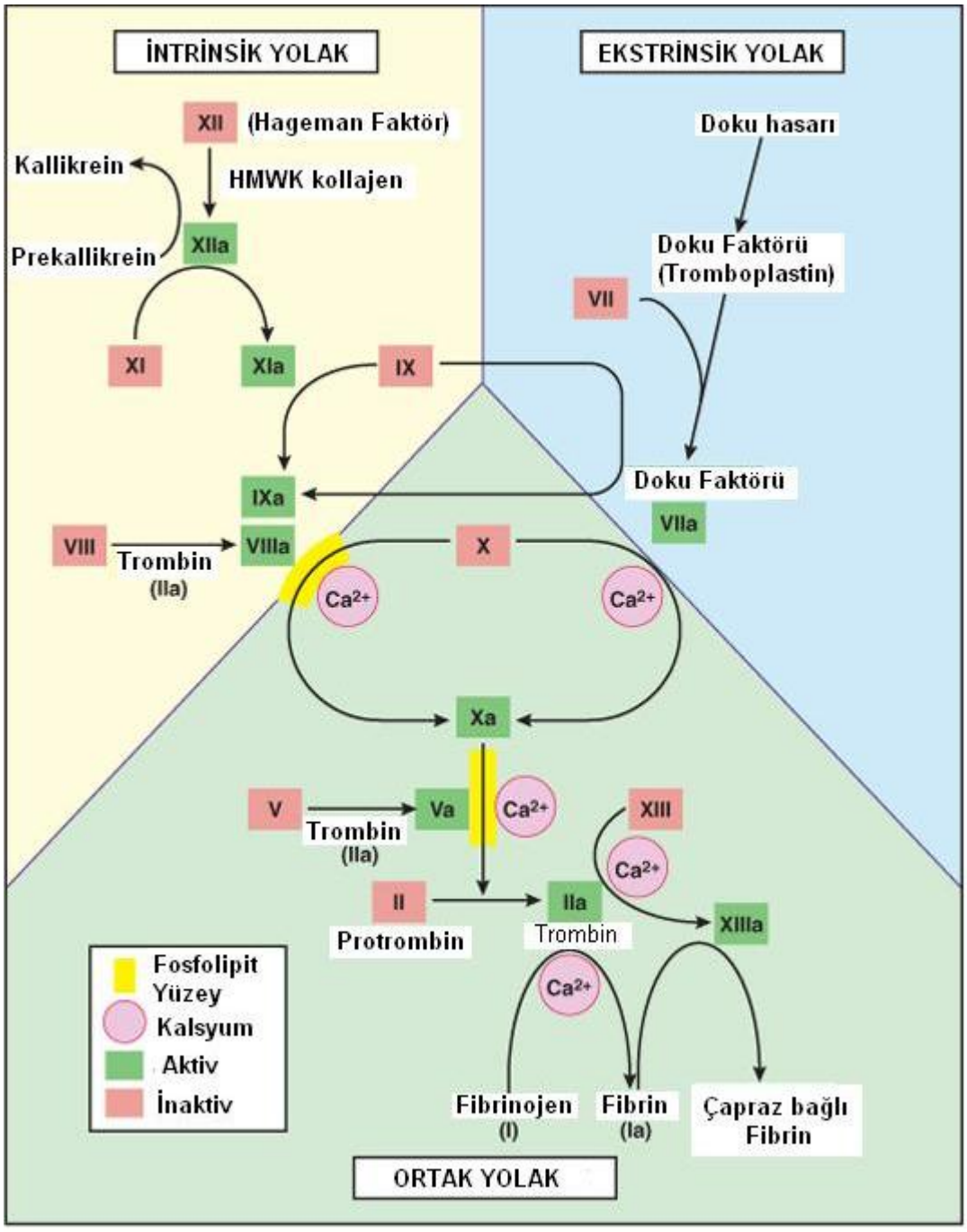
Koagülasyonun mekanizması ile ilgili yapılan çalışmalar 1950'li yıllara dayanmaktadır. Bu dönemde koagülasyon mekanizmasında sadece enzimlerin görev yaptığı ve belirlenen diğer bazı moleküllerin ise bu enzimatik reaksiyonların ürünleri olduklarına inanılıyordu (39). Bu dönemde bazı araştırmacılar koagülasyon sisteminde görev alan enzimlerin kanda inaktif zimojenler halinde bulunduğunu ve koagülasyon sırasında bu enzimlerin adım adım aktifleşerek reaksiyonu gerçekleştirdiklerini düşünüyordu. 1964 yılında birbirinden bağımsız olarak yayınlanan iki çalışma ile durumun gerçekten böyle olduğu ve koagülasyon mekanizmasının basamakları kaskad modeli ile açıklanmıştır (40, 41).

Bu modele göre fibrinojen, normalde kanda inaktif zimojenler halinde bulunan, serin proteazların kademeli olarak aktifleşmesi yolu ile oluşmaktadır (42). Bu süreçte koagülasyon iki farklı yoldan gerçekleşebilir. Birincisi kanın kendi içerisindeki bir takım moleküllerin aktive edilmesi ile gerçekleşen *intrinsik yolak*. İkincisi ise bir doku hasarı veya travma durumunda salınan doku faktörünün başlattığı *ekstrinsik yolak*tır.

Geleneksel kaskad modelinde kontak sistem de denilen intrinsik yolak faktör XII ve prekallikrein gibi iki zimojen ve yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK) gibi bir kofaktörden oluşur. Kontak sistemde koagülasyonun başlaması faktör XII'nin aktifleşmesi ile gerçekleşmektedir. Kanın özellikle negatif yüklü yüzeylere temas etmesi ile faktör XII ve prekallikreinin aktive olduğu bilinmektedir (43). Ortamda belirli miktarda aktif faktör XII bulunduğu zaman faktör XI aktive olur. Bu reaksiyon HMWK'e ihtiyaç duyar ve prekallikrein reaksiyonu hızlandırır. Faktör XIa daha sonra faktör IX'u aktive eder. Aktif faktör IX ise kalsiyum, fosfolipit ve faktör VIIIa ile birlikte faktör X'u aktive eder. Faktör Xa ise faktör Va, kalsiyum ve fosfolipitlerin varlığında protrombinden trombin oluşumunu sağlar. Trombin ise fibrinojenden fibrin oluşumunu gerçekleştirir.

Ekstrinsik yolak ise doku hasarı durumunda endotel altı bağ dokuda bulunan doku faktörünün kanla temas etmesi sonucu başlar. Doku faktörü kanda aktif durumda bulunan faktör VII'ye bağlanır. Oluşan doku faktörü- faktör VIIa kompleksi faktör X'u aktive eder (43). Faktör X'un aktive olmasından sonra gerçekleşen

reaksiyonlar intrinsik yolaktaki ile aynıdır. Bu yüzden bundan sonraki reaksiyonlar ortak yolak olarak da adlandırılır. İntrinsik ve ekstrinsik koagülasyon yolağındaki tüm reaksiyonlar Şekil 2.10'da ayrıntılı olarak verilmiştir.

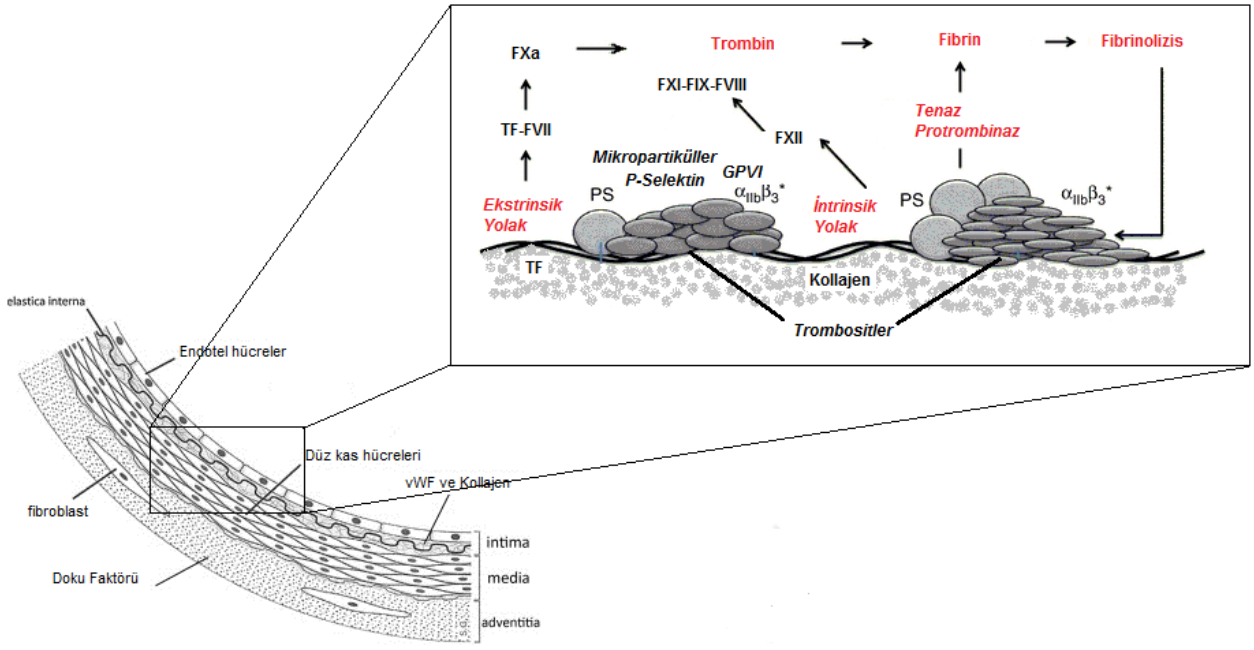


Şekil 2.10. Pıhtılaşma mekanizmasında Ekstrinsik ve İntrinsik yolaklar (38).

Geleneksel kaskad modeli günümüzde halen geçerli olsa da bu modelin bir takım eksiklikleri ve cevap veremediği sorular vardır. Bu modelin en problematik yönü

intrinsik ve ekstrinsik yolakları aslında bağımsız olarak aktive olabilen yolaklar olarak tanımlamasıdır. Böyle bir durumda ise özellikle tek bir pıhtılaşma faktörü defekti taşıyan hastaların örneğin hemofili A, B ve C gibi hastaların kanama durumları açıklanamamaktadır. Bu hastalarda sırasıyla FVIII, FIX ve FXI defekti mevcuttur. Yani intrinsik yolak elemanlarından birisinde problem vardır. Bu durumda intrinsik yolağın aktive olmaması ancak moleküler olarak tanımlanabilen bir bozukluk göstermeyen ekstrinsik yolağın bir yaralanma durumunda aktive olabilmesi beklenir. Ancak durum böyle değildir. Bir yaralanma durumunda da kanama problemi ortaya çıkmakta ve ektrinsik yolak da aktive olmamaktadır. Ayrıca ekstrinsik yolağın bir elemanı olan FVII defekti taşıyan bireylerde görülen kanama problemleri de açıklanamamaktadır. Çünkü bu bireylerde de intrinsik koagulasyon yolağında tespit edilmiş bir problem yoktur. Birbirinden bağımsız çalışan iki koagülasyon yolağı mevcut olsaydı bu bireylerde kanama probleminin olması beklenmezdi. (44).

Bundan dolayı kaskad modelinde görülen bu tür eksikleri de açıklayabilecek bir model 1992 yılında ortaya atılmıştır (45). Hücre temelli koagulasyon modeli adı verilen bu modelin en temel farkı, intrinsik ve ekstrinsik koagulasyon yolaklarını birbirini tamamlayan ve ortak çalışan yolaklar olarak ifade etmesidir. Bu model *in vivo* koagülasyonu daha iyi açıklamaktadır. *In vivo* koagülasyon, prokoagülan özellikte membranlara ihtiyaç duyar. Hasar durumunda endotel hücrelerin ve trombositlerin membranlarının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin (PE) gibi fosfolipitler enzimatik bir reaksiyon sonucu yer değiştirirler ve membrana prokoagülan özellik kazandırırlar. Bu başlama safhasından sonra amplifikasyon ve propagasyon safhaları gerçekleşir. Bu modelde bir doku hasarı durumunda *in vivo* olarak koagülasyonu başlatan molekül doku faktörüdür. Ancak bağ dokudaki kollajen vasıtası ile aslında intrinsik yolak da aktive olmaktadır (46). Şekil 2.11'de bu modele göre şematize edilen ve aslında birbirinden bağımsız olmadığı irdelenen ektrinsik ve intrinsik koagülasyon yolağının aktivasyonu ve membranlarında PS, PE ve P-selektin ifade eden trombositler görülmektedir.



Şekil 2.11. Hücre temelli koagülasyon modeline göre intrinsik ve ektrinsik yolaklar arasındaki ilişki (43 ve 46'dan adapte edilmiştir).

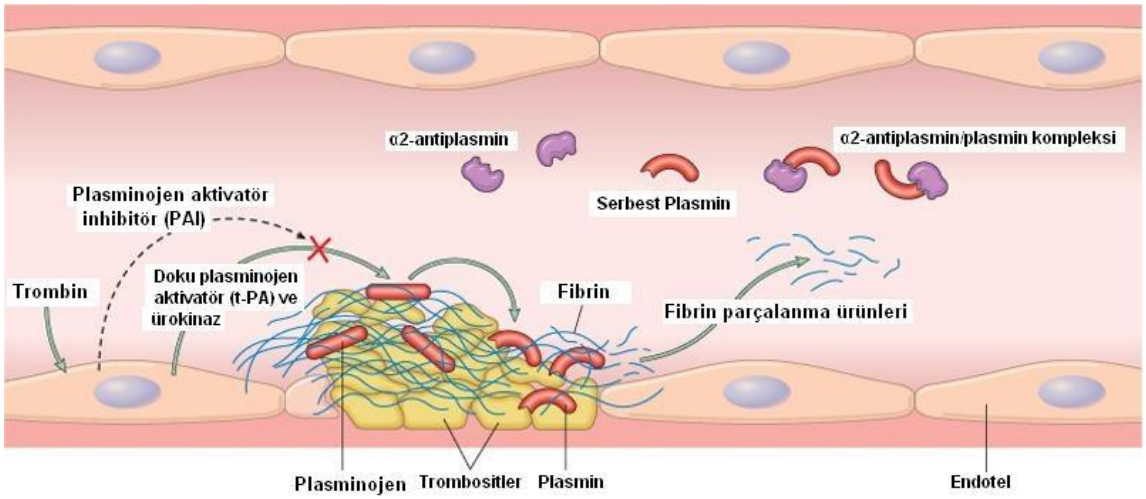
Son yapılan çalışmalarda intriksik yolağın doku faktörü tarafından başlatılan ekstrinsik yolağı amplifiye edici bir görevi olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca faktör XII eksikliğinde veya tamamen yokluğunda herhangi bir kanama probleminin olmaması faktör XII'nin normal hemostazda rol oynamadığını ancak tromboz oluşumunda ve oluşan fibrinin stabilizasyonunda rol oynadığını göstermektedir (47, 48).

II.2.2. Kan Pıhtısının Erimesi (Fibrinolizis)

Hemostaz sürecinde trombosit tıkacı, onu takiben fibrin oluşumu ile devam eden süreçteki son basamak, oluşan pıhtının temizlenmesidir. Plazmada, plazminojen (profibrinolizin) adı verilen ve aktive olduğunda plazmin (fibrinolizin) adını alan proteolitik enzimler bulunur. Plazmin pankreastan salgılanan tripsine yapıca benzemektedir. Plazmin, fibrin iplikçikleri yanı sıra çevre kanda bulunan fibrinojen, faktör V, faktör VIII, protrombin ve faktör XII gibi maddeleri de

sindirir. Bu nedenle kan pıhtısı içinde plazmin oluştuğunda pıhtının erimesine neden olacaktır.

Bir pıhtı oluştuğunda, çok miktarda plazminojen de diğer plazma proteinleri ile birlikte pıhtının içinde tutulur. Yaralanan dokular ve damar endoteli yavaş bir şekilde doku plazminojen aktivatörü (t-PA) adı verilen bir aktivatör molekül salgılarlar. Bu madde pıhtı kanamayı durdurduktan bir gün veya daha sonra plazminojeni plazmine çevirir ve oluşan pıhtıyı eritir. Bu şekilde oluşan pıhtının yerinden kopup dolaşıma geçerek vücutta bulunan birçok damarı tıkamasının önüne geçilmiş olunur (49). Bu olaylar Şekil 2.12'de görülmektedir. Bu yönüyle fibrinolizis mekanizması hayati önem taşımaktadır.

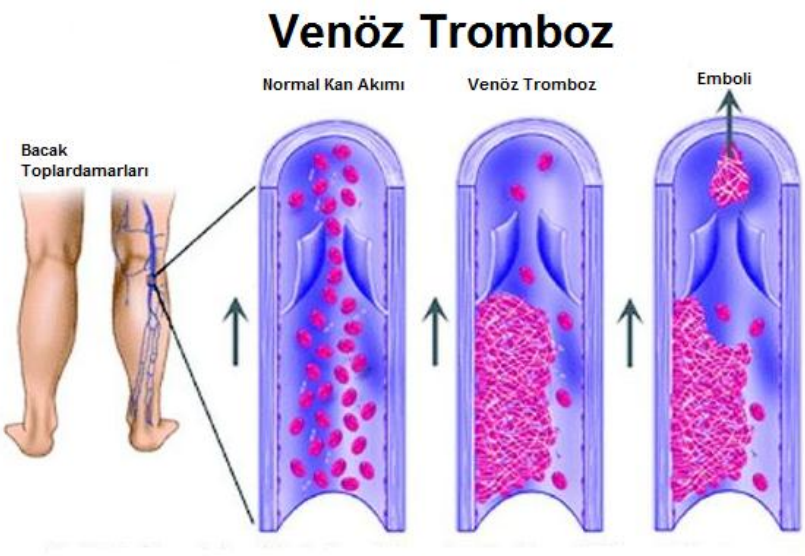


Şekil 2.12. Fibrinolizis (38).

II.3. VENÖZ TROMBOZ

Daha önce de ifade edildiği üzere kan, insan vücudunda kapalı bir damar sistemi içerisinde dolaşır. Kanın damar içerisindeki akışkanlığını koruması, içerisinde bulunan prokoagülan ve antikoagülan moleküllerin belirli bir denge içerinde bulunması ile sağlanır.

Venöz tromboembolizm (VTE) denilen patolojik durum en basit tanımıyla bu dengenin bozulması ve kanın damar içerisinde pıhtılaşmasıdır. Bazı durumlarda oluşan trombüs damar duvarından ayrılarak dolaşıma geçer bu durumda pıhtı emboli adını alır. Venöz tromboz, multifaktöryel patogenezi olan kompleks bir damar hastalığıdır (50). Venöz trombozun patogenezinde damar duvarı, trombositler ve koagülasyon proteinleri rol oynamaktadır. 1856 yılında Alman bir bilim adamı olan Rudolf Virchow bu durumu kendi adıyla anılan üçlemesi ile açıklamıştır. Virchow üçlemesi venöz trombozun patogenezini açıklayan ve klinikte halen kullanılan hiperkoagülasyon, endotel hasarı ve venöz stazı yani kanın damar içerisindeki akımının bozulmasını ifade eder (51). Normal şartlarda, kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen endotel hücreler trombotik bir yüzey oluşturmazlar. Buna ilaveten trombositler de trombomodulin ve plazmin gibi pıhtılaşmayı önleyici bir takım moleküller salarak kendi aktivitelerini sınırlarlar. Ancak damar endotelinde herhangi bir sebepten dolayı hasar oluştuğu zaman bu endotel dokusunun altında lokalize olan doku faktörü kan ile temasa geçer ve kandaki faktör VII ile birleşerek bir kompleks oluştururlar. Bu şekilde koagülasyonun ekstrinsik yolu aktive olur ve pıhtılaşma başlar. Bundan sonra trombositler aktive olurlar ve hasar gören bölgede toplanmaya başlarlar (52). Şekil 2.13'de şematize edildiği gibi damar içerisinde oluşan pıhtı o bölgede normal kan akımını bozar ve kızarıklık, şişme, ekstremitede huzursuzluk gibi venöz trombozun klinik belirtileri ortaya çıkar. Bazı durumlarda oluşan bu pıhtıdan kopan bir parça dolaşıma geçerek özellikle akciğer ve beyindeki kılcal damarlarda tıkanmalara sebep olur. Bu durumda ölümle de sonuçlanabilen daha ciddi problemler oluşabilir.



Şekil 2.13. Bacaktaki toplardamarlarda görülen trombozun ve embolinin şematize edilmesi (53).

II.3.1.Venöz Tromboz İle İlişkili Risk Faktörleri

Venöz trombozun patofizyolojisinde birden çok faktörün rol oynadığı daha önce ifade edilmişti. Bu faktörler bireylerin belirli genlerde taşıdığı bir takım polimorfizim veya mutasyonlar gibi kalıtsal kökenli olabildiği gibi yaşam tarzı, immobilizasyon, büyük cerrahi operasyonlar, kullanılan bir takım ilaçlar gibi edinsel etkenler de olabilmektedir. Öncelikle kalıtsal kökenli olan risk faktörleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Antitrombin III Yetersizliği: Antitrombin, serin proteaz inhibitör (serpin) gen ailesinden bir heparin kofaktörüdür. *SERPINC1* geni tarafından kodlanır. Önemli bir proteaz inhibitörü olarak koagülasyon yolağında FXa, FIXa ve FXIa gibi koagülasyon faktörlerini inhibe eder. Ayrıca FVIIa-Doku Faktörü kompleksinin ayrılmasını hızlandırarak FVIIa'nın fizyolojik inhibisyonunda önemli rol oynar (54). Bu gende antitrombin yetersizliğine sebep olan farklı tipte 250'den fazla mutasyon tanımlanmıştır (55). Serpin proteaz inhibitör C1'in başlıca sentez yeri karaciğerdir ve posttranslasyonel glikolizasyonu da burada yapılır. Bu nedenle özellikle Hepatit gibi kronik karaciğer hastalıklarında plazma düzeyleri düşer (56).

2. Protein-C Yetersizliği: Protein C, *PROC* geni tarafından kodlanan ve yalnızca trombin oluştuğunda aktive olan doğal antikoagülan bir proteindir. Trombozun kontrolünde, endotel hücrelerinin inflamasyon cevabında ve apoptoz kontrolünde rol oynar (57). Protein C yetersizliği kalıtsal veya edinsel olabilir. Kalıtsal durumlarda, gendeki mutasyon heterozigot olduğu zaman geçiş otozomal dominanttır (58). Eğer *PROC* genindeki mutasyon homozigot veya campound heterozigot ise geçiş otozomal resesiftir (59). Heterozigot protein C yetersizliği erişkin populasyonunda 1/200 gibi sık bir oranda bulunabilir (60). Fakat bu bireylerin büyük çoğunluğu herhangi bir trombotik sendrom yaşamazlar. Bu da genetik defektin fenotipe yansımasında henüz belirlenmemiş başka faktörlerin de rol oynadığını göstermektedir.

3. Protein S Yetersizliği: Protein S, *PROS1* geni tarafından kodlanır ve aktive protein C (APC)'nin kofaktörüdür ve faktör Va ve VIIIa'yı inaktive ederek APC'nin kapasitesini arttırır. Buna ilaveten protrombin aktivitesini inhibe ederek direk antikoagulan aktivite de gösterebilir. Ancak protein S'nin bu direk antikoagülan etkisi henüz net olarak açıklanmamıştır (58). Protein S yetersizliği tablosunun ortaya çıkmasından sorumlu 200'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonların büyük bir kısmı ise yanlış anlam mutasyonudur (61). Dolaşımda protein S'nin % 60'ı proteine bağlı olarak bulunurken % 40'ı ise fonksiyonel olarak aktif form olan serbest halde bulunur (62).

4. Faktör V Leiden Mutasyonu: 1993 yılında Dahlback ve arkadaşları venöz tromboz hikayesi bulunan 3 aile tanımlamışlardır. Bu aile bireylerinde yaptıkları incelemede intrinsik ve ortak koagülasyon yolağının performansını gösteren aPTT (Activated Partial Thromboplastin Time) değerlerinin, plazmalarına APC eklendiği zaman sınırlı bir uzama gösterdiğini belirlemişlerdir (63, 64). Halbuki APC'nin faktör V ve faktör VIII'i inaktive ederek koagülasyon reaksiyonunu durdurması beklenir. Bu da parsiyel tromboplastin zamanında uzama ile belirlenir. Daha sonra Bertina ve arkadaşları 1. Kromozomun q21-25 bölgesinde yaptıkları bağlantı analizinde APC ve faktör V geninin birlikte ayrım gösterdiğini ve bunun 1691. pozisyondaki guaninin adenine dönüşümüne sebep olduğunu göstermişlerdir. Bu durumda oluşan faktör V, APC varlığında yabanıl tip faktör V'den 10 kat daha fazla bir yarı ömre sahip olmaktadır. Çünkü proteinde ortaya çıkan aminoasit

değişimi aktive protein C'nin kesim bölgesini modifiye etmektedir. Bu tanımlanan mutasyon daha sonra ***Faktör V Leiden*** olarak adlandırılmıştır (65, 66).

5. Protrombin G20210A Mutasyonu: 1996 yılında Poort ve arkadaşları, açıklanamayan venöz tromboz hikayesi bulunan 28 aileyi ayrıntılı olarak inceledikten sonra, protrombin geninin 3'-UTR bölgesinin 20210. pozisyonunda heterozigot G-A değişimi tespit etmişlerdir. Bu mutasyon plazma protrombin seviyesinde artışa dolayısıyla da tromboza olan eğilimin artmasına yol açmaktadır (67).

6. Prokoagülant Protein Seviyelerinin Yüksekliği: Yüksek faktör VIII seviyeleri veya faktör IX ve XI gibi diğer koagülasyon faktörlerin seviyelerindeki artışlar tromboz için bağımsız risk faktörleri olarak değerlendirilmektedir (68). Leiden trombofili çalışmasında hastaların % 25'inde faktör VIII seviyelerinin % <150 olduğu tespit edilmiştir (69). Yine aynı çalışmada faktör IX ve faktör XI seviyelerinin % <90 üzerinde olan bireylerde venöz tromboz görülme riskinin sırasıyla 2,5 ve 2,2 kat arttığı tespit edilmiştir (70, 71). Bu anomalilerin altında yatan mekanizma henüz tespit edilememiş olsa bile, yüksek derecede kalıtılabilir olmaları genetik mekanizmaları işaret etmektedir (72).

7. Hiperhomosisteinemi: Homosistein bir sülfidril aminoasittir. Büyük oranda proteine bağlı olarak bulunur. Metionin aminoasitinin metabolik olarak dönüştürülmesi (remetilasyon) yolu ile oluşur (73). Bu metabolik yolakta görev yapan bir enzim olan metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimini kodlayan genin 677. nükleotidinde meydana gelen C/T değişimi sonucunda enzim termolabil duruma gelir ve aktivitesi % 50 oranında düşer (74, 75). Bu durum plazma homosistein seviyesinde artışa neden olur. Yüksek homosistein seviyelerinin venöz tromboz açısından bir risk faktörü olarak kabul edilip edilemeyeceği halen tartışmalı bir konudur. Yapılan çalışmalar, plazma homosistein seviyelerindeki artışların venöz tromboz riskini 2-4 kat arttırdığını göstermiştir (67, 76).

Tüm bu kalıtsal kökenli risk faktörlerine ilaveten kişinin yaşam tarzı, fizyolojik durumu, herhangi bir hastalığı olup olmaması gibi edinsel olarak adlandırılan risk faktörleri de mevcuttur. Bu faktörleri de kısaca listeleyecek olursak;

1- Büyük Cerrahi Operasyonlar

2- Spinal Kord Hasarı

3- Çoklu Travma

4- İleri Yaş

5- Geçirilmiş VTE

6- Obezite

7- İmmobilizasyon

8- Hamilelik

9- Oral Kontraseptif Kullanımı

10- Kanser:Kanser ve tromboz arasındaki ilişkinin varlığı ilk defa 1865 yılında Fransız bir hekim olan Armand Troussau tarafından ortaya atılmıştır. Özellikle teşhis alanında elde edilen teknolojik ilerlemelerle birlikte bu ilişkinin varlığı yapılan birçok çalışma ile doğrulanmıştır. Venöz trombozu bulunan hastaların % 25'inde kanser de görülmektedir (72, 77). Bir sonraki bölümde bu ilişki daha ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

II.4. TROUSSEAU SENDROMU

II.4.1. Kanser ve Tromboz Arasındaki İlişkinin Tarihçesi

Kanser ve tromboz arasındaki ilişki ilk defa 1865 yılında Fransız bir hekim olan Armand Trousseau tarafından Paris'te verdiği bir konferans sırasında dile getirilmiştir. Trousseau, idiopatik venöz trombozun henüz teşhis edilmemiş gizli bir kanserin erken belirtisi olabileceğini ifade etmiştir (78). İlginç bir tesadüf olarak bu sendromu kendisinde de teşhis etmiş ve iki yıl sonra mide kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir.

Aslında literatüre bakıldığında 1823 yılında yine Fransız bir hekim olan Bouillaud üç kanser hastasının alt ekstremitelerinde venöz tromboz teşhis etmiş, bu durumun kanser nedeniyle oluşan pıhtının damarları tıkaması sonucu olduğunu ifade etmiştir. Ancak kanser ile tromboz arasında bir bağlantı olabileceği, idiopatik venöz trombozun aslında teşhis edilmemiş bir kanserin erken belirtisi olabileceğini ilk defa Trousseau ifade etmiştir.

1878 yılında Billroth, sirküle eden kan pıhtılarında sıklıkla tümor hücrelerinin de görülmesi nedeniyle kanserli hastalardaki tromboza eğilimin tümör metastazı ile ilişkili olabileceğini öne sürmüştür (79).

Bu tarihten sonra kanser ve tromboz arasındaki ilişkiden bahseden ilk çalışma 1935 yılında yayınlanmıştır. Illtyd James ve Matheson, derin ven trombozu teşhis edilen bir hastada birkaç hafta sonra gastrik kanser ortaya çıktığını ifade etmişlerdir (80).

İlginç olarak 1935 yılından sonra venöz tromboz hastalarında gizli kanserin sorgulandığı ilk çalışma ancak 1982 yılında yayınlanmıştır. Durumun böyle olmasında en büyük etken, o dönemlerde tıbbın ve teşhiste kullanılan araç ve gereçlerin yeterince gelişmiş olmamasıdır. Daha sonraki süreçte gelişen teknolojinin ve buna paralel olarak ortaya çıkan ultrasound ve doppler gibi yeni diagnostik araçların kullanıma sunulması ile daha erken ve daha doğru teşhislerin yapılabilmesi sağlanmıştır.

1986 yılında Aderka ve ark. yaptıkları çalışmada idiopatik venöz trombozun henüz teşhis edilmemiş asemptomatik kanser ile olan ilişkisini incelemişlerdir. Bu amaçla idiopatik venöz tromboz ve sekonder derin ven trombozu teşhisi almış iki hasta grubu oluşturmuşlardır. Birinci grup 35 idiopatik VTE, ikinci grup ise 48 adet etiyolojisi bilinen sekonder DVT hastalarından oluşmaktadır. Yapılan incelemeler sonrasında birinci gruptaki 35 hastanın 12'sinde (%34) takip eden 4-68 aylar arasında kanser teşhis edilirken, ikinci grupta sadece 2 hastada (%4) kanser teşhis edilmiştir. Teşhis edilen kanserler, ovaryum, endometriyum, prostat, meme, kolon, akciğer ve pankreas kanserleridir. Çalışma sonucunda, idiopatik VTE'nin sekonder DVT ile kıyaslandığında, kanser ile arasında daha belirgin bir korelasyonun olduğu tespit edilmiştir (81).

1987 yılında Goldberg ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, derin ven trombozu ile kanser arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu amaçla, kesin olarak DVT tanısı almış hastalar ile DVT şüphesi olan ancak kesin tanı almamış hastalar iki, yıl süre ile takip edilmiştir. Çalışma sonucunda, kesin olarak DVT tanısı almış ve 50 yaşından küçük olan bireylerde takip eden 2 yıl içerisinde relatif kanser riski % 19 olarak belirlenmiştir. Ayrıca DVT tanısı almış bireylerin sonraki dönemde kanser açısından takip edilmelerinin faydalı olacağını ileri sürmüşlerdir (82).

Monreal ve arkadaşları 1991 yılında yaptıkları prospektif bir çalışmada, alt ekstremitelerinde idiopatik veya sekonder derin ven trombozu bulunan 113 hastayı kanser açısından takibe almışlardır. Takip işlemi sırasında hematolojik ve biyokimyasal kan testleri yanında abdominal ultrasound ve bilgisayarlı tomografi gibi ileri teknikler de kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, 31 idiopatik venöz tromboz hastasından 7'sinde kanser teşhis edilirken, 85 sekonder derin ven trombozu hastasından 5'inde kanser teşhis edilmiştir. Bu çalışma ile, DVT tanısı almış bireylerde yapılacak olan ayrıntılı incelemelerin bazı kanserlerin erken evrede teşhis edilmesini sağladığı ifade edilmiştir (83).

2000 yılında Sorensen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, venöz trombozla birlikte veya sonrasında kanser teşhisi almış bireylerin sağkalım oranları araştırılmıştır. Çalışmaya, venöz trombozla birlikte veya sonraki 1 yıl içerisinde kanser teşhisi almış 668 hasta ile sadece kanser tanısı almış 5371 hasta dahil edilmiştir. Kanser ve venöz trombozu bulunan hasta grubunda % 44 oranında uzak metastaz belirlenirken, sadece kanser teşhisi almış grupta bu oran % 35.1 olarak belirlenmiştir. Kanser ve venöz tromboz grubunun 1 yıllık sağkalım oranı %12 olarak hesaplanırken, sadece kanser olan grupta ise bu oranın %36 olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, venöz tromboz ile birlikte veya sonraki bir yıl içerisinde teşhis edilen kanserlerin genellikle ileri düzeyde oldukları ve bu kanserlerin daha kötü bir prognoza sahip olduğu belirlenmiştir (84).

Son yıllarda, gerek biyokimya gerekse de moleküler hücre biyolojisi alanında kaydedilen hızlı gelişmeler, kanserin koagülasyon sistemini nasıl etkilediği konusunda sahip olduğumuz bilgi birikimini önemli ölçüde arttırmıştır. İlk yıllarda yapılan çalışmalar daha çok epidemiyolojik olarak tromboz veya kanser insidansı üzerine yoğunlaşırken artık bu bağlantının mekanizmasında rol oynayan moleküller, yolaklar ve genler üzerinde odaklanılmıştır.

II.4.2. Kanser ve Tromboz Arasındaki İlişkinin Patogenezi

Kanser ile tromboembolizm arasında mekanizması henüz net olarak tanımlanmamış bir bağlantı vardır. Tromboembolik komplikasyonlar, kanserli hastalarda çok sık görülen ve ikinci sırada gelen mortalite sebebidir (85). Kanser multifaktöryel ve çok basamaklı bir patolojidir. Diğer yandan tümör hücreleri bir

çok farklı mekanizma ile hiperkoagulasyona sebep olabilirler. Bu mekanizmalar arasında tümör hücrelerinin prokoagülan, fibrinolizis inhibitörleri, mikropartiküller ve inflamatuvar moleküller üretmesi, koagulasyon ve inflamasyon sürecinde rol oynayan hücreleri (trombositler, endotelyal hücreler, monositler, makrofajlar, lökositler) aktive etmeleri, bazı sitokin ve anjiyogenetik faktörler salgılamaları, adezyon molekülleri eksprese etmeleri sayılabilir (86, 87).

Bazı kanserler diğerlerine nazaran daha fazla trombojeniktir, örneğin pankreas, akciğer ve gastrointestinal sistemin müsin üreten adenokarsinomlarında bu durumun yaygın olarak görülmesi nedeniyle, ilk başlarda altta yatan başlatıcı sebebin müsin olduğu düşünülmüştür (88). ***Müsinler***, fukosillenmiş ve sülfatlanmış glikan grupları taşıyan büyük glikoproteinlerdir. Müsinler özellikle iç organların hava, besin, asit pH, tuz, bakteri ve virüslere maruz kalan kısımlarında jel formunda epitel hücrelerinden salgılanırlar. Salgılanan jel formundaki müsinler bu organları olumsuz şartlara karşı korur aynı zamanda hücre ve çevresinde sinyal iletiminde de rol oynarlar (89). Müsinlerin üzerinde bulunan glikan yapısındaki grupların özellikle selektinler için bağlanma bölgeleri olduğu belirlenmiş ve bunu takiben müsinlerin kanser hastalarında görülen trombotik komplikasyonlardan sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. (90). Bu varsayımı test etmek amacıyla 2003 yılında Varki *et.al.* yüksek düzeyde saflaştırılmış karsinoma müsin preparatları hazırlamışlar ve bu preparatları intravenöz yolla farelere enjekte ettiklerinde trombosit bakımından zengin mikrotrombüslerin oluştuğunu göstermişlerdir. Aynı uygulama P- ve L-selektin ifadesi baskılanmış farelere de yapılmış ve bu farelerde trombus oluşumunun önemli düzeyde azaldığını göstermişlerdir.

Buna ilaveten endojen trombin oluşumunu inhibe eden hirudin ile muamele edilen trombosit bakımından zengin tam kanda trombosit agregasyonu görülürken, lökosit içermeyen veya P- ve L-selektin eksprese etmeyen transgenik farelerde, müsin enjeksiyonunun tromboz oluşturmadığını göstermişlerdir. Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak Trousseau sendromunun başlatıcı etkeninin karsinomlar tarafından salgılanan ve dolaşıma verilen müsin molekülleri olduğunu ve bu moleküllerin trombin oluşumundan bağımsız olarak P- ve L-selektin gibi moleküller vasıtasıyla tromboz oluşumunu başlattığını ileri sürmüşlerdir (91). Yapılan çalışmalarda, bu tür müsin-selektin komplekslerinin bazı malignant hücrelerden kan dolaşımına verildiği ve bunların tümör metastazında da önemli bir

rol oynadıkları belirlenmiştir (92, 93). Bu çalışmalardan sonra tüm dikkatler selektinler üzerine yoğunlaşmıştır.

Selektinler, karbonhidrat bağlayan adezyon molekülleridir ve trombositler, lökositler ve damar endotel hücrelerinde ifade edilirler. Farklı özelliklere sahip ve farklı hücrelerde ifade edilen selektin molekülleri tanımlanmıştır. L-Selektin, çoğunlukla nötrofil, monosit ve lenfositlerde bulunurken, P-Selektin, aktif olmayan trombositlerin sekresyon granüllerinde depolanmış halde bulunur. E-Selektin ise birtakım proinflamatuvar ajanların indüklemesiyle endotel hücrelerde ifade edilirler. Yukarıda da bahsedildiği gibi kanser ve tromboz arasındaki ilişkide P-selektin gibi hücre adezyon moleküllerinin önemi büyüktür. Aktive olmuş trombositlerin yüzeyinde bulunan P-selektin bu hücrelerin damar endotel hücrelerine, kanser hücrelerine adezyonunu sağlar. Buna ilaveten lökositlerin inflamasyon bölgesine göçündeki en önemli aşama olan damar endoteline tutunup hücrelerarası boşluğa geçme (*Leukocyte transendothelial migration*) işleminde de rol oynarlar. Ayrıca aktive olmuş trombositlerde yine selektin molekülleri aracılığı ile hücreler arasında prokoagülan mikropartiküllerin transferi de gerçekleşir. Bu şekilde fibrin matriksin oluşmasına ve mikrotrombüslere sebep olurlar (94). Deneysel olarak oluşturulan *in vivo* tromboz modelinde, P-selektinin sirkülasyondaki lökosit ve monosit gibi hücreleri gelişen tromboz üzerinde topladığı bu şekilde oluşan trombüsün büyümesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (95). P-selektinin hücreler arasındaki prokoagülan mikropartiküllerin transferinde rol oynadığını söylemiştik. Yapılan çalışmalarda gelişen trombüs bölgesinde bu mikropartiküllerin içinde bulunan veya plazmada çok düşük düzeyde bulunan doku faktörünün akümüle olduğunu ve bu akümülasyonun P-selektin aracılığı ile olduğu gösterilmiştir (96). Buradan yola çıkarak P-selektin ve ekstrinsik koagulasyonun başlatıcı molekülü olan doku faktörü arasında önemli bir bağlantının olduğu söylenebilir.

Doku faktörü (TF), hem ekstrinsik koagulasyon yolağının başlatıcı molekülü olduğu için hem de koagulasyondaki görevinden farklı olarak sinyal iletiminde de rol oynadığı için kanser ile tromboz arasındaki moleküler bağlantıda hep ön sırada olmuştur. Doku faktörü, endotel hücreler, monositler ve nötrofiller gibi hücrelerde ifade edilen yüzey glikoproteinidir. Endotel hasarı oluştuğunda subendotel dokunun kan ile teması sonucu TF kalsiyum varlığında faktör VII'ye bağlanır ve

ekstrinsik koagulasyon yolağını aktive eder. Faktör VIIa-TF kompleksi hücre yüzeyine sabitlenir ve faktör X ve IX'a karşı olan proteolitik aktivitesini önemli düzeyde arttırır (97). Aktive olan faktör X ise trombin oluşumunu sağlar.

1954 yılında Eiseman ve Stefanini, doku faktörünün birçok neoplastik hücrede de ifade edildiğini, lösemi hücrelerinin tromboplastik aktivitelerini araştırdıkları çalışma ile ortaya çıkarmışlardır (98). Daha sonraki yıllarda bu bulgular başka araştırıcılar tarafından da teyit edilmiştir. Doku faktörünün, özellikle kolon, mide, meme ve pankreas gibi epitelyal kökenli karsinomlarda yüksek düzeyde ifade edildiği belirlenmiştir (99, 100). Örneğin, pankreas kanseri üzerine yapılan bir çalışmada yüksek düzeyde TF ifade eden kanser grubunda düşük düzeyde ifade eden gruba göre 5 kat fazla venöz tromboz görüldüğü ve hastalığın prognozunun çok daha kötü olduğu belirlenmiştir (101). Doku faktörü ekspresyon düzeyi ile hücre farklılaşması arasında direk bir korelasyonun olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalarda glioma ve pankreas kanseri dokularında immünohistokimyasal olarak doku faktörü ifade düzeyleri ve kanser hücrelerinin differensiyasyon düzeyleri arasında bir korelasyonun olduğu belirlenmiştir. Ayrıca doku faktörünün transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) salınımını arttırarak hücre büyümesini ve vaskülarizasyonunu arttırdığı sonucuna varılmıştır (102, 103).

Doku faktörünün koagülasyon sistemindeki görevine ilaveten hücre içi sinyal iletiminde de rol oynadığı belirlenmiştir. TF-FVIIa kompleksinin proteazla aktive edilmiş reseptör-2 (PAR-2) aracılığı ile bir sinyal kaskadını başlattığı, PAR-2 ifade düzeyi ile agresif malignant fenotip arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (104). PAR-2 ifade düzeyindeki artış tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyon özelliklerini arttırırken interlökin-8 (IL-8) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi bir takım faktörlerin salınımını da indüklemektedir (105). Özellikle IL-8 sekresyonu endotel hücre sağkalımını, proliferasyonunu ve matriks metalloproteinaz (MMP) üretimini regüle etmektedir (106). Hücre içi sinyal iletiminde ve dolayısı ile hücre proliferasyonu, invazyonu ve metastazında doku faktörünün sitoplazmik kuyruğunun rol oynadığı düşünülmektedir (107). Yapılan çalışmalarda hipoksiye maruz kalan kanser hücrelerinde ektopik faktör VII üretiminin olduğu ve faktör VII'nin doku faktörü ile kompleks oluşturarak kanser hücreleri tarafından salınan mikropartiküllerde bulunduğu tespit edilmiştir (107).

P-selektinler ve doku faktörü anlatılırken, mikropartiküllerin koagulasyonda ve daha da önemlisi tromboz oluşumunda nasıl rol oynadıklarından söz edilmişti. Bu kısımda ise bu membran kaynaklı yapılardan daha ayrıntılı olarak bahsedilecektir.

Mikropartiküller, daha önce de bahsedildiği gibi özellikle yüksek düzeyde doku faktörü ifade etmelerinden dolayı ve buna ilaveten PS ve P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1) ifade etmelerinden dolayı kanser ve tromboz arasındaki ilişkide önemli bir rol oynamaktadır. Mikropartiküller olarak adlandırılan mikroskobik membran elementleri, ilk defa 1967 yılında Wolf ve arkadaşları tarafından tespit edilmiş ve elektron mikroskobu altındaki görüntülerinden dolayı bunlara trombosit tozu denilmiştir (108). Mikropartiküllerin, tümör hücrelerinin membranlarından veziküller halinde salındığı ve kanserde görülen hiperkoagulasyonun bu sebeple olduğu düşünülmüştür. Dvorak ve arkadaşları 1987 yılında yaptıkları çalışmada, fare meme karsinoma hücre hattı ve kobay hepatokarsinoma hücre hattının, *in vitro* ve *in vivo* ortamda prokoagülan aktivite gösterdiklerini belirlemiştir (109). Daha sonra yapılan çalışmalarda mikropartiküllerin trombojenik özellikte oldukları belirlenmiştir. İnsanlardan elde edilen mikropartiküller sıçanlara enjekte edildiğinde yüksek düzeyde trombojenik oldukları görülmüş. Elde edilen mikropartiküllerin anti-doku faktörü antikorları ile inkübe edilmesi, bu trombojenik aktivitenin kaybolmasına sebep olmuştur. Bu elde edilen veriler ışığında mikropartiküllerin, doku faktörü ifade eden membran elementleri oldukları tespit edilmiştir (110). Mikropartiküller, özellikle pankreas, meme, akciğer, kolon ve akut lösemi hastalarının plazmalarında da tespit edilmiştir (111, 112). Ayrıca son yapılan çalışmalar, kanser hastalarının plazmalarında tespit edilen yüksek orandaki mikropartiküllerin tümör hücre kaynaklı olduğunu ancak monosit ve makrofaj kaynaklı mikropartiküllerin de bulunduğunu göstermiştir. Bu prokoagülan membran elementlerinin plazmadaki miktarının yüksek olması ve yüksek düzeyde TF aktivitesine sahip olmaları özellikle pankreas kanserinde prognozu ve sağkalım süresini olumsuz etkilemektedir (113).

Bu kısımda kanser ile tromboz arasındaki ilişkide rol oynayan ve 1985 yılında Falanga et.al. tarafından akut promiyelositik lösemi hastalarının plazmalarında tespit edilen *Kanser Prokoagülan*'dan bahsedilecektir. ***Kanser Prokoagülan (CP),*** 68 kDa moleküler ağırlığa sahip, 674 aminoasitten oluşan bir sistein endopeptidazdır. Bilinen tek fizyolojik substratı faktör X'dur. CP, faktör X'u ağır

zincirinden keserek aktive eder (114, 115). CP malignant hücreler ve fetal dokularda sentezlenir, birçok farklı tümör ekstraktında da varlığı gösterilmiştir (116, 117). Yapılan çalışmalarda, kanser hastalarının % 85'inde serum CP düzeylerinin yüksek olduğu tespit edilmiş ve bu proteinin bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliği gündeme gelmiştir (118, 119). Ancak, malignant patolojilerde görülen hiperkoagülasyon durumunda kanser prokoagülant proteininin oynadığı rol kesin olarak belirlenmiş değildir (120).

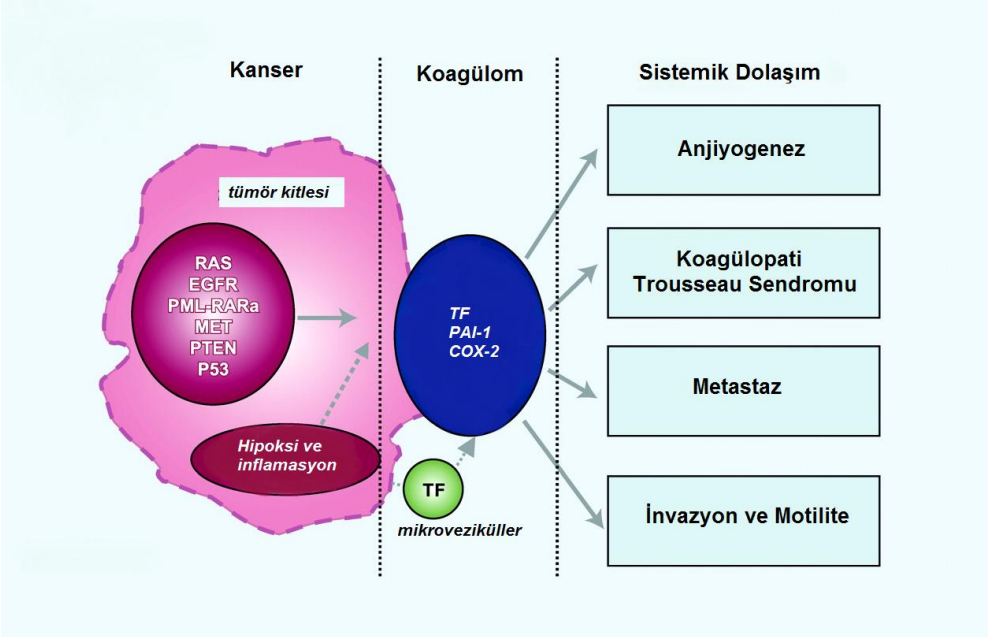
II.4.3. Kanser ve Venöz Tromboz Arasındaki İlişkinin Moleküler Temelleri

Buraya kadar olan kısımda, kanser ile venöz tromboz arasındaki ilişkinin patogenetik mekanizmaları ve rol oynayan moleküllerden bahsedildi. Trousseau, Bouillaud ve Virchow'un ardından yapılan çalışmalarda, kanserin hemostatik sistemi etkilediği, semptomatik veya asemptomatik tromboz veya kanamalara yol açarak çeşitli koagülopatilere sebep olduğu netlik kazanmıştır (121, 122). Özellikle pankreas kanseri ve glioblastoma gibi bazı kanserlerde tromboz riski çok yüksek iken meme kanseri ve melanoma gibi kanserlerde bu risk düşüktür (123). Bu farklılığın sebebi net olarak bilinmese de, malignant sürecin hemostatik sistem üzerine spesifik etkilerinin olduğu ileri sürülebilir (124). Malignant sürecin hemostatik sistem üzerine olan etkileri hem çok kompleks hem de heterojendir. Bu etkiler birçok farklı mekanizma ve molekül üzerinden gerçekleşebilir.

Kanser hücrelerinin prokoagülan aktivite göstermesinde rol oynayan en önemli molekülün, gerek kanser hücrelerinden gerekse normal hücrelerden salınan doku faktörü olduğu daha önce ifade edilmişti. Yapılan çalışmalarda, kanser hücrelerindeki doku faktörü ifadesinin, *EGFR* ve *RAS* gibi onkogenler *p53* ve *PTEN* gibi tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel kontrolü altında olduğu gösterilmiştir. Rak *et.al.* kolorektal kanser hücre hatlarını kullanarak *K-ras* onkogenindeki ifade artışı ve *p53* tümör baskılayıcı genindeki işlev kaybının TF ifadesini ve aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir (125). Ayrıca Brat et.al. insan glioblastoma hücrelerinin *PTEN* yokluğunda hipoksiye maruz kaldıklarında TF ifadesinde belirgin bir artış olduğunu ancak *PTEN* kaybı olmadığı durumda ise Buna ilaveten, doku faktörünün hücre transformasyonunu ve tümör gelişimini destekleyici etkisi olduğu ileri sürülmüştür (126, 127).

Şekil 2.14'de kanserin koagülasyon sistemi ve vasküler sistem üzerine olan etkileri şematize edilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere bazı onkojenik aktivasyonlar sonucu özellikle doku faktörü ve proteaz aktivasyon inhibitörü (PAI-1) gibi moleküllerin aktive oldukları görülmektedir. Ayrıca tümör dokusu tarafından mikroveziküller içerisinde salınan doku faktörü de bu süreçte önemli bir etkiye sahiptir (128).

Buna ilaveten Leiden Üniversitesindeki Einthoven Laboratuvarından Dr. H. Versteeg ve grubu, doku faktörünün farklı izoformlarının bulunduğunu ve bu farklı izoformların farklı düzeyde trombotik etkiye sahip olduklarını belirlemiştir (129).



Şekil 2.14. Kanserin koagülom ve vasküler sistem ile olan ilişkisi ve bu ilişkide rol oynayan gen ve moleküller (101'den adapte edilmiştir).

1988 yılında Young *et.al.* fare tümör hücrelerinde, hipoksinin DNA replikasyonunu ve metastatik potansiyellerini arttırdığını gösterdiler (130). Ayrıca gen ifade profilleme çalışmalarında, tümör dokularında ortaya çıkan hipoksik durumun koagülasyonda rol oynayan genlerin ifadesinde de değişiklik yaptığı ve Trousseau sendromu ile tümör metastazı arasındaki bağlantının hipoksik durumla ilgili olduğu ifade edildi (131). Daha sonra yapılan ifade analizleri ile

tümör dokularında gözlenen hipoksinin, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)'i ve Met tirozin kinazın yüksek affinite gösterdiği resptör olan hepatosit büyüme faktörü (HGF) sinyal yolağını aktive ettiği gösterildi (132).

Boccaccio *et. al.* ise metastaz ve hemostatik genlerin ifade düzeyleri arasında bir bağlantı olup olmadığını test etmek amacıyla, MET onkogen aktivasyonunun kanser metastazı ve hemostatik bozukluklar ile olan ilişkisini fare modelinde in vivo olarak göstermiştir. Çalışmada, fare hepatositlerinde lentiviral vektör aracılığı ile *MET* onkogen aktivasyonu yapılmış ve daha sonra takip edilen preneoplastik süreçte farelerin kuyruk venlerinde tromboz saptanmıştır. Hemostatik dengesizliğe paralel olarak farelerde hepatokarsinom tespit edilmiştir. MGU74av2 fare expresyon mikrodizinleri ile yapılan ifade analizleri sonucunda hemostatik gen paneli incelenmiş ve plazminojen-aktivatör inhibitör *(PAI)-1* ve siklooksijenaz *(COX)-2* genlerinin yüksek düzeyde ifadelendiği, bu genlerinin ürünlerinin kandaki miktarlarının da erken neoplastik süreçte artış gösterdiği tespit edilmiştir. *PAI-1*, fibrin degradasyonunu engelleyen, kan dolaşımında bulunan prokoagülan bir proteindir. *COX-2* ise iki önemli trombosit düzenleyicisi olan prostaglandin ve tromboksan sentezinde rol oynayan bir moleküldür. Daha sonra spesifik ilaçlar ile bu genlerin ürünleri inhibe edilmiş ve trombotik komplikasyonlarda düzelme ve neoplastik lezyonlarda gerileme tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, *MET* onkogeninin aktivasyonu ile özellikle *PAI-1* ve *COX-2* genlerinin ifade düzeylerinin arttığı ve bu genlerin sadece prokoagülan fenotipi değil aynı zamanda neoplastik süreci de etkilediği belirlenmiştir (133).

Bunlara ilaveten preneoplastik süreçte bir takım yolaklar da etkilenmektedir. Örneğin doku faktörünün sitoplazmik uzantısının bir sinyal iletici gibi fonksiyon görerek kanser hücresinin onkojenik aktivitelerine yardımcı olduğu, doku faktörünün aktivasyonu ile MAP kinaz ve PI3K/Akt yolağının da aktive olarak kanser hücrelerinin migrasyonunu ve apoptotik hücre ölümünden kaçmalarını sağladığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (134, 135).

Ayrıca doku faktörünün, proteazlar tarafından aktive edilmiş reseptörler (PAR) üzerinden tümör anjiyogenezini indüklediği tespit edilmiştir. PAR'ler, G-proteinleri ile birleşmiş reseptör molekülleridir. Dört farklı PAR bulunmaktadır. Bu reseptörler koagülasyon proteinleri ve trombin tarafından aktive edilirler.

Normal şartlarda PAR-2, doku faktörünün sitoplazmik uzantısı tarafından inhibe edilir. PAR-2'nin Faktör VIIa tarafından kesilip kısmen aktive edilmesinden sonra protein C aktive olarak doku faktörünü fosforile eder ve bu şekilde doku faktörünün PAR-2 üzerindeki inhibisyonu kalkar ve PAR-2 reseptörü tamamen aktive olarak anjiyojenik sinyalleri indükler ve tümör anjiyogenezine katkıda bulunur. Doku faktörü ve PAR-2 üzerinden gerçekleşen bu sinyalizasyon mekanizmasına büyüme faktörleri ve integrinler de dahil olarak, kanser hücrelerinin sağkalım, invazyon ve anjiyogenez süreçlerini kontrol ederler (135-137). Buna ilaveten, trombin tarafından aktive edilen PAR-1'in, PAR-2, β1-integrin ve matriks-metalloproteinaz-9 aracılığı ile kanser hücre invazyonunu indükleyerek preneoplastik süreci kontrol ettiği tespit edilmiştir (138, 139).

Özetle, preneoplastik süreçte hemostatik sistemi etkileyen moleküler olaylar büyük çoğunlukla doku faktörü üzerinden ele alınmıştır. Kanser hücrelerinin sahip olduğu prokoagülan özellik doku faktörüne ve bu faktörün transkripsiyonel olarak regüle ettiği onkogen ve tümör baskılayıcı genlere bağlanmıştır. Yukarıda bahsedildiği gibi bu olaylar silsilesi içerisinde, aktivasyonu artan veya azalan birçok gen, protein, sinyal molekülü, büyüme faktörü tespit edilmiştir. Ancak kanser ve tromboembolizm arasındaki ilişkinin mekanizması hala net bir şekilde ortaya konamamıştır. Bugün elde ettiğimiz teknolojik ilerlemeye paralel olarak bu alanda yapılan çalışmalar hızla devam etmektedir. Özellikle genom ebadında yapılabilen ifade analizleri sayesinde, herhangi bir patolojik durum sırasında regülasyonu değişen genler belirlenebilmekte ve bu genlerin hastalıkla ilişkisi hakkında yorum yapılabilmektedir. Bundan sonraki bölümde bu alandaki en önemli teknolojilerden birisi olan *Mikrodizin* teknolojisi ve bu teknolojinin uygulama alanlarından söz edilecektir.

II.5. MİKRODİZİN TEKNOLOJİSİ

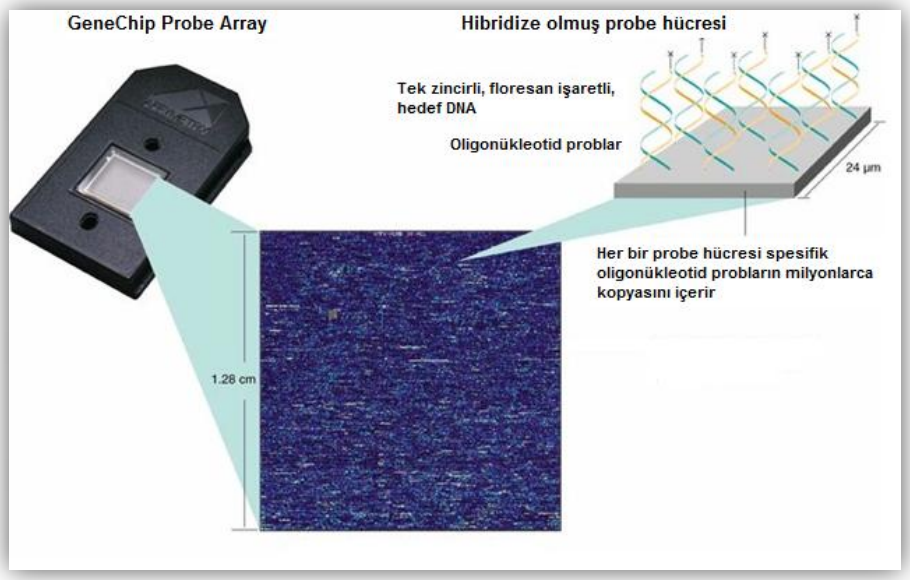
Hızla artan dizilim bilgilerinden en yüksek kapasitede faydalanabilmek için yeni teknolojilere gereksinim duyulmuştur. Bu yeni teknolojiler arasında en güçlü olanlarından birisi ise önceki yıllarda cDNA parçalarının günümüzde ise

oligonükleotidlerin yüksek yoğunlukta yan yana dizilmeleri ile ortaya çıkan mikrodizin teknolojisidir.

Bu teknolojiye ulaşmamızda, 1953 yılında DNA'nın çift zincirli heliks yapısının tanımlanması ve birbirini tamamlayan zincirlerin hibridize olarak stabil yapıda dubleks oluşturabildiğinin ve nükleik asitlerin çeşitli sabit yüzeylere fikse edilebildiğinin keşfedilmesi önemli bir başlangıç olmuştur.

1975 yılında Ed Southern, bu karakteristik özelliğin, radyoaktif olarak işaretlenmiş kısa DNA dizileri kullanılarak, belirli DNA dizilerinin tespit edilmesinde kullanılabileceğini farketmiştir (140). Bu bilim adamına ithafen, *Southern Blot* olarak adlandırılan bu nükleik asit hibridizasyon tekniği daha sonraları RNA ve Proteinler için de adapte edilerek sırasıyla *Northern* ve *Western Blot* olarak isimlendirilmiştir.

Günümüzde kullanılan mikrodizinlerin bugünkü halini almasında Ed Southern'den sonra 1990'lı yıllarda yapılan iki önemli çalışma yol gösterici olmuştur. Stanford Üniversitesi'nde Patrick Brown, saflaştırılmış cDNA klonlarından elde ettiği DNA fragmentlerini bir robot yardımı ile mikroskop camının üzerine sabitleyerek ilk cDNA mikrodizinini üretmiştir (141). Buna paralel olarak Affymetrix şirketinde araştırmalarını sürdüren Stephen P. Fodor, kısa oligonükleotid probları, in situ olarak cam substratlar üzerine sentezlemiştir. Bu şekilde yüksek yoğunluklu oligonükleotid mikrodizinler ortaya çıkmış ve bunlar özellikle gen ifadesi ve genotiplendirme çalışmalarında kullanıma sunulmuştur. Üretilen bu ilk DNA çipi GeneChip markası ile patentlenmiştir (142, 143). Bugün Affymetrix firması tarafından GeneChip markası ile üretilen çiplerin genel görünümü ve bir prob hücresinin şematize edilişi Şekil 2.15'de gösterilmiştir.



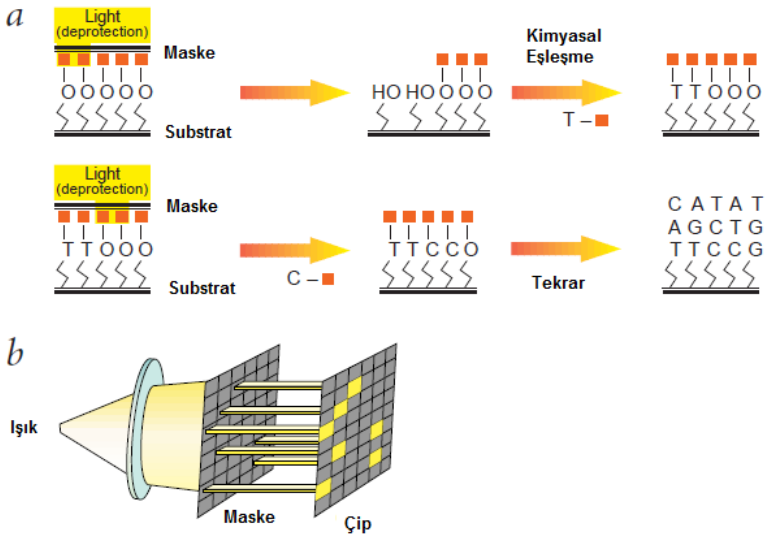
Şekil 2.15. Affymetrix GeneChip ve prob hücresinin genel görünümü (Affymetrix Santa Clara, CA).

Günümüzde mikrodizin çipleri farklı yöntemlerle üretilmektedir. En eski yöntem, PCR ile amplifiye edilmiş cDNA klonlarının uygun bir yüzeye basılmasıdır. Bir diğeri ise DNA problarının in situ olarak yüzey üzerine sentezlenmesidir. İn situ sentezleme işleminde fotolitografi, inkjet basım tekniği veya elektrokimyasal sentezleme gibi farklı teknikler kullanılmaktadır. Affymetrix tarafından kullanılan fotolitografi yöntemi Şekil 2.16'da şematize edilmiştir. Bunun yanında Agilent inkjet basım tekniğini Illumina ise mikroelektromekanik sistemle üretilen Beadchip teknolojisini kullanmaktadır.

Son yıllarda membran yerine camın kullanılması, radyoaktivitenin yerini floresan işaretlerin alması ve nükleik asit parçacıklarının belli noktalara bağlanmasını sağlayabilecek hassas yöntemlerin geliştirilmesi bu tür çalışmaların verimliliğini ve elde edilen bilgilerin miktarını arttırmıştır.

Affymetrix ekspresyon çiplerinde mRNA dizisi referans alınarak bu diziye karşı 25 bazlık oligonükleotid problar dizayn edilir. Her bir referans dizi 11-22 adet prob çifti ile temsil edilir. Bu prob çiftleri içerisinde referans diziye % 100 uyum gösteren perfect match (PM) probları ile bir bazı hatalı basılan mismatch probları (MM) bulunmaktadır. Veri analizi sırasında gen ifade düzeyi belirlenirken PM

problarından MM probları çıkarılır. Ancak farklı ön işleme algoritmaları kullanılarak sadece PM probları ile ifade düzeyleri hesaplanabilir (144).



Şekil 2.16. DNA problarının sentetik bir yüzey üzerine fotolitografi tekniği ile sentezlenmesi (145).

II.5.1. Mikrodizinlerin Kullanım Alanları

Mikrodizinleri kullanarak tüm genom boyunca gen ifade profilinin belirlenebilmesi veya tekli nükleotid polimorfizimlerinin analiz edilebilmesi nedeniyle bu teknolojinin farklı disiplinler içerisinde çok geniş bir kullanım alanı vardır. Mikrodizin temelli çalışmalar araştırmacılara çok kısa zamanda büyük ölçülerde analiz yapma imkanı tanımaktadır. 1998 yılında yapılan çalışma global gen ifade profillemesi açısından öncü çalışmalardan birisidir. Bu çalışmada mayanın transkriptom profili çıkarılmış ve hücre döngüsünde rol oynayan genler belirlenmiştir (146).

1999 yılında 8600 adet insan geni içeren cDNA array kullanılarak, hücre kültüründeki fibroblastların serum ilavesine nasıl tepki verdikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada mikrodizinlere ilaveten bazı bilgisayar programları kullanılarak, bu cevabın oluşmasında rol oynayan 500 kadar gen tanımlanmıştır (147). Mikrodizinlerin kanser araştırmalarında kullanımı özellikle bir çalışma ile

başlamıştır. Yapılan bu çalışmada meme tümör biyopsilerinden RNA izolasyonu yapılarak 8100 insan geni içeren cDNA mikrodizinleri ile ifade profillemesi yapılmıştır. Prognoz ve kemoterapiye cevap açısından farklılık gösteren ancak klasik histopatolojik yöntemler kullanılarak aynı tip olarak sınıflandırılan meme kanserlerinin, gen ifade profillerinin farklı olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile mikrodizinlerin, kanserin alttiplerinin belirlenmesinde kullanılabilecek önemli bir araç olduğu görülmüştür (148). Daha sonra 2002 yılında benzer teknik kullanılarak meme kanserinin kötü prognozunda rol oynayan genler belirlenmiştir (149). Bu noktadan başlayarak günümüzde genetik tanı kitlerine ve kişisel tedavi rejimlerine kadar gelecek olan ilerlemeler sağlanmıştır. Bunlara ilaveten, mutasyon analizlerinde tekli nükleotid polimorfizimlerinin taranmasında ve kısa tekrar dizilerinin incelenmesinde oligonükleotid mikrodizinlerden yararlanılmıştır. Bu tür polimorfizim analizleri yardımı ile birçok hastalık için kişisel ilaç rejimleri kullanılabilmiş ve daha etkin sonuçlar alınmıştır.

Yukarıda literatürden örnekler verilerek mikrodizinlerin biyolojik bilimlerde ve klinikteki uygulamaları anlatılmıştır. Bunlara ilaveten, epidemiyolojik çalışmalarda, infeksiyon hastalıklarında, toksikolojik çalışmalarda da geniş kullanım alanı bulmuştur. Mikrodizinlerin bir diğer kullanım alanı ise epigenetik çalışmalardır. Bu tür çalışmalarda, gen ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörleri veya yine gen regülasyonunda ve ifadelenmesinde rol oynayan mikro RNA'ların tanımlanması yapılmaktadır.

Bir mikrodizin çalışmasında, hibridize edilen çipin tarayıcı tarafından okunmasından sonra ham bir veri elde edilmiş olur. Bu ham verinin analiz edilip yorumlanabilmesi için bir takım yazılımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Biyoinformatik olarak adlandırılan bu alan, mikrodizin teknolojisine paralel olarak gelişen oldukça yeni bir alandır. Bir sonraki bölümde bir mikrodizin çalışmasından elde edilen verinin analiz ve yorumlanmasında izlenen yollar anlatılacaktır.

II.5.2. Biyoinformatik Analiz

Mikrodizin temelli bir ifade analizi çalışmasında, sırasıyla, biyolojik materyallerden RNA izolasyonu, izole edilen RNA'nın konsantrasyonunun ve bütünlüğünün tayini, RNA'nın amplifiye edilmesi ve işaretlenmesi, fragmentasyon

ve hibridizasyon aşamaları gerçekleştirilir. Hibridizasyon işleminden sonra çiplerin yıkama ve boyama işlemleri yapılır ve tarayıcıda taranır. Bu işlemler tamamlandıktan sonra çalışmanın biyoinformatik analiz kısmı başlar. Bu kısımda tarayıcı tarafından çipten alınan görüntü bir imaj dosyası şeklinde kaydedilir. Affymetrix GeneChip sisteminde bu dosyaya Data file (DAT) adı verilmektedir. Bu dosyadan alınan ham veri bir yazılım tarafından işlenerek Cell Intensity dosyasına (CEL) dönüştürülür. Biyoinformatik analiz kısmına bu CEL dosyası ile başlanarak, preprocessing adı verilen ön analiz ve kalite kontrol işlemlerinden sonra, varyans filtreleme, farklı ifade edilen genlerin bulunması, kümeleme analizleri gibi ileri analizler gerçekleştirilir.

Mikrodizin veri analizi sırasında asıl ulaşmak istediğimiz bilgileri yapacağımız ileri analizler sonrasında elde ederiz. Ancak bu analizlere geçmeden önce deneysel prosedürler nedeniyle oluşan, çipler arasındaki bir takım hataların veya varyasyonların analiz edilmesi ve düzeltilmesi gerekir.

II.5.2.1. Preprocessing (Ön İşleme)

Mikrodizin çalışmasında çipler arasında görülen varyasyonların birçok nedeni olabilir. Bu varyasyonlar, RNA örneklerinin amplifikasyonu ve işaretlenmesi sırasında, hibridizayon sırasında, çiplerin taranması ve sinyallerin okunması sırasında meydana gelebilir. Bu hataları düzeltmek ve ileri analizler için daha doğru ve güvenilir bir veri seti elde etmek amacıyla preprocessing işlemi gerçekleştirilir.

Background Correction, preprocessing işleminde uygulanan ilk analizdir. Bu işlemin amacı, spottan gelen sinyalin alınması sırasında ortaya çıkan arka plan gürültüsünü (background noise) elimine etmektir. Bu şekilde sadece probların bağlanması sonucu alınan ön plan sinyalleri (foreground spot intensities) analize dahil edilecektir. Arka plan gürültüsü, işaretli örneklerin problara hatalı bağlanmasından veya tarayıcının optik özelliklerinden kaynaklanabilir. Mikrodizin veri analizinde kullanılan ve ham datayı işleyen yazılımlar her bir spottan gelen sinyali değerlendirerek analiz sonucunda mutlak bir ekspresyon değerine (A) ulaşır ve aynı zamanda her bir spot için bir arka plan gürültü değeri belirler (B). Hesaplanan A değeri içerisinde arka plan gürültüsü de bulunacağı için, bu

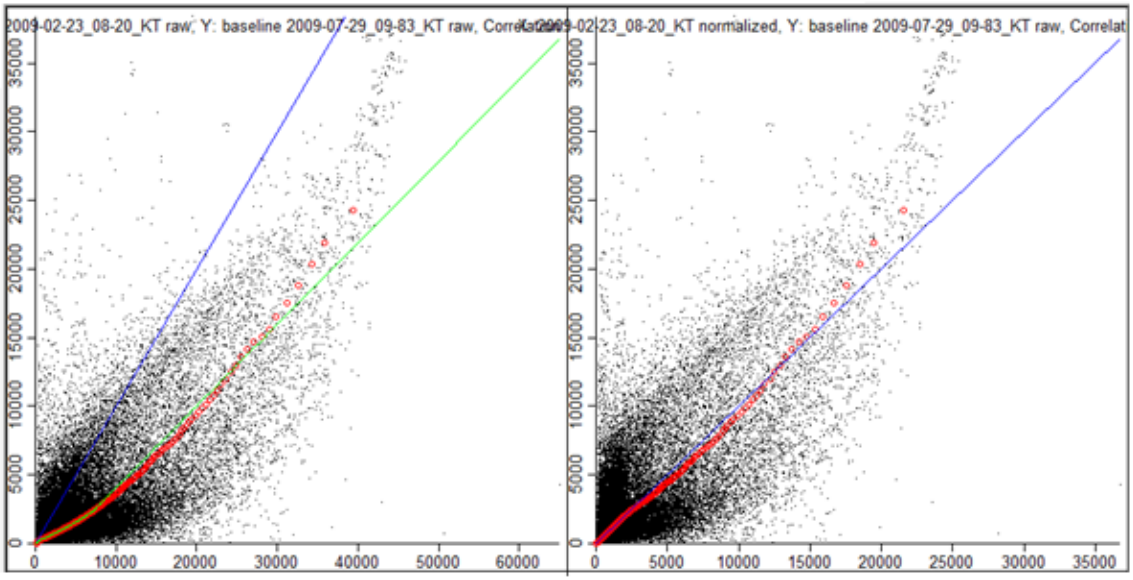
gürültünün A değerinden çıkarılması gerekir. Yani A-B değeri ile gerçek sinyal değerine ulaşılır. Bu şekilde elde edilen intensite değeri daha güvenilirdir (144).

Probe Correction, preprocessing işleminde arka plan gürültüsü temizlendikten sonra yapılan işlemdir. Affymetrix GeneChip mikrodizinlerinde her bir gen 25 baz çifti uzunluğunda 11-20 adet prob çifti tarafından temsil edilir. Bu prob çiftlerinde perfect match (PM) ve mismatch (MM) probları vardır. PM probları transkript ile tamamen komplementer olan problar, MM ise 13. bazı hatalı olan problardır. Aslında MM probları çip üzerindeki nonspesifik bağlanmaları tespit etmek amacıyla basılmıştır. Affymetrix tarafından kullanılan MAS5 algoritması, analiz sırasında ekspresyon değeri hesaplarken PM problarından MM problarını çıkaran basit bir fonksiyon kullanmaktadır. Ancak son yapılan araştırmalar MM problarının nonspesifik bağlanmaları tespit etmede iyi bir yöntem olmadığını, çünkü MM problarının bazı durumlarda PM problarından daha güçlü sinyal verebildikleri tespit edilmiştir (150). Bu nedenle probe correction için kullanılabilen ve sadece PM problarından alınan sinyalleri değerlendirebilme opsiyonuna sahip, MM problarını kullanmayan alternatif yazılımlar da geliştirilmiştir. Bu yazılımlar arasında en sık kullanılanlar, RMA, GCRMA, dCHIP, PLIER'dir. Bu tez çalışmasının veri analizleri sırasında da sadece PM problarından alınan sinyaller değerlendirilmiştir ve bu analizler 2001 yılında Li ve Wong tarafından geliştirilen dCHIP yazılımı (151) ile yapılmıştır.

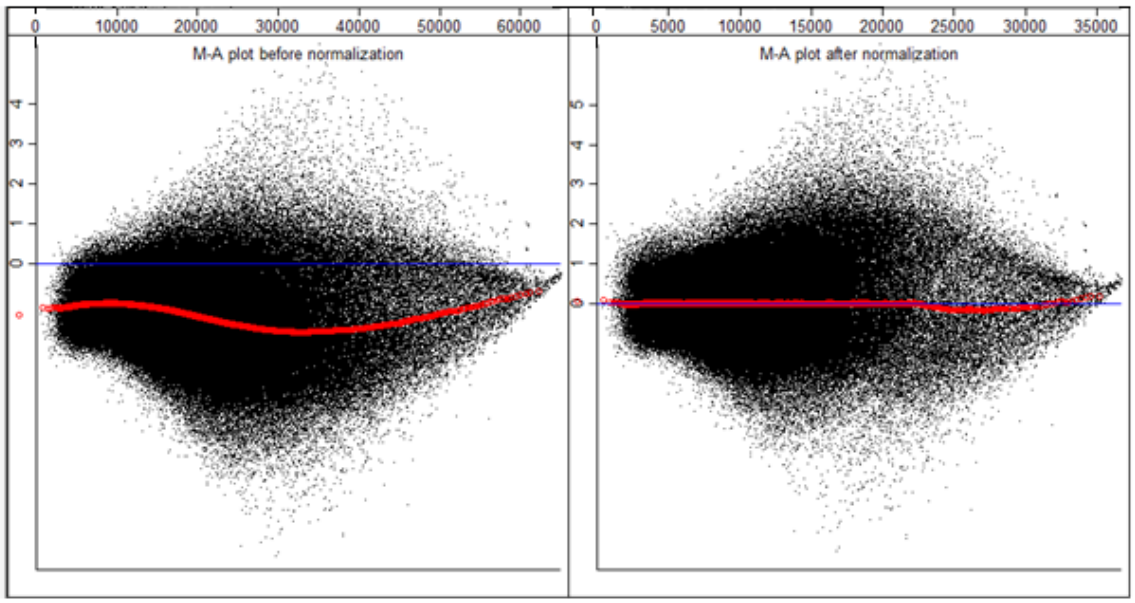
Normalizasyon: Bu aşamada, çipler arasındaki deneysel prosedürlerden kaynaklanan sapmalar ve ikilemler ortadan kaldırılır. Bu şekilde tüm şartlar eşitlendikten sonra belirli bir genin çipler arasındaki ifade düzeyi doğru bir şekilde belirlenebilir. Özellikle gen ifade analizlerinde örneğin izolasyonundan veri analizine kadar yani deneysel prosedürlerde uygulanan tüm işlemlerin her bir çip için aynı olması gerekir ve öyle olduğu kabul edilir. Ancak bu şekilde doğru bir ifade analizi yapılabilir. Normalizasyon analizi için kullanılan farklı algoritmalar mevcuttur. Özellikle Affymetrix çiplerinin analizinde kullanılan RMA algoritması, Quantile Normalization metodunu kullanmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında da Affymetrix platformu kullanıldığı için normalizasyonda Quantile metodu kullanılmıştır.

Probe Summarization, Affymetrix mikrodizinlerinde her bir genin 11-20 adet prob çifti ile temsil edildiğini söylemiştik. Analiz sırasında her bir gen için tek bir ekspresyon değerinin hesaplanması gerekir. Bu amaçla tüm problardan alınan sinyaller değerlendirilerek ortalama bir ekspresyon değeri elde edilir. Bu işlem summarization yani özetleme olarak adlandırılır.

Bu ön analiz işlemleri tamamlandıktan sonra yapılması gereken bir uygulama daha vardır. Tüm bu ön işlemlerin başarıyla yapıldığını görmek adına bir kalite kontrol analizi yapılır. Bu şekilde verinin normalizasyon öncesi ve sonrasındaki genel görünümü değerlendirilir. Şekil 2.17 ve 2.18'de bir kalite kontrol işleminden elde edilen grafikler görülmektedir. Korelasyon grafiğinde Y ekseni normalizasyon için baz alınan arrayin intensite değerlerini, X ekseni ise bu arraya göre normalize edilen arrayin intensite değerlerini göstermektedir.



Şekil 2.17. Normalizasyon öncesi ve sonrası korelasyon grafiği.



Şekil 2.18. Normalizasyon öncesi ve sonrasında MA grafikleri.

II.5.2.2. Varyans Filtreleme, Karşılaştırma ve Farklı İfade Edilen Genlerin Belirlenmesi

Önişleme analizlerinden sonra her bir prob için sayısal bir ifade değeri belirlenir. Bu aşamadan sonra elde edilen bu değerler üzerinden verinin ileri analizleri gerçekleştirilir. Bu ileri analizlerde yapılması önerilen ilk işlem varyans filtreleme işlemidir. Bu işlem sırasında her bir probun örnekler arasındaki ifade düzeyi farklılığı yani varyansı hesaplanır. Örnekler arasında anlamlı düzeyde bir farklılığa sahip olmayan problar yani varyansı küçük olan problar elenir. Bu probların elenmesinin mantığı şudur; yapılan çalışmada, karşılaştırılan gruplar arasında ifade düzeyi farklılık gösteren probları belirlemek yani gruplar arasında farklı ifade edilen genleri belirlemek amaçlanmıştır. Eğer bir probun ifade düzeyi örnekler arasında anlamlı derecede bir varyans göstermiyorsa bu probun kullanılmasının bir katkısı olmayacaktır. Bu şekilde Hackstadt ve Hess 2009'a göre tüm probların yaklaşık olarak % 30-40 kadarının elenmesi idealdir (152).

Varyans filtreleme uygulamasından sonra her bir grup birbiri ile karşılaştırılır. Bu karşılaştırma sonucunda gruplar arasında ifade düzeyi farklılık gösteren genler belirlenir. Karşılaştırma sırasında uygulanan bazı opsiyonlar ile ifade düzeyi bir kat, 2 kat veya 3-4 kat artan veya azalan genleri belirlemek mümkün olmaktadır. Bu şekilde elde edilen ve ortalama 200 ile 1000 arasında gen içeren bu listeler

farklı ifade edilen gen listesi olarak tanımlanır. Bu analiz sonucunda elde edilen listede çok fazla sayıda gen bulunacaktır. Bu genleri tek tek değerlendirmek, yapılan çalışma ile ilgisi olabilecek aday genleri belirlemek, bu genlerin yolaklarını belirlemek uzun ve yorucu bir iştir. Ancak tüm bu analizler manuel olarak değil de DAVID adı verilen bir biyoinformatik uygulaması ile yapılabilmektedir. Bundan sonraki aşamada DAVID ve bununla yapılan analizlerden söz edilecektir.

II.5.2.4. Farklı İfade Edilen Genlerin Zenginleştirilmesi (DAVID)

Gen ekspresyon mikrodizinleri gibi yüksek işlem hacimli analizler sonucunda elde edilen aday gen listelerinin analizi ve biyolojik olarak anlamlandırılması, bu tür çalışmaların en zorlu kısmıdır. Bu tür analizler için geliştirilmiş GoMiner (153), GOstat (154), Onto-express (155), Go-tool-box (156) gibi bir çok biyoinformatik araç bulunmaktadır. Bu tür biyoinformatik araçlar Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) olarak adlandırılan analizi yapmaktadırlar. Bu yöntemdeki temel mantık, elde edilen farklı ifade edilen gen listesindeki binlerce genin içerisinden, yapılan çalışma açısından istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren genleri seçebilmektir. Bu işlem sonucunda listede bulunan ve önem arzeden genler seçilebilmekte ve bu genler üzerine odaklanma imkanı sağlanmaktadır (157). DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) bu araçlardan birisidir. DAVID 2003 yılında geliştirilmiş açık kaynak bir biyoinformatik analiz aracıdır (158, 159). Bu araç ile yüzlerce veya binlerce gen içeren listeler fonksiyonel olarak analiz edilebilir ve anlamlı bir önem sırasına sokulabilir. Bu şekilde elde edilen listelerin yorumlanması ve ilgilenilen genlerin belirlenmesi daha kolay ve doğru bir şekilde yapılabilir.

Analiz sırasında eldeki gen listesi DAVID'e yüklenir. Bu listedeki genler çalışılan marka ve platforma göre farklı ID'ler ile adlandırılırlar. Bu yüzden hangi platform ile çalışılıyorsa analiz öncesinde bunun ayarlanması gerekmektedir. Gen ID'lerini içeren liste yüklendikten sonra, bu ID'lerin hangi genleri simgeledeği liste halinde elde edilebilir ve bu liste kayıt edilebilir. Sonraki aşamada DAVID ile fonksiyonel annotasyon kümeleme analizi yapılır. Bu analiz sırasında DAVID'e yüklediğiniz listedeki herbir gen analiz edilerek benzer fonksiyonlara sahip olan genler bir

kümeye toplanır. Daha sonra her bir küme için bir zenginleştirme skoru (Enrichment Score) hesaplanır. Elde edilen kümeler bu zenginleştirme skoruna göre büyükten küçüğe doğru sıralanır. Her bir kümenin zenginleştirme skoru hesaplanırken, küme içerisindeki probların p-değerlerinin geometrik ortalaması alınır. Zenginleştirme skoru şu şekildede açıklanabilir. Örneğin bizim gen listemizin %10'ununu kinazlar oluşturmaktadır. Arkaplan olarak belirlediğimiz insan genomunun ise % 1'ini kinazlar oluşturmaktadır. Gen listesinin belirlenen arka plan ile karşılaştırılması sonucunda bizim listemizde bulunan kinazların rastgele olamayacak şekilde önem arzettiğini yani zenginleştirildiğini ortaya koyar. Bu sonuca göre kinazları içeren kümeler yüksek zenginleştirme skoru alarak üst sıralarda yer alırlar (160).

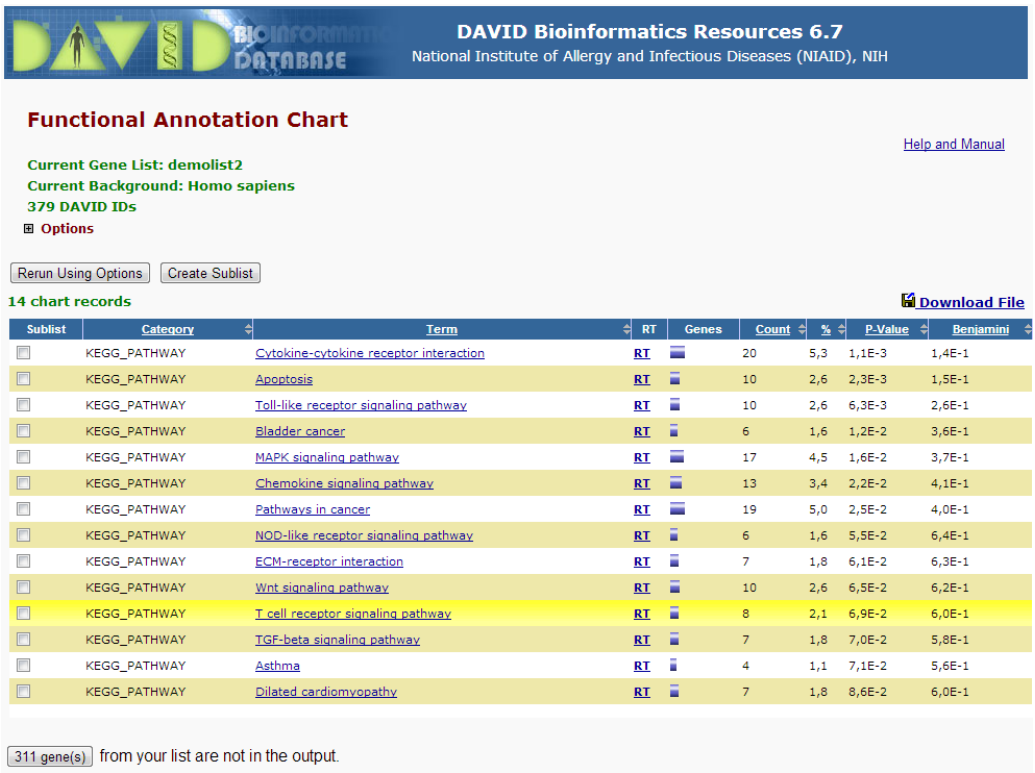


Şekil 2.19. DAVID ile yapılan fonksiyonel annotasyon kümeleme analizi sonucunda elde edilen kümelerin bir kısmını gösteren ekran görüntüsü.

Şekil 2.19'da da görüldüğü üzere her bir kümenin zenginleşme skoru, bu kümelerin içerisinde hangi gen gruplarının bulunduğu ve bu grupların içerisinde kaç tane ve hangi genlerin bulunduğu belirlenebilmektedir. Bu analiz sırasında

zenginleşme skoru 1.3'den büyük olan kümelere dikkat edilmesi önerilmektedir. 1.3 zenginleşme skoru, logaritmik olmayan ölçekte 0.05'e denk gelmektedir. Bundan dolayı bu değerden büyük olan kümeler önemli kabul edilmektedir. Ancak zenginleşme skoru 1.3'den küçük olan kümelerde de önemli gen veya genler bulunabilir. Bunu da göz ardı etmemek gerekir (160).

DAVID ile fonksiyonel annotasyon kümeleme analizi yanında yolak analizi de yapılmaktadır. DAVID, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)'a entegre olarak listede bulunan genlerin yolak analizini yapmaktadır. Bu şekilde aynı yolakta bulunan genleri belirlemekte ve bu yolakları liste halinde ve harita şeklinde sunmaktadır. Şekil 2.20'de verilen ekran görüntüsünde yolak isimleri açıldığında, yolağın haritasına Genes adı altında bulunan barlar açıldığında ise genlerin adına ulaşılmaktadır. Bu şekilde listemizdeki hangi genlerin hangi yolaklarda görev aldığını ve hangi genlerle ilişkili olabileceklerini belirleyebilmekteyiz. Yapılan bu analizler sonucu yüzlerce genden oluşan listeler yorumlanabilir az sayıda gene indirgenmektedir.



Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
	KEGG_PATHWAY	Cytokine-cytokine receptor interaction	RT		20	5,3	1,1E-3	1,4E-1
	KEGG_PATHWAY	Apoptosis	RT		10	2,6	2,3E-3	1,5E-1
	KEGG_PATHWAY	Toll-like receptor signaling pathway	RT		10	2,6	6,3E-3	2,6E-1
	KEGG_PATHWAY	Bladder cancer	RT		6	1,6	1,2E-2	3,6E-1
	KEGG_PATHWAY	MAPK signaling pathway	RT		17	4,5	1,6E-2	3,7E-1
	KEGG_PATHWAY	Chemokine signaling pathway	RT		13	3,4	2,2E-2	4,1E-1
	KEGG_PATHWAY	Pathways in cancer	RT		19	5,0	2,5E-2	4,0E-1
	KEGG_PATHWAY	NOD-like receptor signaling pathway	RT		6	1,6	5,5E-2	6,4E-1
	KEGG_PATHWAY	ECM-receptor interaction	RT		7	1,8	6,1E-2	6,3E-1
	KEGG_PATHWAY	Wnt signaling pathway	RT		10	2,6	6,5E-2	6,2E-1
	KEGG_PATHWAY	T cell receptor signaling pathway	RT		8	2,1	6,9E-2	6,0E-1
	KEGG_PATHWAY	TGF-beta signaling pathway	RT		7	1,8	7,0E-2	5,8E-1
	KEGG_PATHWAY	Asthma	RT		4	1,1	7,1E-2	5,6E-1
	KEGG_PATHWAY	Dilated cardiomyopathy	RT		7	1,8	8,6E-2	6,0E-1

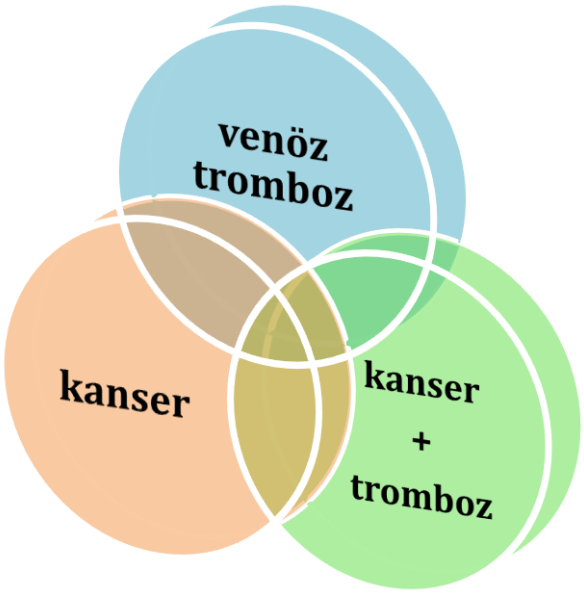
Şekil 2.20. DAVID yolak analizi ekran görüntüsü.

III. GEREKÇE VE AMAÇ

Kanser ve Tromboz arasındaki ilişki ilk defa 1865 yılında Armand Trousseau tarafından ifade edilmiştir. Trousseau idiopatik venöz trombozun henüz teşhis edilmemiş gizli bir kanserin erken belirtisi olabileceğini ileri sürmüştür (78). Daha sonra yapılan epidemiyolojik çalışmalarda da idiopatik venöz tromboz tanısı almış bireylerde özellikle takip eden 1 yıl içerisinde kanser görülme riskinin % 30 gibi yüksek oranlarda olduğu belirlenmiştir (3). Yine 1987 yılında Goldberg *et.al.* DVT tanısı almış bireylerde takip eden iki yıl içerisindeki kanser riskini % 19 olarak belirlemiştir (82). 2000 yılında Sorensen *et.al.* yaptıkları çalışmada VTE tanısı almış bireylerde sonraki bir yıl içerisinde ortaya çıkan kanserin daha kötü bir prognoza sahip olduğunu ifade etmiştir (84). Bu tür klinik araştırmalar trombozla birlikte seyreden kanserin hastalığın prognozunu, tedavi sürecini ve sağkalım oranlarını olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir. Bu sebeple araştırıcılar bu iki farklı patoloji arasındaki bağlantının mekanizmasını belirlemeye, hangi genlerin veya yolakların bu bağlantıda rol oynayabileceğini tespit etmeye odaklanmışlardır.

2005 yılında Boccaccio *et.al.* yaptıkları çalışmada MET onkogenini aktive ederek farelerde sporadik hepatoselüler karsinomlar geliştirmişlerdir. Kullanılan bu fare modelinde ortaya çıkan trombohemorajik komplikasyonlar takip edilmiş ve hemostatik gen paneli MGU74av2 fare mikrodizinlerinde analiz edilmiştir. Bu panel içerisinde bulunan 71 genin ifade düzeyleri incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda plazminojen aktivatör inhibitör tip-1 (PAI-1) ve siklooksijenaz 2 (COX-2) genlerinin ifadelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bu artışın MET onkogen aktivasyonu yolu ile olduğu sonucuna varılmıştır (133).

Yapılan moleküler düzeydeki çalışmalar, kanser hastalarında görülen tromboembolik komplikasyonlarda ekstrinsik koagulasyon yolağının başlatıcı molekülü olan doku faktörünü (TF) merkeze koymaktadır. Bunun en önemli sebebi birçok tümör tipinde yüksek düzeyde doku faktörü ifadesinin görülmesidir. Buna ilaveten doku faktörünün ifade artışında epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*), *RAS, p53* ve *PTEN* gibi onkogen ve tümör baskılayıcı genlerinde rol oynadığı belirlenmiştir (125-127).



Şekil 3.1. Yapılan tez çalışmasında kanser, venöz tromboz ve kanser + tromboz arasında nasıl bir moleküler ilişkinin olduğu ve bu ilişkide hangi yolakların ve genlerin rol oynadıkları incelenmiştir. Yukarıdaki ven diagramında ise bu farklı patolojilerin aslında birbirleri ile yakından ilişkili oldukları şematize edilmiştir.

Buna ilaveten doku faktörünün koagülasyon sistemindeki görevinden farklı olarak hücre içi sinyal iletiminde görev aldığının belirlenmesi, PAR-2 gibi sinyal molekülleri ile bağlantısının tespit edilmesi buna bağlı olarak kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz sürecinde rol oynadığının belirlenmesi önemli bir adım olmuştur.

Özellikle meme ve yumurtalık kanserleriyle yapılan çalışmalarda koagülasyon faktörü VII'nin ektopik olarak sentezlendiği, doku faktörü ile kompleks oluşturarak mikropartiküller adı verilen membran vezikülleri ile kanser hücrelerinden salındıkları ve bu mekanizma yolu ile de tromboembolik komplikasyonların ortaya çıkabileceği belirlenmiştir. Ancak bu mekanizma tam olarak aydınlanmamış olup çalışmalar devam etmektedir.

Yapılan çalışmalarda yukarıda bahsedildiği gibi genellikle koagülasyon yolağında rol oynayan moleküller, doku faktörü ve ekstrinsik koagulasyon yolağı göz önüne

alınmış ve çalışmalar bu yönde dizayn edilmiştir. Ancak son yıllarda elde edilen bilgiler ışığında venöz tromboembolizmin aynen kanserde olduğu gibi multifaktöryel olduğu, bu patolojinin ortaya çıkmasında pek çok farklı metabolik yolun veya genlerin rol oynadığı belirlenmiştir. Kanser ve venöz tromboz arasındaki bağlantı irdelendikçe, bu bağlantının doğal bağışıklık sistemi, inflamasyon ve kompleman sistemine kadar genişleyebileceği görülmüştür.

Ancak yapılan literatür analizinde bu patolojilerin genel bir ifade profilini ortaya çıkaracak, hangi gen veya gen gruplarının ifadesinin değiştiğini gösterecek, hangi moleküler yolakların bu mekanizmada rol oynayabileceğini gösterebilecek bir genel ifade profillemesi, transkriptom analizi yapılmamıştır. Venöz trombozun da multifaktöryel bir patoloji olmasından dolayı yapılacak bu tür bir deney dizaynı ile transkriptomun bir bütün halinde incelenip, bu farklı patolojilerin ortaya çıkmasında rol oynayabilecek gen veya gen gruplarının belirlenmesi bu alandaki bakış açısını önemli düzeyde etkileyecektir.

Yapılan bu tez çalışmasında da buradan yola çıkarak kanser ve venöz tromboz arasındaki ilişkinin moleküler mekanizması sorgulanarak;

- İdiopatik venöz tromboz hastalarında kanserin asemptomatik olduğu erken evrelerinde yani preneoplastik dönemde moleküler düzeyde ne gibi değişiklikler olmaktadır ve hangi moleküler yolaklar etkilenmektedir ?
- Moleküler düzeydeki bu tür değişiklikleri belirleyebilecek spesifik bir moleküler imza mevcut mudur ?
- Bu değişimleri tespit etmede kullanılabilecek dolayısıyla venöz tromboz hastaları arasında daha sonradan kanser geliştirmesi en muhtemel olan yüksek riskli bireyleri ayırtedebilecek biyobelirteçler tanımlanabilirmi ?

Sorularına yanıt aranmıştır.

Bu amaçla her biri 30 bireyden oluşan Epitelyal Kanser, İdiopatik VTE, Kanser + Tromboz ve sağlıklı Kontrol bireylerden oluşan dört grup oluşturulmuştur. Gruplardaki bireylerin transkriptom analizleri yapılarak gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır. Farklı gruplar arasındaki bireylerde transkriptomik düzeyde bir farklılık olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, kanser ile venöz tromboz arasındaki bağlantının genom ebadında bir ifade profillemesi ile sorgulanması ve bu patolojinin ortaya çıkmasında rol oynayan moleküler belirteçlerin araştırılması amaçlanmaktadır. Elde edilmiş olan veriler ışığında nihayetinde kanser geliştirecek hastalar ile tromboza meyilli kanser hastalarının tespitini önceden sağlayacak belirteçlerin bulunmasındaki ilk adım atılmış olacaktır.

IV. MATERYAL VE YÖNTEM

Yapılan bu tez çalışmasında kanser ve venöz tromboz arasındaki bağlantı transkriptom analizleri ile moleküler düzeyde incelenmiştir. Bu amaçla ana materyal olarak bireylerden alınan periferik kan örnekleri kullanılmıştır. Çalışma Ankara Üniversitesi Etik Kurulunun 127-3560 sayılı ve 07.04.2008 tarihli kararı ile etik olarak uygun bulunmuştur.

a. Materyal

Bu proje kapsamında koagülomun çözümlenmesi amacı ile;

1- Venöz Tromboz + Epitelyal Kanser

2- Epitelyal Kanser

3- İdiyopatik Venöz Tromboz

4- Normal Sağlıklı

olmak üzere 4 grubun transkriptom profillerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Aşağıda örneklerin gruplara göre dağılımı görülmektedir.

Çizelge 4.1. Gruplardaki örnek sayıları.

EPİTELYAL KANSER	KANSER+TROMBOZ	TROMBOZ	KONTROL
32	30	32	30

Çizelge 4.2. Örneklere ait demografik veriler.

	EPİTELYAL KANSER	KANSER + TROMBOZ	İDİOPATİK VTE	KONTROL
Örnek Sayısı *(n)*	**32**	**30**	**32**	**30**
Erkek	**4 (12.5 %)**	**9 (30 %)**	**6 (18.7 %)**	**11 (36.6 %)**
Kadın	**28 (87.5 %)**	**21 (70 %)**	**26 (81.3 %)**	**19 (63.4 %)**
Yaş Ortalaması	**51.9**	**60.5**	**46.3**	**37.0**

Çizelge 4.3. Kanser ve Kanser + Tromboz grubunda bulunan örneklerin kanser tipleri.

KANSER + TROMBOZ		KANSER	
08-13	MİDE CA+DVT	08-07	MEME CA
08-20	MEME CA+PE	08-08	MEME CA
08-21	MEME CA	08-09	MEME CA
08-24	REKTAL CA+DVT	08-15	MEME CA
08-33	MESANE CA	08-17	MEME CA
08-48	RENAL CA	08-22	MEME CA
08-49	AC CA	08-26	MEME CA
08-50	Tiroit Papiler CA	08-27	MEME CA
08-52	Tiroit CA	08-29	MEME CA
08-126	AC CA	08-31	MEME CA
08-127	KOLON CA	08-32	MEME CA
08-128	MESANE CA	08-46	MEME CA
08-129	MİDE CA	08-134	MEME CA
08-130	OVER CA	08-135	MEME CA
09-82	BEYİN CA	28369	AC CA
09-83	LARİNKS CA+PTE	28734	AC CA
09-84	MİDE CA+PTE	29099	AC CA
09-85	PANKREAS CA+PTE	29465	AC CA
09-86	NAZOFARİNKS CA+PTE	09-122	MEME CA
09-87	MİDE CA+PTE	09-123	MEME CA
09-88	MESANE CA+PTE	09-125	MEME CA
09-90	AC CA+TROMBOZ	09-134	MEME CA
09-91	TİROİT CA +TROMBOZ	09-136	MEME CA
09-126	MEME CA+ PE	09-195	MEME CA
09-189	PROSTAT CA + Tromboz	09-196	MEME CA
09-202	MEME CA + DVT	09-200	MEME CA
09-231	MEME CA + DVT	09-201	MEME CA
09-238	MİDE CA + DVT	09-203	MEME CA
09-239	MİDE CA + DVT	09-230	MEME CA
09-286	MEME CA + DVT	09-242	MEME CA
		09-287	MEME CA
		09-124	MEME CA

Hastalardan ve kontrol grubundaki bireylerden periferal kan örnekleri PaxGen Blood RNA tüplerine **(PreAnalytiX GmbH,** Switzerland, Cat. No: 762165) alınmıştır. PaxGene tüplere alınan kan örnekleri üreticinin tavsiyeleri doğrultusunda en az 3-4 saat oda ısısında bekletildikten sonra – 20 °C'de bir gece inkübe edilip daha sonra – 80 °C'ye kaldırılmıştır. Bu şekilde kademeli olarak dondurularak RNA'nın zarar görmesi engellenmiştir.

b. Yöntem

i. RNA İzolasyonu

Periferik kandan RNA izolasyonu PaxGen RNA İzolasyon Kiti (Qiagen, Nederland, Cat. No. 762174) ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon prosedürü aşağıdaki gibidir.

1- İzolasyona başlamadan bir gün önce – 80 °C' de bekletilen kan örnekleri oda ısısına alınıp gece boyu bekletilmiştir. Bu şekilde hücrelerin parçalanması sağlanmıştır.

2- Bir gece oda ısısında bekletilen örnekler 4500 x g de 10 dakika santrifüj edilir.

3- Süpernatant dökülerek uzaklaştırılır. Kalan pellet üzerine 4 mL RNase içermeyen su ilave edilir ve tüplerin ağzı yeni kapaklar ile kapatılır.

4- Pellet tamamen çözünene kadar vortekslenir.

5- 10 dakika 4500 x g de santrifüj edilir.

6- Süpernatant dökülerek uzaklaştırılır. Bu aşamada süpernatantın tamamen uzaklaştırılmaması hücrelerin parçalanmasını ve RNA'nın membrana bağlanmasını etkileyeceği için önemlidir.

7- Pellet üzerine 350 µl BR1 ilave edilir ve tamamen çözünene kadar vortekslenir.

8- Örnek 1,5 mL' lik mikrofüj tüpüne aktarılır ve üzerine 300 µl BR2 tamponu ve 40 µl Proteinaz K ilave edilir.

9- Karışım 5 saniye vortekslenir ve 25 dakika 55 °C' de 400 rpm hızda çalkalamalı etüvde inkübe edilir.

10- Örnekler, 2 mL' lik toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş kolon (mor renkli) üzerine aktarılır ve 3 dakika 15.000 rpm' de santrifüj edilir.

11- Alta geçen sıvı kısım pellete dokunmadan alınıp yeni bir mikrofüj tüpüne aktarılır.

12- Üzerine 350 µl saf etanol ilave edilir. Vorteks ile karıştırılır ve 1-2 saniye santrifüj edilir.

13- 700 µl örnek, 2 mL' lik toplama tüpü içerisinde bulunan kolon (kırmızı renkli) üzerine aktarılır.

14- 1 dakika 15.000 rpm de santrifüj edilir. Alta geçen sıvı kısım atılır ve kolon yeni bir 2 mL' lik toplama tüpü içerisine yerleştirilir.

15- Örneğin geri kalan kısmı da kolona aktarılır ve yine 15.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.

16- Alta geçen sıvı kısım atılır ve kolon yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirilir.

17- Kolon üzerine 350 µl BR3 tamponu ilave edilir ve 15.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir. Alta geçen sıvı kısım atılır ve kolon yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirilir.

18- Bu aşamada ayrı bir mikrofüj tüpü içerisinde DNase solüsyonu hazırlanır. Bunun için, 70 µl RDD Tamponu üzerine 10 µl DNase I stok solüsyonu ilave edilir ve karıştırılır (Bir örnek için). Kısa süreli santrifüj edilir.

19- Hazırlanan bu dilüe DNase I solüsyonundan örnek üzerine 80 µl ilave edilir. 15 dakika oda ısısında inkübe edilir.

20- 350 µl BR3 Tamponu kolon üzerine uygulanır ve 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Alta geçen sıvı kısım atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.

21- 500 µl BR4 Tamponu kolon üzerine uygulanır. 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Alta geçen sıvı kısım atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.

22- Yine 500 µl BR4 Tamponu kolon üzerine uygulanır ve 3 dakika 15.000 rpm'de santrifüj edilir. Alta geçen kısım atılır ve kolon yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirilir.

23- 1 dakika 15.000 rpm'de santrifüj edilir. Alta geçen sıvı kısım atılır ve kolon 1,5 mL'lik bir mikrofüj tüpünün içerisine konur.

24- Kolon üzerine 40 µl BR5 Tamponu ilave edilir. 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.

25- Aynı toplama tüpü kullanılarak işlem 40 µl BR5 tamponu ile tekrar edilir.

26- Elde ettiğimiz filtrat 65 °C'de 5 dakika inkübe edilir.

27- İnkübasyondan sonra örnekler hemen buz üzerine alınır ve konsantrasyon tayini yapılır.

ii. İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları Nanodrop UV Spektrometre (Thermo Scientific, USA) cihazında ölçülür. Nükleik asitler 260 nm dalga boyundaki ışığı absorbe ederler. Bir solusyon içerisindeki nükleik asit konsantrasyonu ile spektrofotometrede absorbe edilen ışık miktarı doğru orantılıdır. Cihaz bu şekilde absorbe edilen ışık miktarını tespit eder ve solüsyon içerisindeki nükleik asit konsantrasyonunu hesaplar. Bu işlem sırasında 280 nm dalga boyunda da ölçüm yapılır. 280 nm proteinlerin absorbe ettiği dalga boyudur. 260 nm deki absorbansın 280 nm deki absorbansa oranı, nükleik asit içerisinde protein kontaminasyonu olup olmadığını gösterir. Bu şekilde elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı hakkında bilgi edinilir. Daha sonra RNA örnekleri her bir tüpte 1'er µg olacak şekilde porsiyonlara ayrılır ve kullanılıncaya kadar – 80 ºC' de saklanır.

iii. RNA Bütünlüğünün Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların bütünlüğü Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, USA, Cat. No. 5067-1511) kullanılarak Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) cihazında tespit edilir. Bu işlem sırasında uygulanan prosedür aşağıdaki gibidir,

1- Elektrotların Dekontaminasyonu: Bunun için kitin içeriside bulunan temizleme çipleri kullanılır. Bir çipin içerisine 350 µl RNase Zap solüsyonu konur ve bu çip cihaza yerleştirir. Cihazın kapağı kapatılır ve 1 dakika beklenir. Bu sürenin sonunda çip çıkarılır. İkinci temizleme çipinin içerisine 350 µl RNase içermeyen su konur ve cihaza yerleştirilir. 10 saniye beklenir ve çip çıkarılır. Cihazın kapağı kapatılmadan önce 10 saniye daha beklenir. Cihazın kapağı kapatılır. Bu şekilde dekontaminasyon işlemi tamamlanmış olur.

2- Jelin Hazırlanması: Prosedüre başlamadan önce tüm reaktifler 30 dakika oda ısısında bekletilmelidir. Daha sonra 550 µl Agilent RNA 6000 Nano jel

matriks (kımızı işaretli tüp) toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş filtre üzerine uygulanır. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. 65 µl'lik porsiyonlara ayrılarak + 4 °C de saklanır. Hazırlanan bu matriks 1 ay süreyle kullanılabilir.

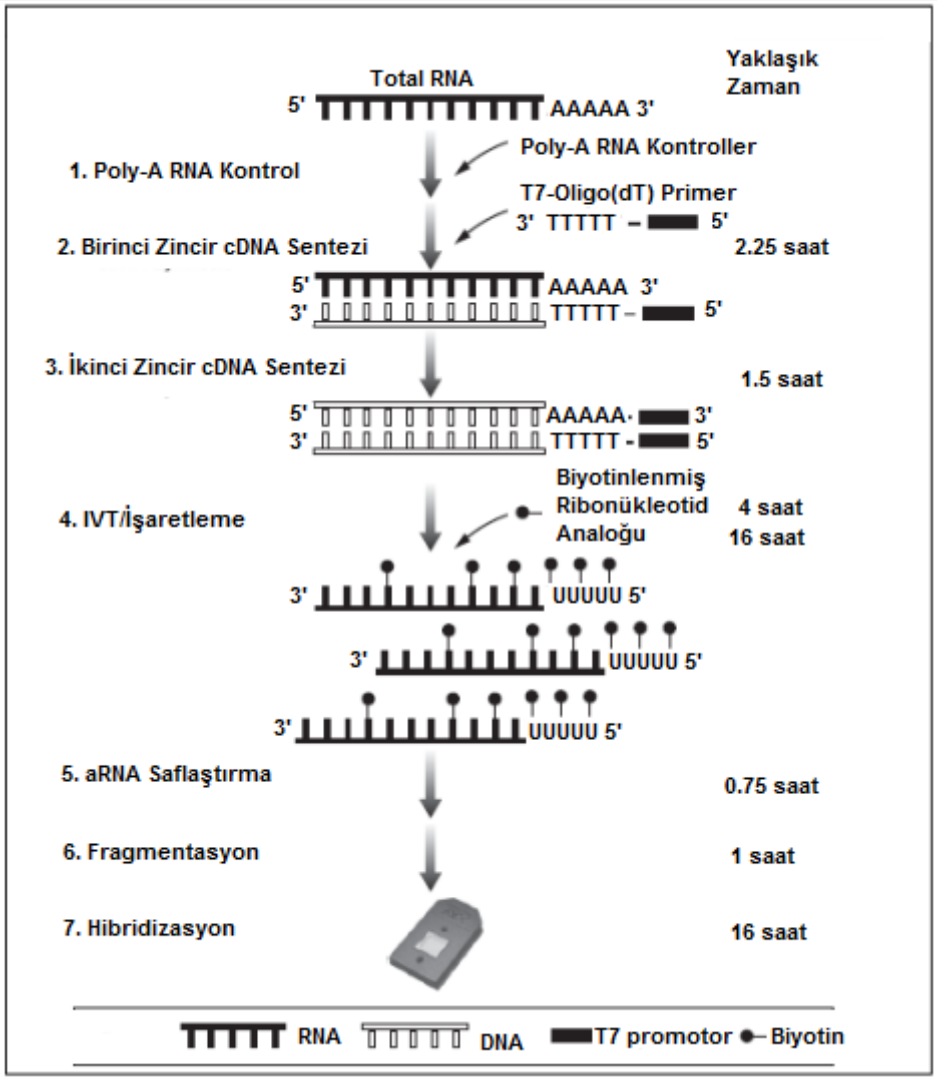
3- Jel-Boya Karışımının Hazırlanması: Oda ısısına eşitlenen RNA 6000 Nano boya konsantresi (mavi tüp) 10 saniye vorteksle karıştırılıp santrifüj edilir. RNA 6000 Nano boya konsantresinden 1 µl alınıp daha önceden hazırlanmış olan 65 µl jel matriks üzerine ilave edilir. Karışım vorteksle karıştırılır. 10 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilir. Hazırlanan bu karışım bir gün içerisinde kullanılmalıdır.

4- Jel Boya Karışımının Çipe Yüklenmesi: Yeni bir RNA 6000 Nano çip Priming Station'a yerleştirilir. RNA 6000 Nano çip üzerindeki G ile işaretli kuyucuğa 9 µl jel-boya karışımı yüklenir. Priming istasyon kapatılır ve üzerindeki enjektör 0,3 işaretine kadar yavaşça bastırılır. Bu noktaya geldiğinde enjektör bir menteşe tarafından sabitlenecektir. Bu aşamada 30 saniye beklenir ve daha sonra enjektörün menteşesi serbest bırakılır. Enjektörün kendi basıncıyla yukarı çıkması beklenir. Enjektörün pistonu tamamen yukarı çıktıktan sonra istasyon açılır. Çip üzerinde G işareti olan iki kuyucuğa daha 9'ar µl jel-boya karışımı yüklenir.

5- RNA 6000 Nano Marker Yüklenmesi: Çip üzerinde Ladder işareti olan kuyucuğa ve 12 adet örnek kuyucuğuna 5 µl RNA 6000 Nano Marker yüklenir.

6- Ladder ve Örneklerin Yüklenmesi: İkincil yapı oluşumunu engellemek için RNA örnekleri çipe yüklenmeden önce 2 dakika 70 °C de tutularak denatüre edilirler. Daha sonra çip üzerinde Ladder işareti bulunan kuyucuğa 1 µl ladder yüklenir. 12 adet örnek kuyucuğuna da 1'er µl örnek yüklenir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra çip 2400 rpm'de İKA Vorteks cihazında 1 dakika vortekslenir. Daha sonra çip Agilent Bioanalyzer cihazına yüklenerek analiz başlatılır.

iv. GeneChip 3' IVT Kit ile cRNA Sentezi



Şekil 4.1. GeneChip 3' IVT kit ile cDNA sentezinin akış şeması.

Prosedüre başlamadan önce üretici firma tarafından optimize edilen ve önerilen başlangıç RNA konsantrasyonları değerlendirilmeli ve uygun bir konsantrasyon belirlenerek prosedüre başlanmalıdır. Bizim yaptığımız optimizasyon çalışmalarına göre en fazla cDNA elde edilen başlangıç konsantrasyonu 500 ng olarak belirlenmiştir ve tüm örnekler için bu konsantrasyon değeri kullanılmıştır.

Çizelge 4.4. 3’ IVT Kit ile tavsiye edilen başlangıç RNA konsantrasyonları.

Başlangıç RNA Konsantrasyonu

Öneriler	Miktar
Önerilen	**100 ng**
Maksimum	**500 ng**
Minimum	**50 ng**

1. Poly-A Kontrollerin Hazırlanması

Poly-A kontroller prosedürdeki Labelling aşamasının kontrolüdür. Dışarıdan eklenen bu prokaryotik kontroller ile hibridizasyonun ön aşamaları kontrol edilmiş olur. Poly-A kontroller hazırlanırken Kit’in kullanım kılavuzunda bulunan aşağıdaki tablodan yararlanılır.

Çizelge 4.5. Poly-A kontrol dilüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan tablo.

Poly-A RNA Kontrol Stok Dilüsyonları					
	Seri Dilüsyonlar				
Başlangıç Toplam RNA Miktarı	**1. Dilüsyon**	**2. Dilüsyon**	**3. Dilüsyon**	**4. Dilüsyon**	**Toplam RNA'ya eklenecek 4. Dilüsyon Hacmi**
50 ng	**1:20**	**1:50**	**1:50**	**1:20**	**2 µl**
100 ng	**1:20**	**1:50**	**1:50**	**1:10**	**2 µl**
250 ng	**1:20**	**1:50**	**1:50**	**1:4**	**2 µl**
500 ng	**1:20**	**1:50**	**1:50**	**1:2**	**2 µl**

Birinci Dilüsyon için;

2 µl Poly-A Kontrol Stok Solüsyonu

38 µl Poly-A Kontrol Dilüsyon Tamponu karıştırılır ve hafifçe santrifüj edilir.

İkinci Dilüsyon için;

2 µl Birinci Dilüsyon

98 µl Poly-A Kontrol Dilüsyon Tamponu karıştırılır ve hafifçe santrifüj edilir.

Üçüncü Dilüsyon için;

2 µl İkinci Dilüsyon

98 µl Poly-A Kontrol Dilüsyon Tamponu karıştırılır ve hafifçe santrifüj edilir.

Dördüncü Dilüsyon için;

50 µl Üçüncü Dilüsyon

50 µl Poly-A Kontrol Dilüsyon Tamponu karıştırılır ve hafifçe santrifüj edilir.

Bu dördüncü dilüsyondan 2 µl alınıp 500 ng total RNA'ya ilave edilir.

NOT: Birinci dilüsyon - 20 °C de 6 hafta saklanabilir. Bu solüsyon 8 defa dondurup çözmeye dayanıklıdır.

2. Total RNA / Poly-A Kontrol Karışımın Hazırlanması	**Hacim**
Total RNA örneği (50-500 ng)	değişken
Dilüe Poly-A RNA Kontrol (Dördüncü Dilüsyon)	2 µl
Nükleaz içermeyen su	değişken
Son Hacim	5 µl

3. Birinci Zincir cDNA Sentezi

Bu aşamada RNA örneğine komplementer olan DNA'nın ilk zincirinin sentezi gerçekleştirilecektir.

Birinci Zincir Master Mix Hazırlanması

- *Tüm işlemler buz üzerinde yapılmalıdır.*

Birinci Zincir Tampon Mix	**4 µl**
Birinci Zincir Enzim Mix	**1 µl**
Son Hacim	**5 µl**

- Hazırlanan mix vorteks ile karıştırılır. Hafifçe santrifüj edilir.
- Herbir RNA örneğinin üzerine **5 µl** ilave edilir.

1- Daha önceden hazırlanan 5 µl Total RNA/Poly-A Kontrol Mix, 5 µl Birinci Zincir Master Mix üzerine ilave edilir. Son hacim 10 µl olur.

2- Hafifçe vortexlenir, santrifüj edilir ve hemen buz üzerine alınır.

3- 42 °C'de 2 saat inkübe edilir.

İnkübasyondan sonra hafifçe santrifüj edilir. Reaksiyon buz üzerine alınır ve hemen ikinci zincir sentezine geçilir.

4. İkinci Zincir cDNA Sentezi

Bir önceki aşamada komplementer DNA'nın birinci zinciri sentezlenmişti. Bu safhada ise bu zincirin komplementeri olan cDNA'nın ikinci zinciri sentezlenecektir.

1- İkinci Zincir Master Mix hazırlanır

Nükleaz içermeyen su	13 µl
İkinci Zincir Tampon Mix	5 µl
İkinci Zincir Enzim Mix	2 µl
Son hacim	20 µl

2- Karışım vorteks ile hafifçe karıştırılır.

3- Herbir cDNA örneği üzerine (10 µl) 20 µl İkinci Zincir Master Mix ilave edilir.

4- Tüp alt üst edilerek hafifçe karıştırılır.

5- 16 °C de 1 saat inkübe edilir.

6- 65 °C de 10 dakika inkübe edilir.

7- İnkübasyonun ardından santrifüj edilir.

8- Örnekler buz üzerine alınır ve hemen in vitro transkripsiyon (IVT) reaksiyonuna geçilir.

NOT : Bu aşamada örnekler bir gece – 20 °C de bekletilebilir.

5. In Vitro Transkripsiyon / aRNA İşaretleme

Prosedürün bu aşamasında amplifiye edilen ve konsantrasyonu artan cDNA örneğinden tekrar RNA sentezi yapılacaktır. Yeni sentezlenecek olan RNA, ortama eklenen bazların işaretli olmasından dolayı fleuresan olarak işaretlenmiş olacaktır. Bu şekilde elde edilen RNA amplified RNA (aRNA) olarak adlandırılır.

Oda ısısında IVT Master Mix hazırlanır.

IVT Biotin Label	4 µl
IVT Labeling Buffer	20 µl
IVT Enzim Mix	6 µl
Son hacim	30 µl

1- Hazırlanan mix hafifçe vortekslenerek karıştırılır. Santrifüj edilir ve buz üzerine alınır.

2- 30 µl IVT Master mix, 30 µl çift zincirli cDNA örneği üzerine ilave edilir. Böylece son hacim 60 µl olur.

3- Hafifçe vortekslenir ve santrifüj edilir.

4- 40 °C de 16 saat inkübe edilir.

5- İnkübasyondan sonra reaksiyon buz üzerine alınır ve aRNA saflaştırma aşamasına geçilir.

6. aRNA'nın Saflaştırılması

Saflaştırma aşamasında, bir önceki amplifikasyon ve işaretleme aşamalarında ortama eklenen ve artık ihtiyaç duyulmayan kirletici durumundaki iyon ve materyallerin temizlenmesi amaçlanmaktadır.

1- Saflaştırma işlemine başlamadan önce, aRNA Elüsyon Solüsyonu en az 10 dakika 50-60 °C'ye ısıtılır.

2- Oda ısısında aRNA Binding Mix hazırlanır

RNA Binding Beads	**10 µl**
aRNA Binding Buffer Concentrate	**50 µl**

3- 60 µl aRNA Binding Mix her bir örneğin üzerine ilave edilir. Pipetleme ile karıştırılır.

4- 120 µl % 100 Etanol her bir örneğin üzerine ilave edilir. Pipetleme ile karıştırılır. Örnekler en az 2 dakika otomatik çalkalayıcı da karıştırılır.

RNA Bead'lerin Yakalanması;

a- Çalkalama işleminden sonra tüpler manyetik tüp taşıyıcı üzerine alınır. 5 dakika bekletilir.

b- Yakalama işlemi tamamlandığında solüsyon tamamen transparent olacaktır ve beadler dipte pellet halinde toplanacaktır.

NOT: Maksimum aRNA eldesi için karıştırma işlemi iyi yapılmalı ve solüsyon transparent olana kadar manyetik taşıyıcı üzerinde bekletilmelidir.

c- Süpernatant Beadlere dokunmadan alınır ve uzaklaştırılır.

d- Tüpler manyetik taşıyıcıdan çıkarılır.

Beadlerin Yıkanması;

NOT: Kullanmadan önce aRNA Yıkama Solüsyonunun üzerine Etanol eklenildiğinden emin olunmalıdır.

a- Her bir örneğin üzerine 100 µl aRNA Yıkama Solüsyonu ilave edilir.

b- 1 dakika süreyle orta şiddette çalkalama işlemi yapılır.

c- Tüpler manyetik taşıyıcı üzerine konur ve 5 dakika beklenir.

d- Beadlere dokunmadan süpernatant alınır ve uzaklaştırılır.

e- Tüper manyetik taşıyıcıdan çıkarılır.

f- a ile d arasındaki adımlar 100 µl aRNA Yıkama Solüsyonu ile tekrar edilir.

g- Tüpler çalkalayıcı üzerine yerleştirlir ve ağzı açık bir şekilde 1 dakika çalkalanır. Fazla Etanolun uçması sağlanır.

aR NA'nın Elüsyonu;

a- Her bir örneğin üzerine 50 µl, 50-60 °C ye ısıtılmış aRNA Elüsyon Solüsyonu ilave edilerek saflaştırılan aRNA Beadlerden uzaklaştırılır.

b- Tüpler 3 dakika çalkalanır. Beadların iyice dağılması sağlanır.

c- Tüpler manyetik taşıyıcı üzerine alınır ve beadlerin yakalanması sağlanır.

d- Yakalama işlemi tamamlandıktan sonra aRNA içeren süpernatant alınır ve temiz bir tüpe transfer edilir.

e- Elde edilen aRNA -20 °C de muhafaza edilir.

7. aRNA Fragmentasyon İşlemi

aRNA Fragmentasyon mix hazırlanır;

aRNA	15 µg (1-32 µl)
5X Array Fragmentasyon Buffer	8 µl
Nükleaz içermeyen su	değişken
Son hacim	40 µl

94 °C de 35 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra reaksiyon hemen buz üzerine alınır.

8. Hibridizasyon

1- Aşağıdaki hibridizasyon kokteyli hazırlanır.

Fragmente edilmiş cRNA	15 µg
Kontrol oligonükleotid B2(3 nM)	5 µl
20X Ökaryotik Hibridizasyon Kontrol	15 µl
Herring Sperm DNA(10 mg/mL)	3 µl
BSA (50 mg/mL)	3 µl
2X Hibridizasyon tamponu	150 µl
DMSO	30 µl
Rnase-içermeyen su	ile son hacim 300 µl'ye tamamlanır.

2- Çip kullanılmadan önce yarım saat oda ısısında tutulmalıdır.

3- Hazırlanan hibridizasyon kokteyli 99 ˚C'de 5 dakika inkübe edilir.

4- Bu inkübasyon sırasında çip içerisine 200 µl 1X Hibridizasyon tamponu doldurulur ve 10 dakika 45 ˚C'deki hibridizasyon fırını içerisinde 60 rpm'de inkübe edilir.

5- Hibridizasyon kokteyli 5 dakikalık inkübasyondan sonra 5 dakika süresince 45 ˚C'de inkübasyona konur.

6- İnkübasyondan sonra hibridizasyon kokteyli 5 dakika maksimum hızda santrifüj edilir.

7- Çip içerisindeki tampon çıkarılır ve içerisine hazırlanan hibridizasyon kokteylinden 200 µl doldurulur.

8- Çip hibridizasyon fırınına konur ve 45 ˚C'de 60 rpm de 18 saat hibridize edilir.

Hibridizasyon bittikten sonra çipin yıkama, boyama ve tarama işlemine geçilir.

9. Yıkama, boyama, tarama

1- Üç adet amber renkli tüp alınarak sırasıyla 1,2 ve 3 olarak işaretlenir.

2- Birinci tüpün içerisine;

2X Stain Tamponu	600 µl
50 mg/mL BSA	48 µl
1 mg/mL SAPE	12 µl
Rnase-içermeyen su	540 µl

konur ve iyice karıştırılır.

3- Birinci tüpten 600 µl alınarak üçüncü tüp içerisine konur. Böylece birinci ve üçüncü tüpler SAPE solüsyon tüpleri olur.

4- İkinci tüp ise aşağıdaki şekilde hazırlanır;

2X Stain tamponu	300 µl
50 mg/mL BSA	24 µl
10 mg/mL Goat IgG Stok	6 µl
0,5 mg/mL Biotin Antibody	3,6 µl
Rnase-içermeyen su	266,4 µl

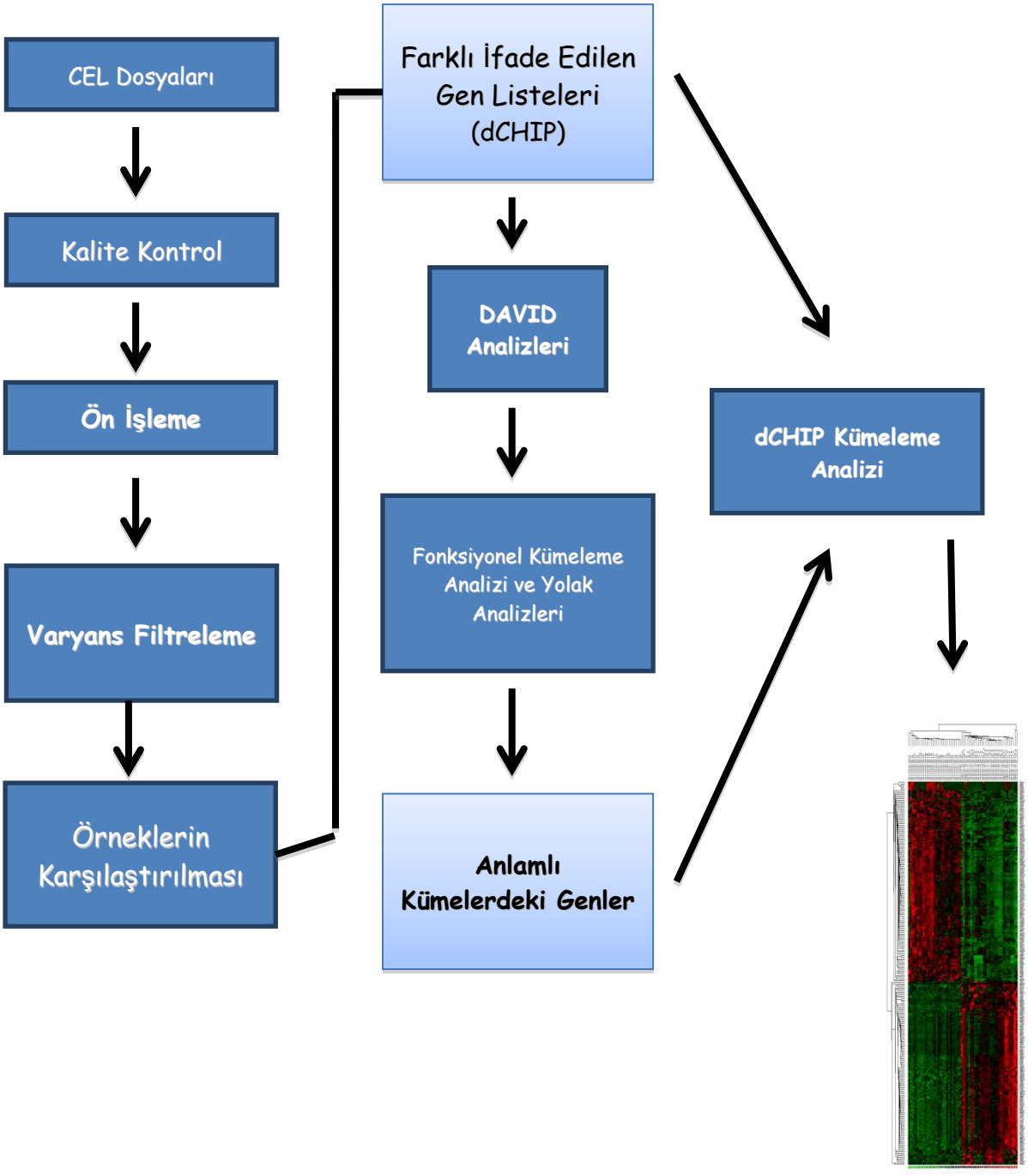
5- Hazırlanan ikinci tüpte karıştırılır ve santrifüj edilir.

6- Hazırlanan bu yıkama solüsyonları yıkama istasyonuna yerleştirilerek çipin yıkama işlemi yapılır.

7- Yıkama işlemi yapıldıktan sonra da çip tarayıcıda taranır.

8- Tarama işlemi bittikten sonra, elde edilen ham veri command console tarafından işlenir ve CEL dosyası oluşturulur. Elde edilen bu dosya biyoinformatik araçlar yardımı ile analiz edilir.

v. Biyoinformatik Analizler



Şekil 4.2. Biyoinformatik analiz akış şeması.

vi. Aday Genlerin QRT-PCR ile Validasyonu

a- Biyoinformatik analizler sonucunda belirlenen genlerin gruplar arasındaki ifade farklılık düzeyleri kantitatif real time pcr ile valide edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, herbir gruptan 12 örnek seçilmiş ve belirlenen RNA örneklerinin konsantrasyonları Nanodrop (Thermo Scientific, USA) ile ölçüldü. RNA örneklerinin konsantrasyonları 11 µl hacim içerisinde 1000 ng olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra bu RNA örneklerinden First Strand cDNA sentez kiti (Roche Applied Science, CAT No: 04897030001) kullanılarak üretici firmanın önerdiği aşağıdaki protokole göre cDNA sentezi yapıldı.

1- Aşağıdaki mix hazırlandı.

RNA (1000 ng)	11 µl
Random Hexamer	2 µl

2- Hazırlanan mix 65 °C'de 10 dk inkübe edilir.

3- İnkübasyondan sonra herbir örnek üzerine sırasıyla aşagıdakiler ilave edilir.

dNTP (10 mM)	2 µl
RT Enzim	0,5 µl
RNase İnhibitör	0,5 µl
5X Buffer	4 µl

4- Bu karışım eklendikten sonra herbir örneğin son hacmi 20 µl olur.

5- Hazırlanan bu karışıma aşağıdaki Thermal Cycler programı uygulanır.

25°C	10 dk
55°C	30 dk
85°C	5 dk

6- İnkübasyondan sonra herbir örnek üzerine 80 µl RNase free su ilave edilerek dilüe edilir. Son hacim 100 µl olur.

7- Elde edilen cDNA örnekleri - 80 °C'de muhafaza edilir.

b- Primerlerin Optimizasyonu

Sentezlenen primerler Tm derecelerine göre 3 farklı sıcaklıkta (55°C -60°C -65°C) ve 3 farklı master mixde optimize edildi. Kullanılan master mixler aşağıda verilmiştir.

1.Mix	
SYBR Green	5 µl
Forward Primer (5 pmol)	0,1 µl
Reverse Primer (5pmol)	0,1 µl
cDNA	2 µl
ddH_2O	2,8 µl
Toplam	10 µl

2. Mix	
SYBR Green	5 µl
Forward Primer (5 pmol)	0,6 µl
Reverse Primer (5pmol)	0,6 µl
cDNA	2 µl
ddH_2O	1,8 µl
Toplam	10 µl

3. Mix

SYBR Green	5 µl
Forward Primer (5 pmol)	1 µl
Reverse Primer (5pmol)	1 µl
cDNA	2 µl
ddH_2O	1 µl
Toplam	10 µl

c- Örneklerin Kantitatif QRT-PCR ile İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Hazırlanan cDNA örnekleri Roche Light Cycler 384 well platelere (Roche Applied Science, CAT No: 04729749001) transfer edildi. Herbir örnek üçlü tekrar ile çalışıldı. Aşağıdaki plate şemasında örneklerin yerleşimi görülmektedir.

P	O	N	M	L	K	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A	
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C 10	C 11	C 12	T1	T2	T3	T4	**1**
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C 10	C 11	C 12	T1	T2	T3	T4	**2**
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C 10	C 11	C 12	T1	T2	T3	T4	**3**
T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	KT1	KT2	KT3	KT4	KT5	KT6	KT7	KT8	**4**
T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	KT1	KT2	KT3	KT4	KT5	KT6	KT7	KT8	**5**
T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	KT1	KT2	KT3	KT4	KT5	KT6	KT7	KT8	**6**
KT9	KT10	KT11	KT12	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	**7**
KT9	KT10	KT11	KT12	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	**8**
KT9	KT10	KT11	KT12	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	**9**
D1	**D2**	**D3**	**D4**	**D5**												**10**
D1	**D2**	**D3**	**D4**	**D5**									**NTC**	**NTC**	**NTC**	**11**
																12
																13
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C 10	C 11	C 12	T1	T2	T3	T4	**14**
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C 10	C 11	C 12	T1	T2	T3	T4	**15**
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C 10	C 11	C 12	T1	T2	T3	T4	**16**
T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	KT1	KT2	KT3	KT4	KT5	KT6	KT7	KT8	**17**
T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	KT1	KT2	KT3	KT4	KT5	KT6	KT7	KT8	**18**
T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	KT1	KT2	KT3	KT4	KT5	KT6	KT7	KT8	**19**
KT9	KT10	KT11	KT12	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	**20**
KT9	KT10	KT11	KT12	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	**21**
KT9	KT10	KT11	KT12	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	**22**
D1	**D2**	**D3**	**D4**	**D5**												**23**
D1	**D2**	**D3**	**D4**	**D5**									**NTC**	**NTC**	**NTC**	**24**

cDNA örnekleri platelere tranfer edildikten sonra herbir primer çifti için optimize olduğu master mix ve sıcaklıkta PCR reaksiyonu kuruldu. Hazırlanan maste mix plate içerisinde bulunan 2 µl cDNA örneği üzerine ilave edildi. Hazırlanan plate

seal ile kapatıldıktan sonra Roche Light Cycler 480 Real-Time PCR cihazına (Roche Applied Science) konur. Thermal cycler programı olarak aşağıdaki sıcaklıklar uygulanır.

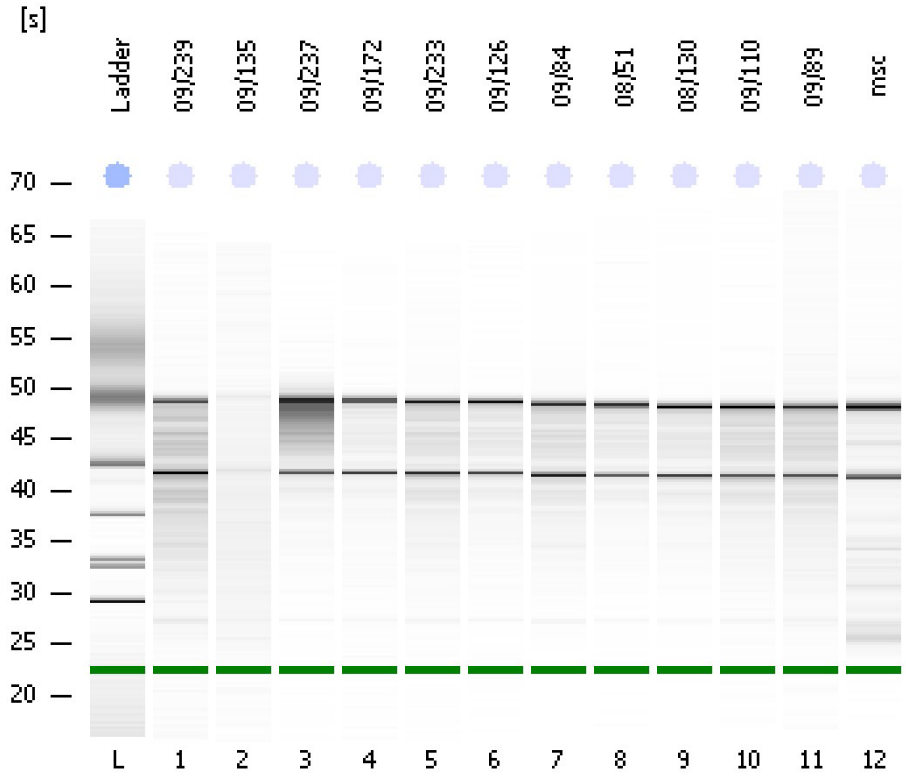
95 °C	10 dk	
95 °C	15 sn	40 Siklus
60 °C	30 sn	
72 °C	30 sn	
4 °C	Beklet	

Reaksiyon tamamlandıktan sonra cihazın algoritması tarafından Absolute Quantification ve Melting Curve analizleri yapılarak sonular değerlendirilir.

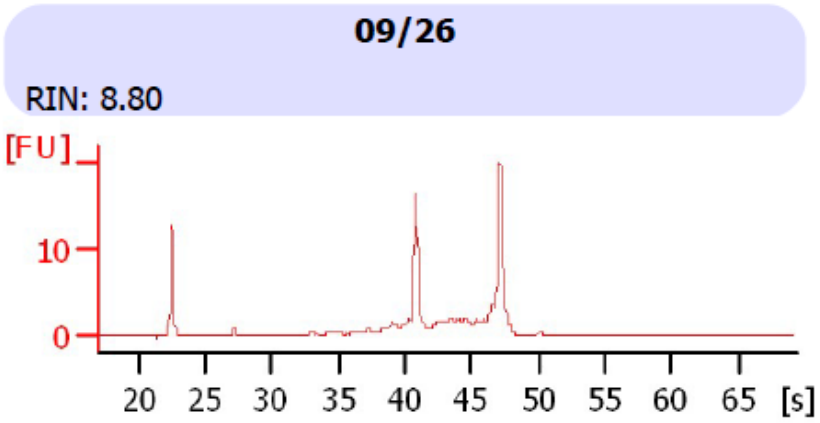
V. ARAŞTIRMA BULGULARI

a. İzole Edilen RNA'ların Kalite ve Miktar Tayini

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlük tayinleri Agilent Bioanalyzer (Agilent) cihazında RNA 6000 Nano Kit ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda örneklerin daha sonraki prosedürlerde kullanılacak kalitede oldukları tespit edilmiştir. Kullanılan birkaç örnek için biyoanalizör cihazından alınan sanal jel görüntüsü ve elektroferogram görüntüsü Şekil 5.1 ve Şekil 5.2'de gösterilmiştir. İzole edilen RNA örneklerinin miktar tayinleri de yapılmıştır. Çizelge 5.1'de birkaç örnek için elde edilen değerler gösterilmiştir.



Şekil 5.1. Biyoanalizör cihazında yürütülen 09/26 nolu RNA örneğinin temsili sanal jel görüntüsü.



Şekil 5.2. Biyoanalizör cihazında yürütülen 09/26 nolu RNA örneğinin temsili elektroferogram görüntüsü.

Çizelge 5.1. İzole edilen RNA'ların temsili spektrofotometrik okumaları.

Örnek Kodu	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
08-07	132.71	3.318	1.565	2.12	1.76
08-09	60.41	1.51	0.72	2.11	0.98
08-03	109.93	2.748	1.321	2.08	1.88
08/01	72.23	1.806	0.873	2.07	1
08/02	63.01	1.575	0.744	2.12	1.46
08/12	69.65	1.741	0.833	2.09	1.39

b. aRNA Sentezi

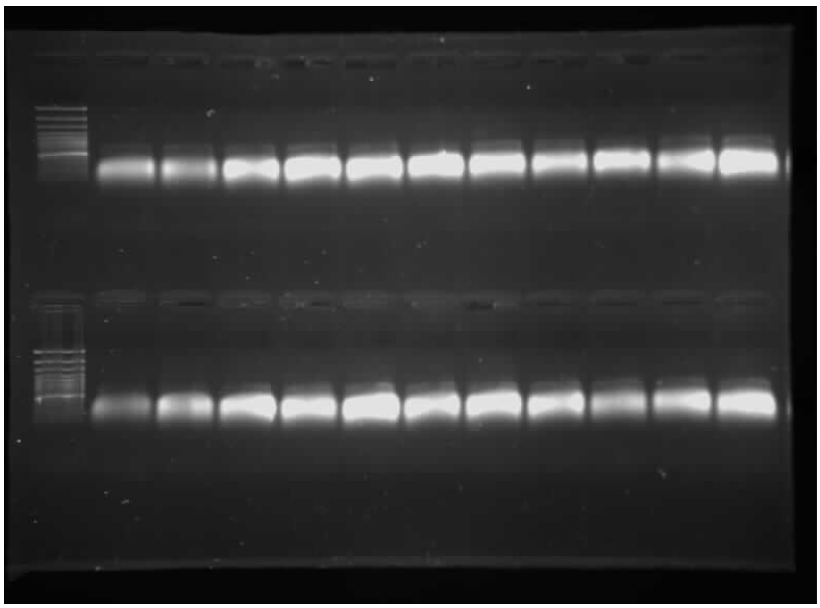
İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve kalite tayinleri yapıldıktan sonra uygun olan örneklerden aRNA sentezlenir. Bu aşamada GeneChip 3' IVT Expres Kit (Affymetrix) kullanılır. Üreticinin önerdiği protocol doğrultusunda RNA örnekleri amplifiye edilir ve işaretlenir. Bu işlem tamamlandıktan sonra elde edilen aRNA örneklerinin konsantrasyonları belirlenir. Çizelge 5.2'de birkaç örnek için elde edilen konsantrasyon değerleri verilmiştir.

Çizelge 5.2. Elde edilen aRNA'ların temsili spektrofotometrik okumaları.

Örnek Kodu	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
09/201	741.98	18.549	8.977	2.07	2.29
09/134	506.77	12.669	6.167	2.05	2.29
09/230	690.51	17.263	8.311	2.08	2.32
09/203	493.15	12.329	6.011	2.05	2.31
09/78-2	838.73	20.968	10.232	2.05	2.18
09/136	731.09	18.277	8.988	2.03	0.93
09/200	724.71	18.118	8.822	2.05	2.19

c. aRNA'ların Fragmentasyonu

Amplifiye edilen ve biyotin ile işaretlenen aRNA örnekleri çiplere hybridize edilmek için çok uzundur. Hibridizasyonun gerçekleşebilmesi için bu RNA örneklerinin fragmentlere ayrılması gerekir. Bu işlem non-enzimatik olarak metal iyonu indüksiyonu ile gerçekleştirilir. Sonuç olarak tüm aRNA örnekleri 35-200 bç uzunluğunda parçalara ayrılmış olurlar. Bu işlemden sonra RNA örnekleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek fragmentlerin boyları kontrol edilir. Şekil 5.3'de fragmente edilen aRNA örneklerinin % 1'lik agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 5.3. Fragmente edilen RNA örneklerinin % 1'lik agaroz jeldeki temsili görüntüsü.

d. Hibridizayon Sonuçları

HGU-133 Plus 2.0 çiplerine hibridize edilen va daha sonra yıkama boyama işlemlerinden geçirilip tarayıcıda taranan çiplerin ilk analizi Expression Console programında yapılır. Bu program herbir çip için bir rapor oluşturur. Bu raporda elde edilen % Number Present (NP) değerine göre çiplerin daha sonraki biyoinformatik analizler için uygun olup olmadığı değerlendirilir. İnsan dokuları ile yapılan çalışmalarda bu değerin % 30'dan yüksek olması gerekmektedir. Bizim çalışmamızda NP değerleri % 30 ile % 40 arası olan çipler ileri analizler için uygun kabul edilmiştir. Ek-3'de sunulan çizelgelerde her bir gruptaki örnekler için hesaplanan % NP değerleri verilmiştir.

e. Biyoinformatik Analiz Bulguları 1 (dCHIP)

Örneklerin taranmasından sonra ilk analizleri ve ham verinin oluşturulma işlemleri cihazın yazılımında gerçekleştirilmiş ve her bir örnek için bir rapor elde edilmiştir. Bu raporun sonucuna göre % NP değerleri % 30'un üzerinde olan örnekler biyoinformatik analizler için uygun bulunmuş ve ileri analizlere tabi tutulmuştur.

Bu aşamadaki analizler dCHIP program vasıtası ile gerçekleştirilmiştir. Örneklerin CEL dosyaları dCHIP programına yüklenmiş ve ilk olarak ön işleme analizleri yapılmıştır. Daha sonra örneklere varyans filtreleme uygulanmış ve sonrasında farklı ifade edilen genleri belirlemek amacıyla örnek grupları ikili olarak karşılaştırılmıştır. Bu işlem sonucunda herbir ikili grup arasında ifade düzeyleri farklılık gösteren genler belirlenmiştir. Çizelge 5.7'de bu şekilde elde edilen listenin bir kısmı örnek olarak verilmiştir. Elde edilen listelerin tamamı Ek:1'de ayrıntılı olarak verilmektedir.

Çizelge 5.7. dCHIP ile elde edilen farklı ifade edilen gen listesinin bir kısmı.

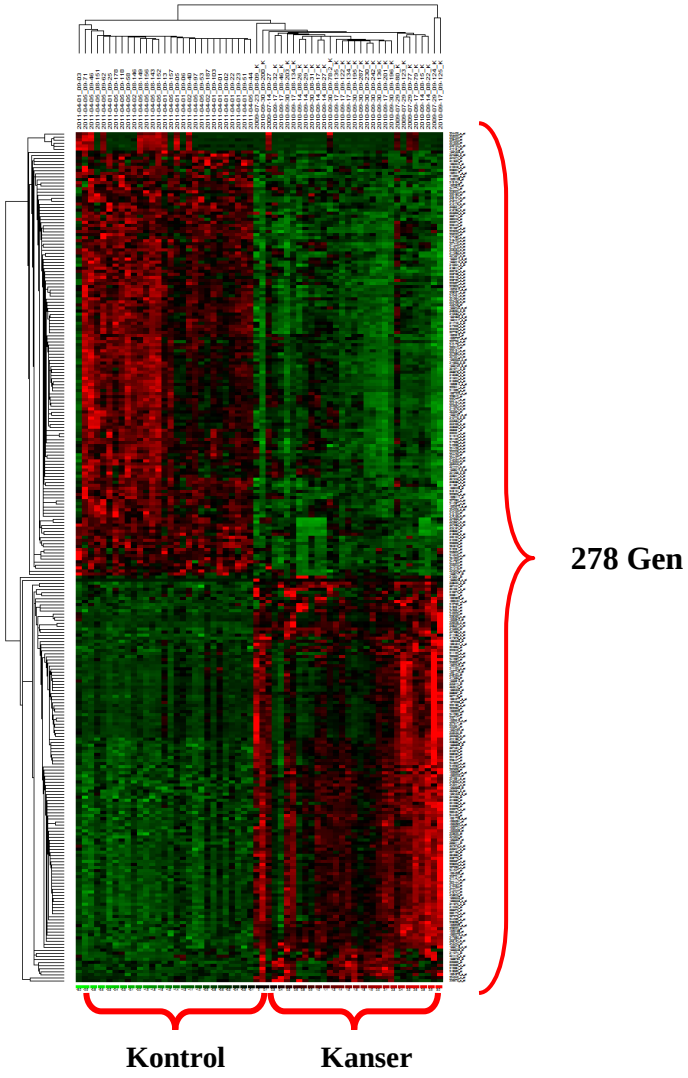
Probe ID	Referans Ortalama	Deney Oratalama	Kat Değişimi	t istatistik	p değeri
1558048_x_at	64.28	495.77	7.71	2.268	0.030937
221419_s_at	226.28	559.52	2.47	4.672	0.000028
220561_at	95.44	219.81	2.3	3.421	0.0016
213350_at	271.88	613.38	2.26	5.9	0.000001
226811_at	1043.5	2295	2.2	3.552	0.00101
232610_at	132.26	290.31	2.2	3.343	0.002144
228527_s_at	110.43	239.23	2.17	5.693	0.000003
207166_at	34.79	73.41	2.11	8.604	0
1562240_at	51.34	107.94	2.1	4.913	0.000021
1570033_at	46.96	98.35	2.09	3.144	0.003244
230698_at	31.05	64.44	2.08	6.052	0
228269_x_at	128.56	265.89	2.07	3.456	0.001537
217878_s_at	228.38	470.02	2.06	5.246	0.000003

Her bir ikili karşılaştırma sonucunda bu şekilde listeler elde edilmiştir. Her bir listede bulunan farklı ifade edilen gen sayıları çizelge 5.8'de verilmiştir.

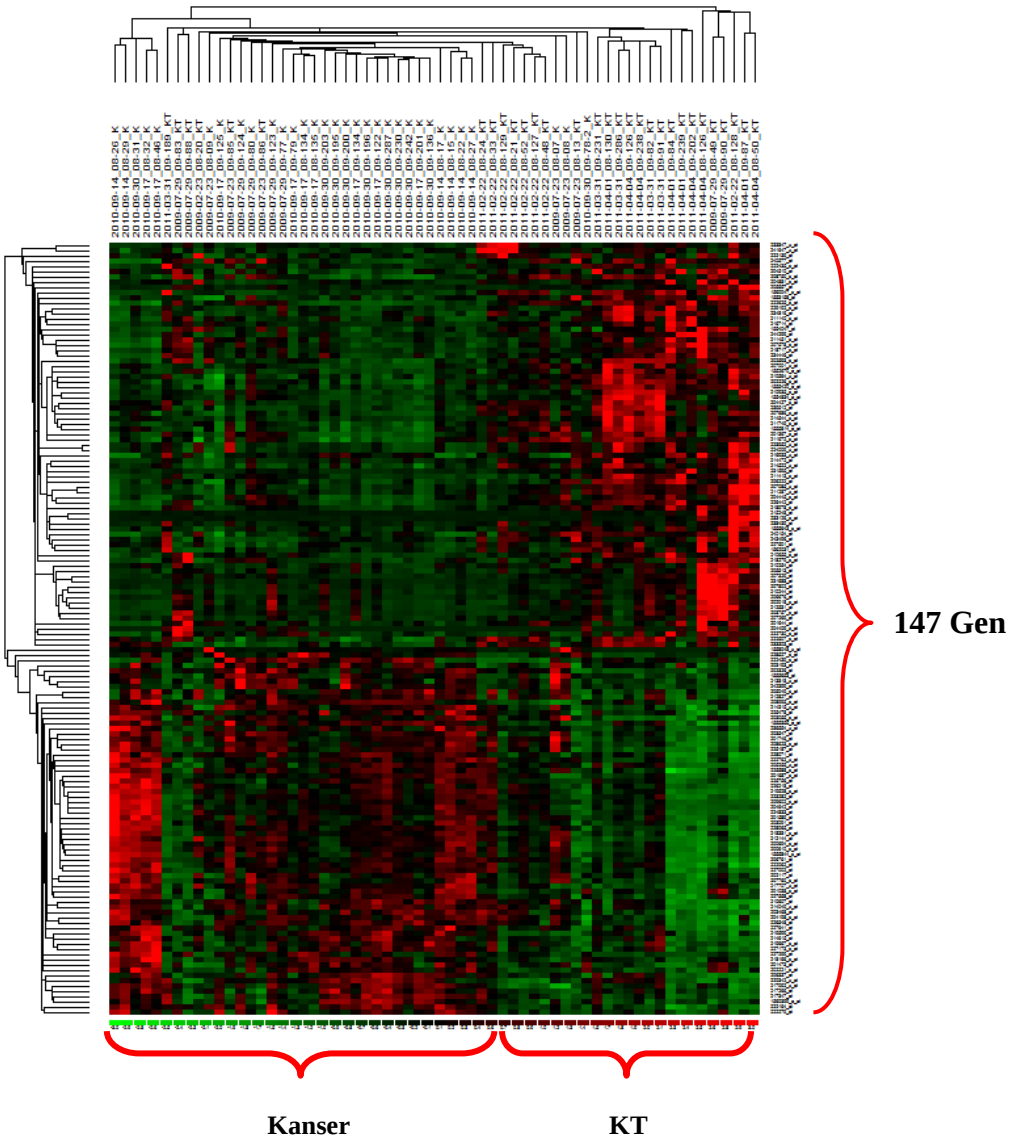
Çizelge 5.8. Karşılaştırılan gruplar arasında farklı ifade edilen gen sayıları.

	Toplam Sayı	Artan	Azalan
Kanser vs. Kontrol	278	133	145
Kanser vs. Tromboz	98	35	63
KT vs. Kontrol	217	168	49
Tromboz vs. KT	122	115	7
Tromboz vs. Kontrol	331	139	192
Kanser vs. KT	147	77	70

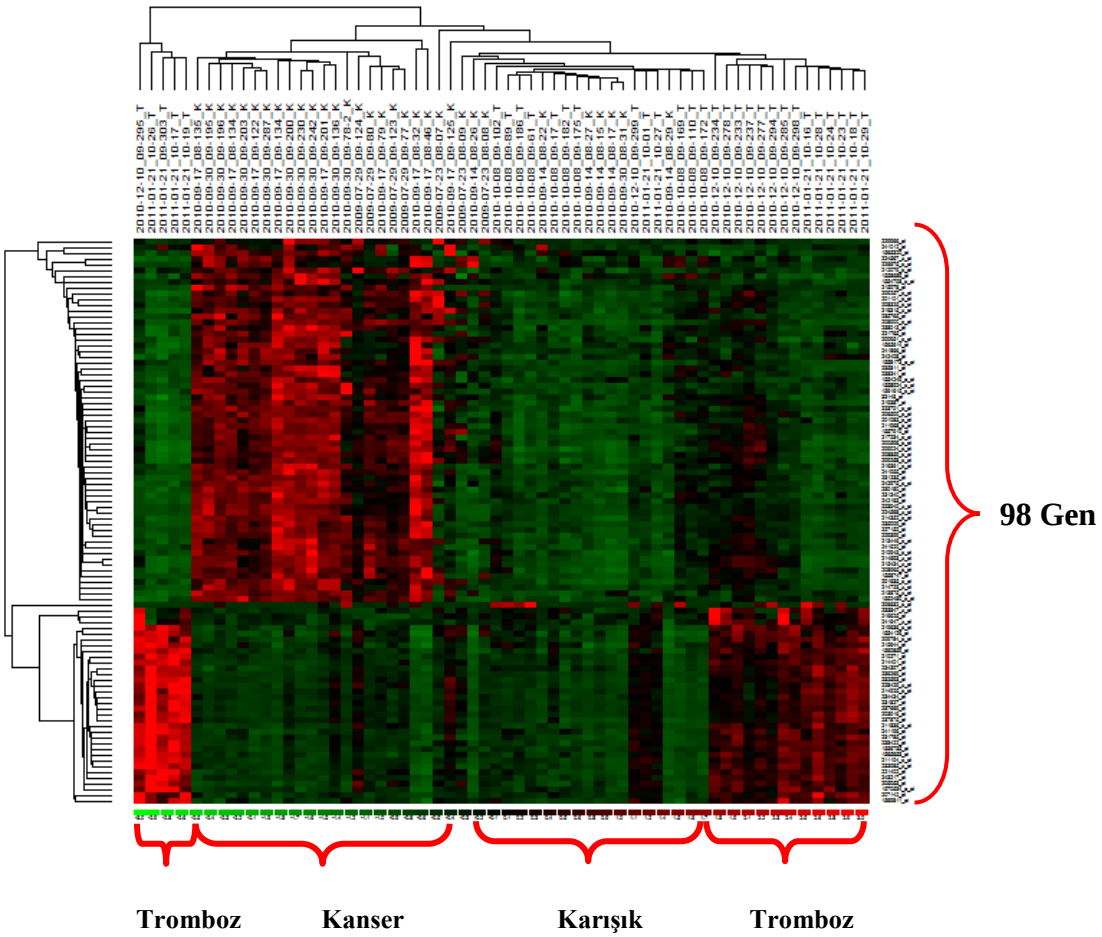
Daha sonra elde edilen bu gen listeleri kullanılarak yine dCHIP programı ile kontrolsüz kümeleme analizi (Unsupervised Hierarchical Cluster Analysis) yapılmıştır. Bu analizler sonucu elde edilen heat maplar aşağıda gösterilmektedir.



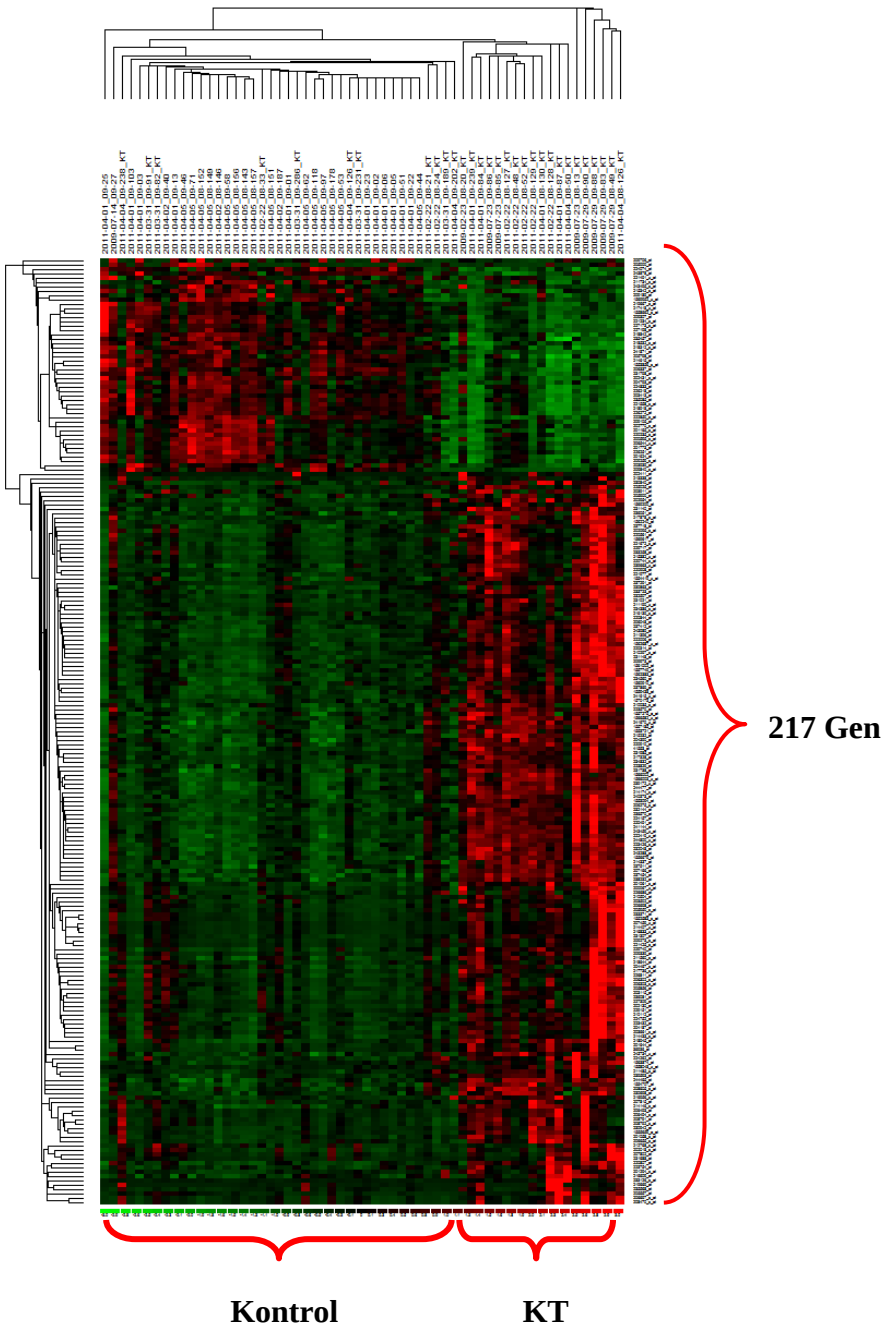
Şekil 5.4. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Kanser ve Kontrol grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu.



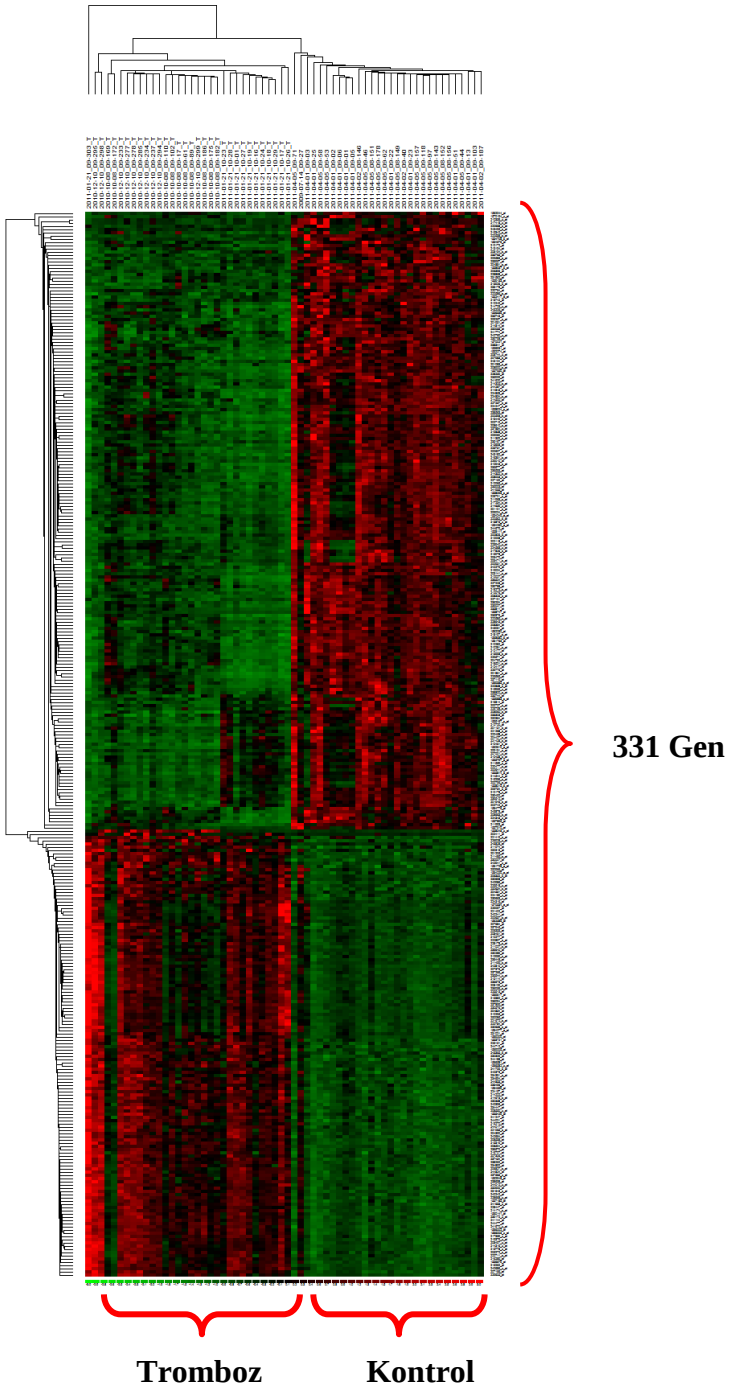
Şekil 5.5. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Kanser ve Kanser + Tromboz grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu.



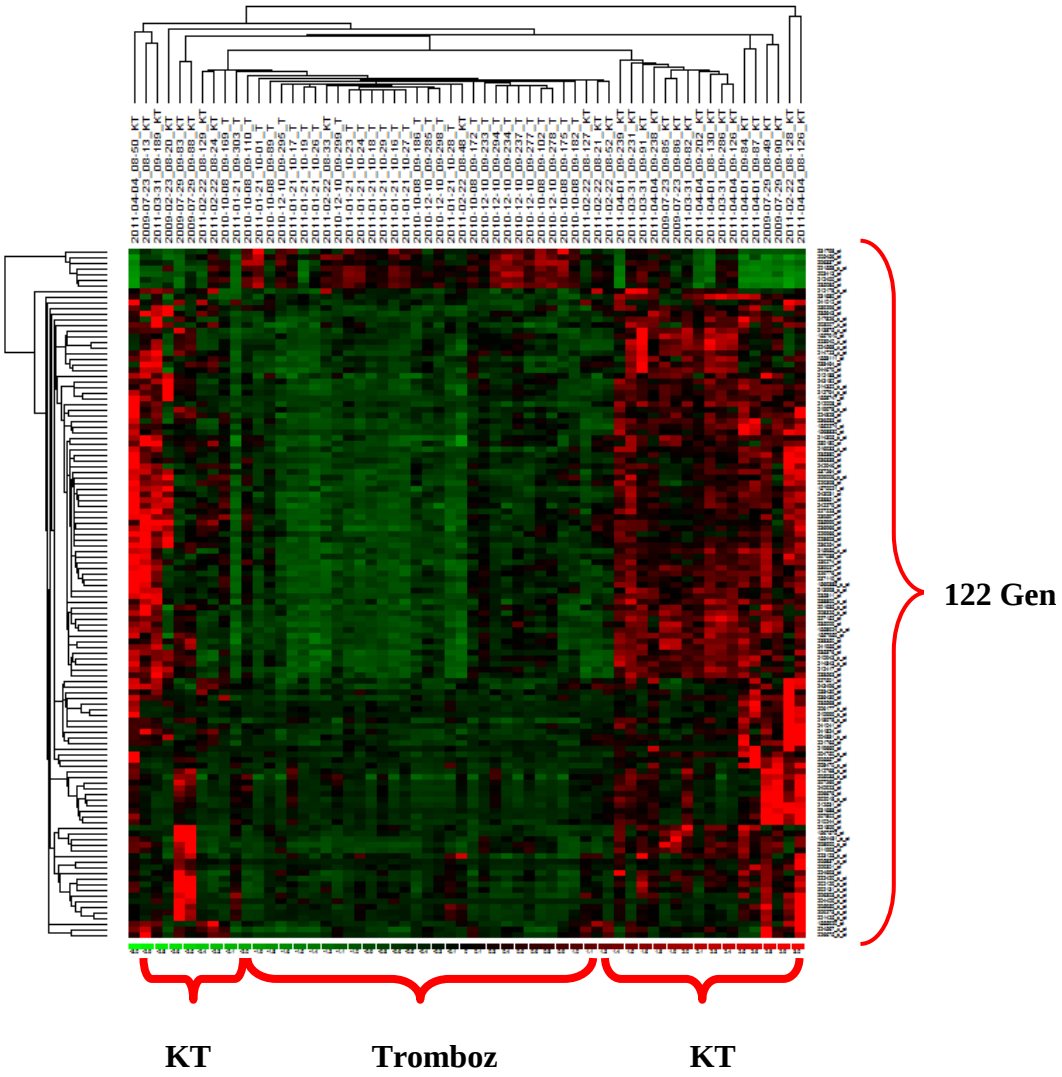
Şekil 5.6. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Kanser ve Tromboz grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu.



Şekil 5.7. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Kanser + Tromboz ve Kontrol grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu.



Şekil 5.8. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Tromboz ve Kontrol grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu.



Şekil 5.9. dCHIP'den elde edilen, farklı ifade edilen gen listesi kullanılarak Kanser + Tromboz ve Tromboz grubu örneklerinin hiyerarşik kümeleme analiz sonucu.

f. Biyoinformatik Analiz Bulguları 2 (DAVID)

Elde edilen gen listeleri daha sonra veri madenciliği olarak da tabir edilen ikinci basamak biyoinformatik analizlere tabi tutulmuştur. Bu aşamadaki analizler DAVID programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. dCHIP'den elde edilen gen listeleri DAVID programına yüklenmiştir. DAVID bu gen listelerini fonksiyonel olarak gruplandırıp benzer genleri aynı kümelerde toplamaktadır. Bu analiz sonucunda zenginleştirme skoruna göre sıralanmış bir dizi küme vermektedir.

Çizelge 5.9'da her bir ikili karşılaştırma grubu için elde edilen küme sayıları özetlenmiştir.

Çizelge 5.9. DAVID fonksiyonel kümeleme analizi sonucu elde edilen küme sayıları.

	Toplam Sayı	Artan	Azalan	Küme Sayısı
Kanser vs. Kontrol	278	133	145	70
Kanser vs. Tromboz	98	35	63	30
KT vs. Kontrol	217	168	49	51
Tromboz vs. KT	122	115	7	35
Tromboz vs. Kontrol	331	139	192	57
Kanser vs. KT	147	77	70	42

Literatürde DAVID'in kullanıldığı fonksiyonel analizlerde, bu kümelerden zenginleştirme skoru 1.3'den büyük olan kümeler anlamlı kabul edilmektedir. Yapılan analizlerde zenginleşme skoru 1.3'den büyük olan kümelerin yanında skoru küçük olan ancak araştırılan patoloji ile ilgili olarak önemli olabilecek kümeler ve içerdikleri genler de değerlendirilmiştir. Ayrıca bir genin birden fazla kümede bulunma durumu da değerlendirilerek DAVID analizleri sonucunda özet bir tablo oluşturulmuştur. Çizelge 5.10'da her bir ikili grup için elde edilen kümeler, bu kümelerden zenginleşme skoru 1.3'den büyük olanların sayısı ve bu kümelerde bulunan gen sayıları verilmiştir.

Çizelge 5.10. Fonksiyonel kümeleme analizi sonucunda elde edilen kümeler, bu kümelerin zenginleşme skorları ve bu kümelerdeki gen sayıları (ZS: Zenginleşme Skoru).

	Küme Sayısı	ZS>1.3	Gen Sayısı	ZS<1.3 ve önemli	Gen Sayısı
Kanser vs. Kontrol	70	9	55	10	85
Kanser vs. Tromboz	30	7	71	10	43
KT vs. Kontrol	51	3	64	15	45
Tromboz vs. KT	35	2	20	12	34
Tromboz vs. Kontrol	57	7	93	10	58
Kanser vs. KT	42	8	81	8	24

Aşağıdaki çizelgelerde ise DAVID analizleri sonucu oluşturulan özet tablolar verilmektedir.

Çizelge 5.11. Kanser ve Kontrol grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo.

	Affy ID	Gen	Kat Değişimi	Kümeler										KEGG	BIOCARTA
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1-	242240_at	PTK2	1.6	1,97		1,83	1,6							Pathways in Cancer, Leukocyte transendothelial migration, Axon guidance	CCR3 signalling in Eosinophils, Phospholipids as signalling intermediates, CXCR4 signalling pathway
2-	225408_at	MBP	-1.68	1,97		1,83	1,6								
3-	207782_s_at	Psen1	-1.69	1,97		1,83	1,6			1,42					Generation of amyloid b-peptide by PS1
4-	1555814_a_at	Rhoa	-2.71	1,97		1,83	1,6							Pathways in Cancer, Leukocyte transendothelial migration	CCR3 signalling in Eosinophils,
5-	1569073_x_at	SMARCA4	1.56	1,89	1,89					1,42					
6-	241982_at	TAF1	1.74		1,89										
7-	1555028_at	BRD3	1.63		1,89										
8-	204390_at	TRIM24	1.61		1,89										
9-	213194_at	ROBO1	-1.77			1,83	1,6							Axon guidance	
10-	208057_s_at	GLI2	-1.91				1,6							Pathways in Cancer	
11-	232144_at	PBX1	1.58				1,6			1,42	1,31		1,28		
12-	213998_s_at	DDX17	-1.87					1,5	1,43						
13-	207617_at	DDX3X	1.81					1,5	1,43						
14-	205000_at	DDX3Y	-2.86					1,5	1,43						
15-	212384_at	BAT1	1.68						1,43						
16-	210948_s_at	LEF1	-1.87							1,42				Pathways in Cancer	
17-	1558111_at	Mbnl1	-2.07							1,43					
18-	214895_s_at	ADAM10	-1.82								1,31				Generation of amyloid b-peptide by PS1
19-	1554417_s_at	aph1a	-1.62								1,31		1,28		
20-	223143_s_at	akirin2	-1.75									1,3			
21-	217489_s_at	IL6R	-1.67									1,3			
22-	1554375_a_at	Nr1h4	1.83									1,3			
23-	211661_x_at	PTAFR	-1.81									1,3			
24-	209189_at	FOS	-1.71									1,3		Pathways in Cancer	
25-	216252_x_at	Fas	-1.72										1,28	Pathways in Cancer	
26-	228269_x_at	kcnip3	2.07										1,28		
27-	1554834_a_at	rassf5	-1.99										1,28	Pathways in Cancer	
28-	207001_x_at	GRAMD4	-2.78										1,28		
29-	207686_s_at	CASP8	-1.6										1,28	Pathways in Cancer	
30-	211919_s_at	CXCR4	-2.17										1,28	Leukocyte transendothelial migration, Axon guidance	CXCR4 signalling pathway
31-	209201_x_at	CXCR4	-1.96										1,28	Axon guidance, Chemokine Signall	CXCR4 signalling pathway
32-	214992_s_at	DNASE2	-1.63										1,28		
33-	210321_at	GZMH	1.95										1,28		
34-	200806_s_at	HSPD1	-1.9										1,28		
35-	200796_s_at	mcl1	-1.95										1,28		
36-	211085_s_at	STK4	-1.7										1,28	Pathways in Cancer	
37-	221268_s_at	Sqpp1	-1.73										1,28		
38-	206222_at	TNFRSF10C	-1.79										1,28		
39-	1552610_a_at	Jak1	-1.87											Pathways in Cancer	
40-	211485_s_at	FGF18	1.67											Pathways in Cancer	
41-	203032_s_at	Fumarate Hydrotase	-1.68											Pathways in Cancer	
42-	208605_s_at	NTRK1	1.84											Pathways in Cancer	
43-	202226_s_at	crk	-1.62											Chemokine Signalling Pathway	CXCR4 signalling pathway
44-	208983_s_at	PECAM1	1.54											Leukocyte transendothelial migration	
45-	210461_s_at	ABLIM1	-2.09											Axon guidance	
46-	1555797_a_at	ARPC5	1.87											Fc gamma R-mediated phagocytosis	
47-	211672_s_at	ARPC4	1.59											Pathogenic Escherichia coli infection	
48-	200641_s_at	YWHAZ	-2.41											Pathogenic Escherichia coli infection	
49-	204006_s_at	Fcgr3a	-1.97											Fc gamma R-mediated phagocytosis	
50-	207166_at	GNGT1	2.11											Chemokine Signalling Pathway	CCR3 signalling in Eosinophils, CXCR4 sig. path.
51-	207419_s_at	rac2	-1.73											Pathways in Cancer	

Çizelge 5.12. Kanser ve Kanser + Tromboz grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo.

Affy ID	Gen	Kat Değişimi	Kümeler									KEGG	BIOCARTA
			1	2	3	4	5	6	7	8	9		
219528_s_at	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)	-1.64	**2,91**			**1,59**				**1,41**			
219667_s_at	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	-1.69	**2,91**										
203547_at	CD4 molecule	-1.93	**2,91**		**1,84**							Hematopoietic cell lineage,Primary immunodeficiency	
214049_x_at	CD7 molecule	-1.54	**2,91**									Hematopoietic cell lineage	
205049_s_at	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	-1.77	**2,91**	**2,72**							**1,26**	Primary immunodeficiency	
216933_x_at	adenomatous polyposis coli	1.56	**2,91**	**2,72**		**1,59**			**1,43**	**1,41**		Pathways in cancer Hematopoietic cell lineage Endometrial cancer Wnt signaling pathway Pathogenic Escherichia coli infection Regulation of actin cytoskeleton	
210607_at	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	-1.57	**2,91**	**2,72**								Pathways in cancer Hematopoietic cell lineage	
226218_at	interleukin 7 receptor	-1.71	**2,91**	**2,72**							**1,26**	Hematopoietic cell lineage, Primary immunodeficiency	
201746_at	tumor protein p53	-1.62	**2,91**	**2,72**	**1,84**	**1,59**			**1,43**	**1,41**	**1,26**	Pathways in cancer Endometrial cancer Wnt signaling pathway Apoptosis Prostate cancer	
1562031_at	Janus kinase 2	1.63		**2,72**	**1,84**	**1,59**			**1,43**			Chemokine signaling pathway	
207686_s_at	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	1.48		**2,72**	**1,84**	**1,59**		**1,57**	**1,43**			Pathways in cancer, Apoptosis	
210607_at	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	-1.57	**2,91**	**2,72**								Pathways in cancer Hematopoietic cell lineage	
200694_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24	-1.72			**1,84**								
202221_s_at	E1A binding protein p300	-1.58			**1,84**							Pathways in cancer, Wnt signaling pathway, Adherens junction, Prostate cancer	
220342_x_at	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3	-1.52			**1,84**								
225187_at	KIAA1967	-1.6			**1,84**								
217707_x_at	k associated, actin dependent regulator of chromatin	-1.62			**1,84**								
240154_at	WAS/WASL interacting protein family, member 1	1.52			**1,84**								
204445_s_at	arachidonate 5-lipoxygenase	1.6			**1,84**								
214315_x_at	calreticulin	-1.5			**1,84**	**1,59**							
204510_at	cell division cycle 7 homolog (S. cerevisiae)	1.57			**1,84**								
203091_at	far upstream element (FUSE) binding protein 1	-1.8			**1,84**								
1555653_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	-1.63			**1,84**		**1,58**						
1555844_s_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	-1.57			**1,84**		**1,58**						
201473_at	jun B proto-oncogene	-1.58			**1,84**								
207760_s_at	nuclear receptor co-repressor 2	-1.5			**1,84**								
200610_s_at	nucleolin	-1.6			**1,84**		**1,58**					Pathogenic Escherichia coli infection	
208995_s_at	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)	-1.61			**1,84**								
239512_at	splicing factor, arginine/serine-rich 4	1.63			**1,84**		**1,58**						
223282_at	teashirt zinc finger homeobox 1	-1.61			**1,84**								
222439_s_at	thyroid hormone receptor associated protein 3	-1.69			**1,84**								
201687_s_at	API5-like 1; apoptosis inhibitor 5	-1.58				**1,59**				**1,41**			
210564_x_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	1.5				**1,59**		**1,57**	**1,43**	**1,41**		Apoptosis	
211140_s_at	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	1.68				**1,59**		**1,57**	**1,43**	**1,41**			
227558_at	hromobox homolog 4 (Pc class homolog, Drosophila	-1.46				**1,59**				**1,41**			
210655_s_at	forkhead box O3; forkhead box O3B pseudogene	1.64				**1,59**			**1,43**			Endometrial cancer, Chemokine signaling pathway	
1555814_a_at	ras homolog gene family, member A	1.59				**1,59**				**1,41**		Pathways in cancer, Wnt signaling pathway, Pathogenic Escherichia coli infection, Regulation of actin cytoskeleton, Adherens junction, Chemokine signaling pathway	Rho Cell Motility Sig.
204198_s_at	runt-related transcription factor 3	-1.53				**1,59**			**1,43**				
24833_at, 1555355_a_	erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (a	-1.92				**1,59**			**1,43**				
218381_s_at	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2	-1.69					**1,58**						
219599_at	translation initiation factor 4H; eukaryotic translatio	-1.61					**1,58**						
239512_at	splicing factor, arginine/serine-rich 4	1.63					**1,58**						

Çizelge 5.13. Kanser ve Tromboz grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo.

Affy ID	Gen	Kat Değişimi	Kümeler							KEGG	BIOCARTA
			1	2	3	4	5	6	7		
216361_s_at	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3	-1.9	**2,99**	**2,34**							
208965_s_at	interferon, gamma-inducible protein 16	-1.87	**2,99**	**2,34**			**2**				
209784_s_at	jagged 2	1.92	**2,99**				**2**				
212079_s_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	-1.79	**2,99**	**2,34**		**2,2**					
214401_at	paired box 1	2.16	**2,99**								
1552480_s_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	1.92	**2,99**				**2**				
215078_at	superoxide dismutase 2, mitochondrial	2.09	**2,99**	**2,34**			**2**				
213446_s_at	IQ motif containing GTPase activating protein 1	-2.17		**2,34**						Regulation of actin cytoskeleton	
201635_s_at	fragile X mental retardation, autosomal homolog 1	-1.87		**2,34**							
200598_s_at	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	-2.13		**2,34**	**2,31**	**2,2**	**2**	**1,9**		Prostate cancer, NOD-like receptor signaling pathway, Pathways in cancer	
231827_at	minichromosome maintenance complex component 8	2.64		**2,34**		**2,2**		**1,9**			
212079_s_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	-1.79		**2,34**		**2,2**					
205053_at	primase, DNA, polypeptide 1 (49kDa)	1.86		**2,34**							
209257_s_at, 209258_s_at	structural maintenance of chromosomes 3	-1.84		**2,34**		**2,2**		**1,9**			
209024_s_at	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	-1.89		**2,34**							
242163_at	thyroid hormone receptor associated protein 3	-2.03		**2,34**		**2,2**		**1,9**			
208900_s_at	topoisomerase (DNA) I	-2.92		**2,34**		**2,2**		**1,9**			
33148_at	zinc finger RNA binding protein	-1.76		**2,34**							
1554249_a_at	zinc finger protein 638	-1.85		**2,34**							
211968_s_at	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 2; heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	-2.17			**2,31**	**2,2**		**1,9**		Prostate cancer NOD-like receptor signaling pathway Pathways in cancer	Corticosteroids and cardioprotection
1557910_at	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	-2.22			**2,31**	**2,2**		**1,9**		Prostate cancer NOD-like receptor signaling pathway Pathways in cancer	
230180_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	-2.28				**2,2**		**1,9**			
242975_s_at	GNAS complex locus	-2.32				**2,2**					Cystic fibrosis transmembrane
208859_s_at	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)	-2.33				**2,2**		**1,9**			
1560859_at	fibroblast growth factor receptor 2	-2.39				**2,2**		**1,9**		Regulation of actin cytoskeleton Pathways in cancer	
228429_x_at	kinesin family member 9	-2.39				**2,2**		**1,9**			
211104_s_at	myosin VIIA	2.49				**2,2**		**1,9**			
237875_at	serine/threonine kinase 10	2.11				**2,2**		**1,9**			
216625_at	similar to Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1; Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	2.29				**2,2**	**2**	**1,9**			
241620_at, 1558747_at	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	-2.47				**2,2**		**1,9**			
214352_s_at	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	-2.61				**2,2**	**2**			Regulation of actin cytoskeleton Pathways in cancer	
208325_s_at	A kinase (PRKA) anchor protein 13	-2.64					**2**				
210943_s_at	lysosomal trafficking regulator	-2.72					**2**				
201101_s_at, 201083_s_at	similar to Bcl-2-associated transcription factor 1 (Btf); BCL2-associated transcription factor 1	-2.79					**2**				
217234_s_at	hypothetical protein LOC100129652; ezrin	-2.92							**1,43**	Regulation of actin cytoskeleton	Cystic fibrosis transmembrane
233985_x_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	-3							**1,43**		
214925_s_at	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	-3.19							**1,43**		

Çizelge 5.14. Kanser + Tromboz ve Kontrol grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo.

Affy ID	Gen	Kat Değişimi	Kümeler			KEGG	BIOCARTA
			1	2	3		
203939_at	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	-1.77	**1,49**				
226686_at	CDGSH iron sulfur domain 2	1.83	**1,49**				
220910_at	Fraser syndrome 1	1.62	**1,49**				
210504_at	Kruppel-like factor 1 (erythroid)	2.04	**1,49**				
203413_at	NEL-like 2 (chicken)	-1.91	**1,49**				
214174_s_at	PDZ and LIM domain 4	1.58	**1,49**				
243288_at	SET and MYND domain containing 2	1.6	**1,49**				
227309_at	YOD1 OTU deubiquinating enzyme 1 homolog (S. cerevisiae)	2.1	**1,49**				
201773_at	activity-dependent neuroprotector homeobox	-1.82	**1,49**				
226251_at	additional sex combs like 2 (Drosophila)	-1.72	**1,49**				
237511_at	adenosine deaminase, tRNA-specific 2, TAD2 homolog (S. cerevisiae)	1.63	**1,49**				
234832_at	anthrax toxin receptor 1	1.8	**1,49**				
202095_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 5	1.85	**1,49**			Pathways in cancer Colorectal cancer	
241871_at	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	-1.97	**1,49**				
230698_at	calneuron 1	1.78	**1,49**				
205950_s_at	carbonic anhydrase I	3.71	**1,49**				
214337_at	coatomer protein complex, subunit alpha	1.64	**1,49**	**1,4**			
217736_s_at	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1	1.75	**1,49**				
203115_at	ferrochelatase (protoporphyria)	2.18	**1,49**				
243878_at	forkhead box P1	-1.82	**1,49**				
204187_at	guanosine monophosphate reductase	1.83	**1,49**				
220807_at	hemoglobin, theta 1	1.83	**1,49**				
206494_s_at, 21695	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)	2.95-2.52	**1,49**	**1,4**			
221425_s_at, 20927	iron-sulfur cluster assembly 1 homolog (S. cerevisiae)	2.61-2.86	**1,49**				
202018_s_at	lactotransferrin	2.1	**1,49**		**1,39**		
222006_at	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	1.65	**1,49**				
230863_at	low density lipoprotein-related protein 2	1.79	**1,49**	**1,4**			
218918_at	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	-1.72	**1,49**				
231688_at	matrix metallopeptidase 8 (neutrophil collagenase)	3.76	**1,49**				
206275_s_at	microtubule associated monoxygenase, calponin and LIM domain containing 2	1.7	**1,49**				
231985_at	microtubule associated monoxygenase, calponin and LIM domain containing 3	1.64	**1,49**				
223570_at	minichromosome maintenance complex component 10	1.77	**1,49**				
201058_s_at	myosin, light chain 9, regulatory	2.31	**1,49**				
206302_s_at, 20630	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4; nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 pseudogene 1	2.42	**1,49**				
206048_at	ovo-like 2 (Drosophila)	1.85	**1,49**				
231738_at	protocadherin beta 7	1.69	**1,49**				
1553721_at	ring finger protein 152	1.77	**1,49**				
209339_at	seven in absentia homolog 2 (Drosophila)	2.25	**1,49**				
233258_at	signal peptide, CUB domain, EGF-like 1	1.83	**1,49**				
244477_at	solute carrier family 12 (sodium/chloride transporters), member 3	1.61	**1,49**				
234560_at	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 11	1.71	**1,49**				
204467_s_at	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	1.85	**1,49**				
223829_at	transketolase-like 2	1.67	**1,49**				
204390_at	tripartite motif-containing 24	1.61	**1,49**				
1557185_at	two pore segment channel 1	1.64	**1,49**				
218312_s_at	zinc finger and SCAN domain containing 18	-1.66	**1,49**				
236570_at	zinc finger protein 366	1.68	**1,49**				
1561002_at	zinc finger protein 521	1.77	**1,49**				
243495_s_at	zinc finger protein 652	-2.03	**1,49**				
210112_at	Hermansky-Pudlak syndrome 1	1.86		**1,4**			
208792_s_at, 20879	clusterin	1.93		**1,4**			
207802_at	cysteine-rich secretory protein 3	2.25		**1,4**			
1554419_x_at	gametogenetin binding protein 2	1.91		**1,4**			
206655_s_at	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide	2.02		**1,4**		Hematopoietic cell lineage	
214146_s_at	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	1.68		**1,4**	**1,39**		
201061_s_at	stomatin	1.79		**1,4**			
1555659_a_at	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1	2.19		**1,4**			
205557_at	bactericidal/permeability-increasing protein	2.58			**1,39**		
220491_at	hepcidin antimicrobial peptide	1.82			**1,39**		

Çizelge 5.15. Tromboz ve Kontrol grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo.

Affy ID	Gene Symbol	Fold Change	Clusters							KEGG	BIOCARTA
			1	2	3	4	5	6	7		
1558111_at, 235811_at, 201151_s_at	muscleblind-like (Drosophila)	**-3.89**	**3,14**								
241620_at, 1558747_at	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	**-2.46**							**1,42**		
243828_at	katanin p60 subunit A-like 1	**2.55**							**1,42**		
211499_s_at	mitogen-activated protein kinase 11	**2.31**							**1,42**	T cell receptor signaling pathway NOD-like receptor signaling pathway Progesterone-mediated oocyte maturation Neurotrophin signaling pathway VEGF signaling pathway	
204854_at	leprecan-like 2	**2.25**					**1,77**				
211027_s_at	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	**2.17**							**1,42**	Prostate cancer T cell receptor signaling pathway Pathways in cancer NOD-like receptor signaling pathway Neurotrophin signaling pathway Acute myeloid leukemia Pancreatic cancer Chronic myeloid leukemia B cell receptor signaling pathway Insulin signaling pathway Chemokine signaling pathway	
214316_x_at	calreticulin	**2.14**						**1,72**			
230358_at	zer-1 homolog (C. elegans)	**2.12**			**2,34**	**1,87**					
215114_at	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 3	**2.1**				**1,87**					
200637_s_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	**2.1**						**1,72**			

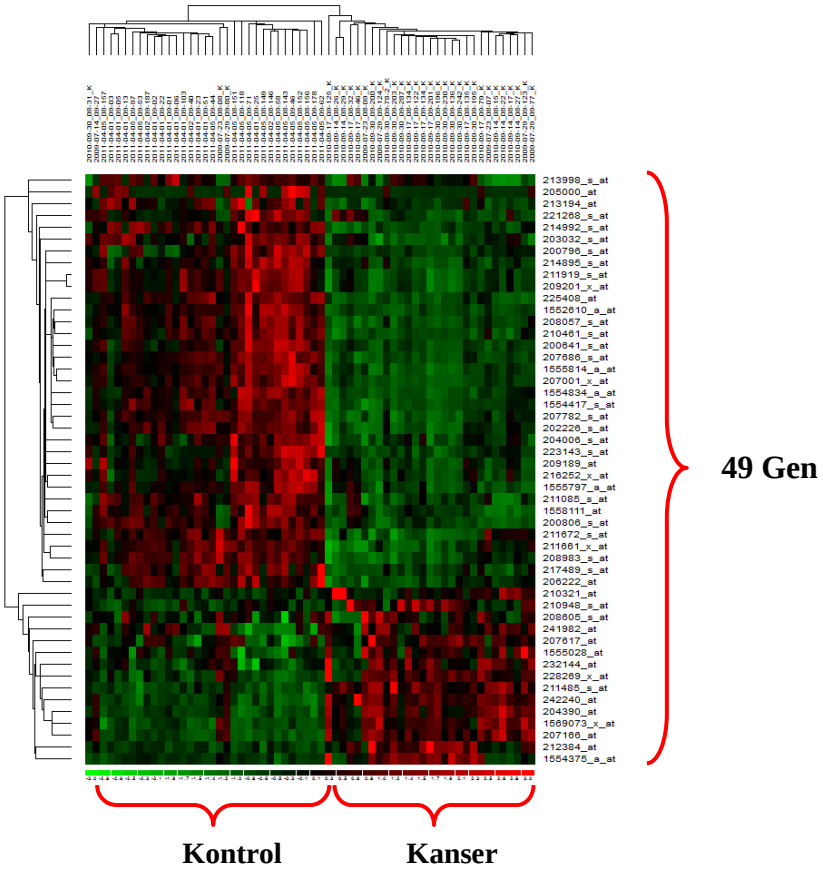
Çizelge 5.16. Tromboz ve Kanser + Tromboz grubu karşılaştırması için oluşturulan özet tablo.

Affy ID	Gen	Kat Değişimi	Kümeler			KEGG	BIOCARTA
			1	2	3		
228603_at	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	**1.78**	**1,34**		**1,24**		
230180_at, 213998_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	**1.67**	**1,34**		**1,24**		
239597_at	PAN3 poly(A) specific ribonuclease subunit homolog (S.	**1.76**	**1,34**		**1,24**		
1552274_at	PX domain containing serine/threonine kinase	**1.73**	**1,34**		**1,24**		
243496_at, 229398_at	RAB18, member RAS oncogene family	**1.7**	**1,34**		**1,24**		
202131_s_at, 202129_s_at	RIO kinase 3 (yeast)	**1.91**	**1,34**		**1,24**		
211993_at	WNK lysine deficient protein kinase 1; hypothetical LOC100132369	**1.81**	**1,34**		**1,24**		
1557910_at	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	**1.98**	**1,34**		**1,24**	Prostate cancer	
235085_at	homolog of rat pragma of Rnd2	**-1.74**	**1,34**		**1,24**		
1568830_at	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	**2.27**	**1,34**		**1,24**	Neurotrophin signaling pathway	
244679_at	serine/threonine kinase 38	**1.68**	**1,34**		**1,24**		
1558747_at	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	**3.86**	**1,34**		**1,24**		
208900_s_at	topoisomerase (DNA) I	**2.6**	**1,34**		**1,24**		
217826_s_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (UBC6 homolog, yeast)	**2.02**	**1,34**		**1,24**		
222420_s_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	**1.91**	**1,34**		**1,24**		
236533_at	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1	**1.73**		**1,31**			
241955_at	HECT domain containing 1	**1.84**		**1,31**			
238851_at	ankyrin repeat domain 13A	**1.78**		**1,31**			
238439_at	ankyrin repeat domain 22	**2.25**		**1,31**			
214723_x_at	ankyrin repeat domain 36; similar to ankyrin repeat domain 36	**1.91**		**1,31**			

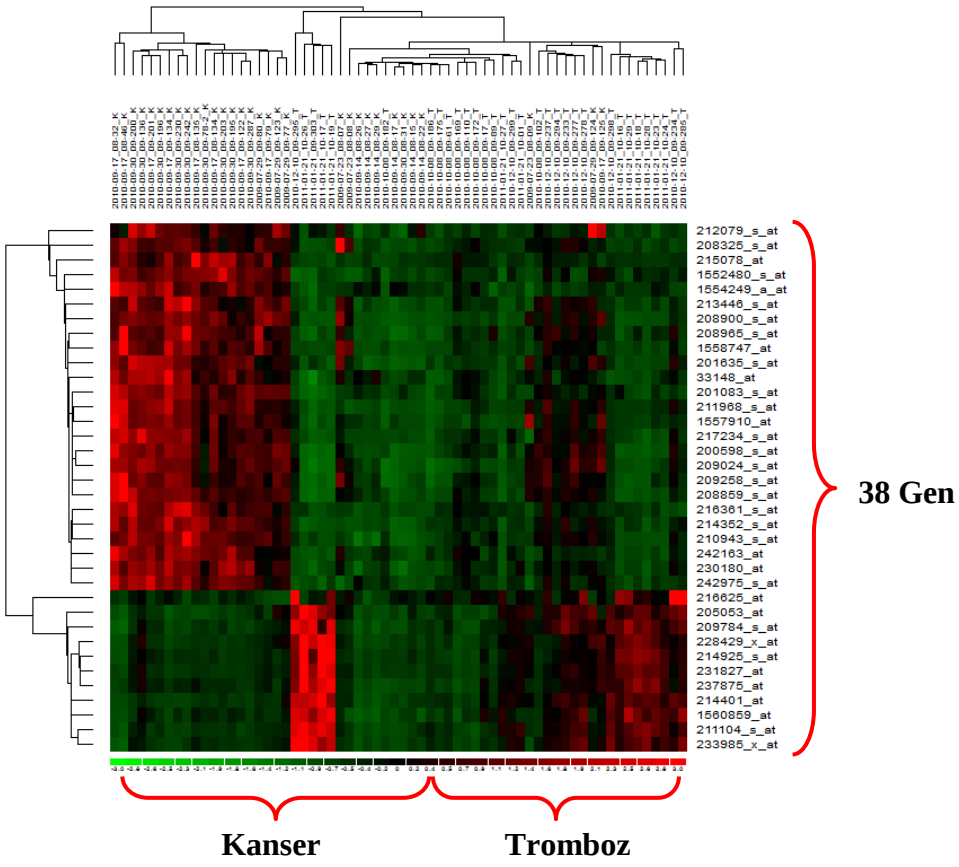
g- Biyoinformatik Analiz Bulguları 3 (dCHIP)

Yukarıda yapılan analizler sonucunda ilgilenilen gen sayısında anlamlı düzeyde azalma olmuştur. Belirlenen bu genler ile dCHIP gen listelerinde olduğu gibi kümeleme analizi ile gruplar arasında bir ayrım yapılıp yapılamayacağını görmek amacıyla tekrar kümeleme analizi yapılmıştır.

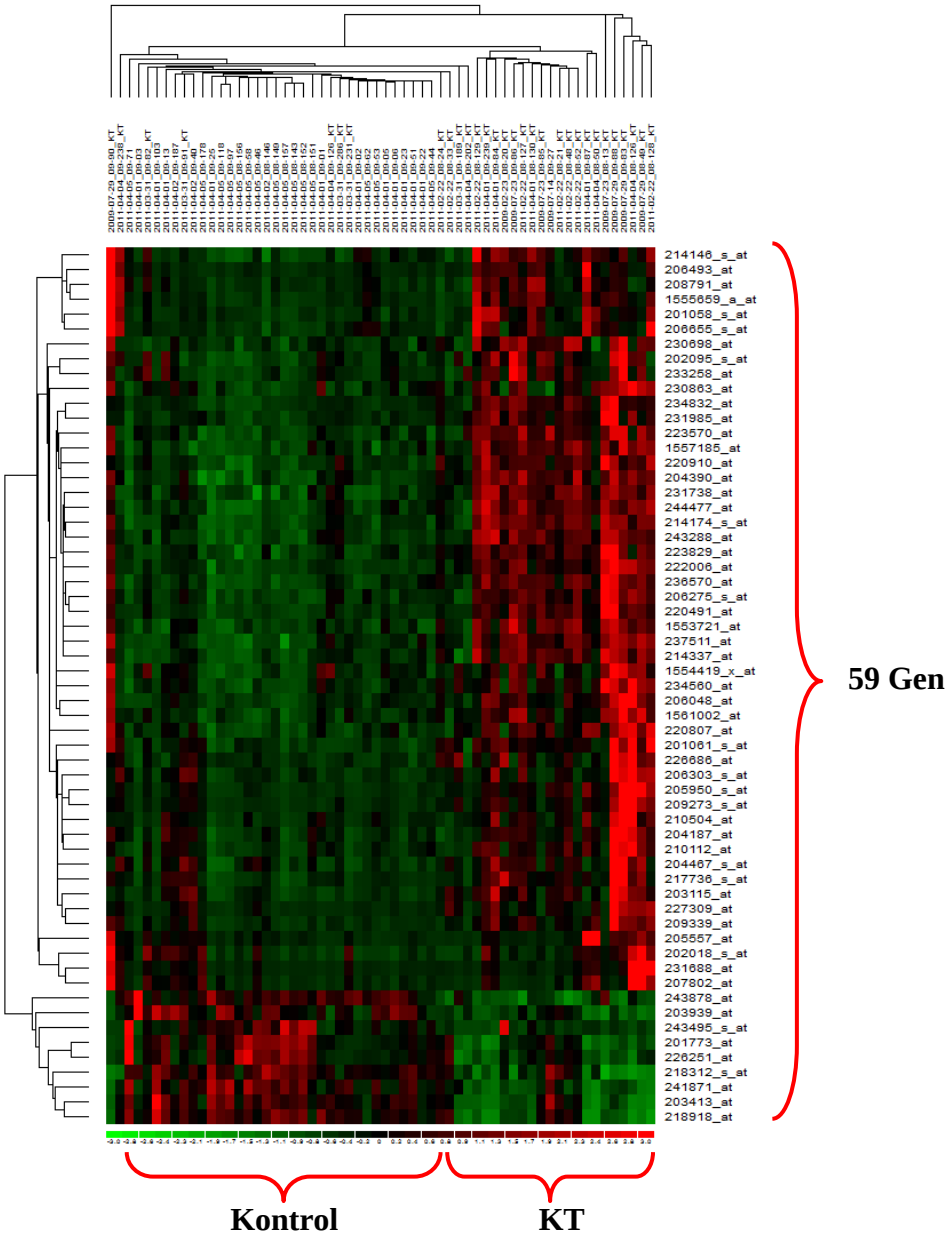
Elde edilen sonuçlar ve heatmapler aşağıda verilmiştir.



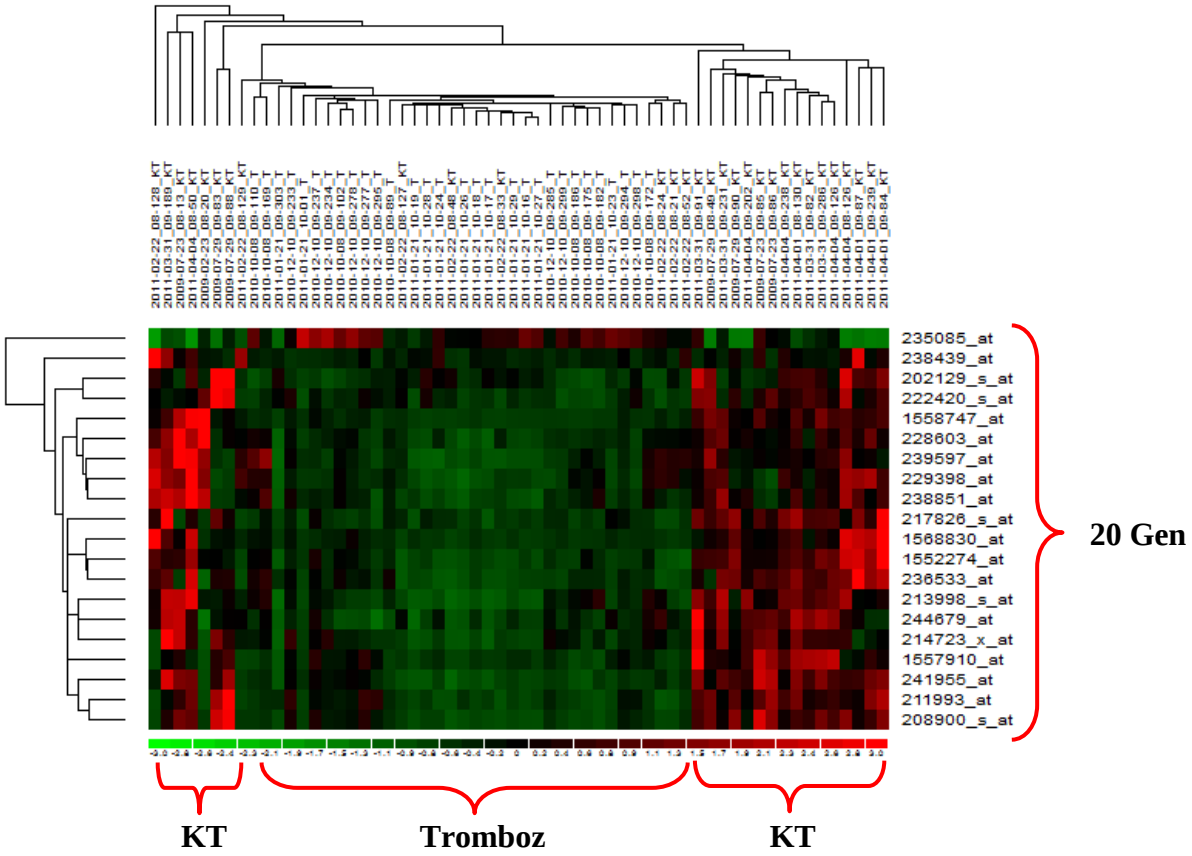
Şekil 5.10. DAVID gen listesi ile yapılan Kanser ve Kontrol gruplarının kümeleme analizi.



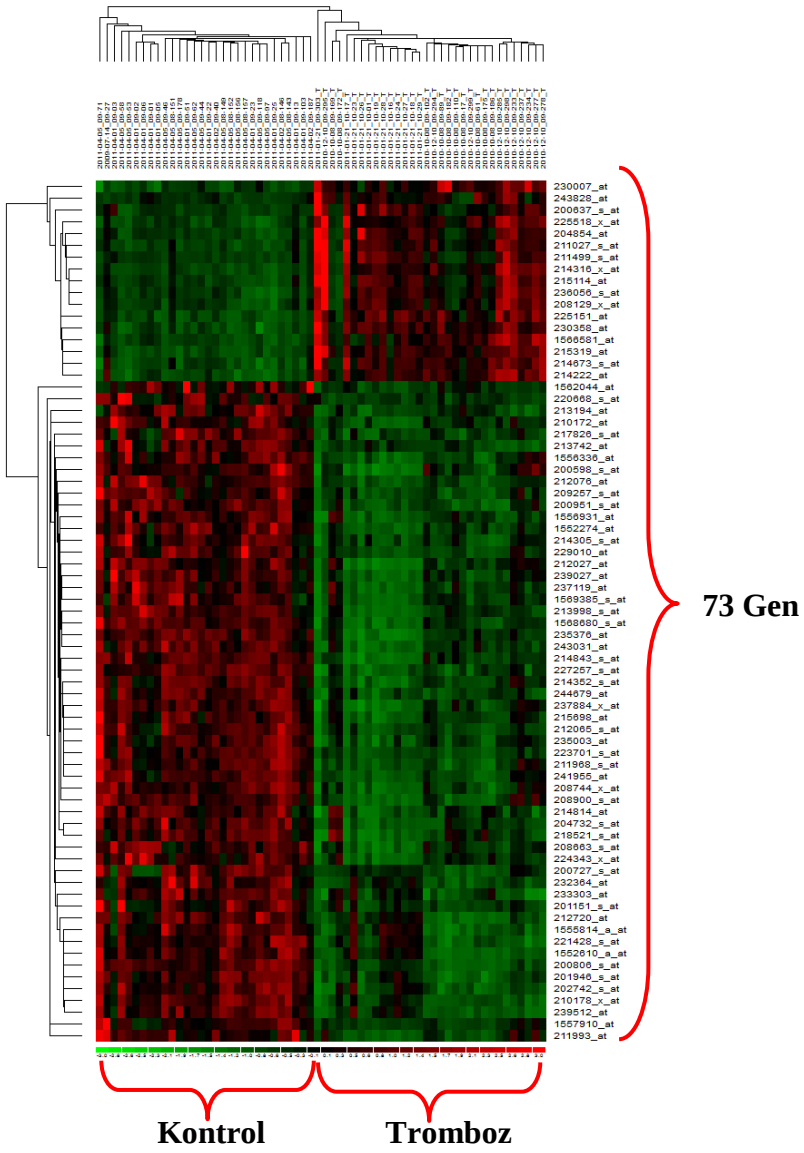
Şekil 5.11. DAVID gen listesi ile yapılan Kanser ve Tromboz gruplarının kümeleme analizi.



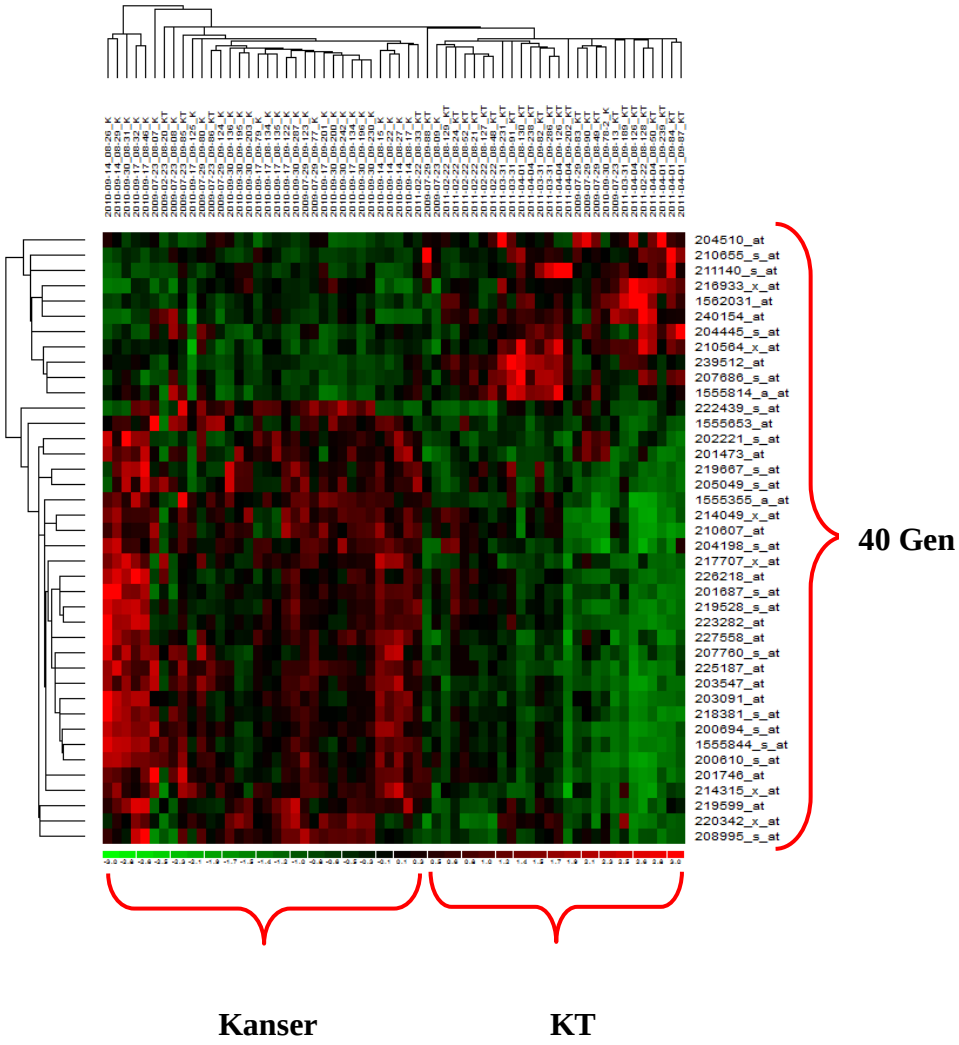
Şekil 5.12. DAVID gen listesi ile yapılan Kontrol ve Kanser + Tromboz gruplarının kümeleme analizi.



Şekil 5.13. DAVID gen listesi ile yapılan Tromboz ve Kanser + Tromboz gruplarının kümeleme analizi.



Şekil 5.14. DAVID gen listesi ile yapılan Tromboz ve Kontrol gruplarının kümeleme analizi.



Şekil 5.15. DAVID gen listesi ile yapılan Kanser ve Kanser + Tromboz gruplarının kümeleme analizi.

h- Biyoinformatik Analiz 4

Yapılan kümeleme analizleri sonucu elde edilen yukarıdaki heatmapler bu grupların listelerdeki bu genler yardımıyla da birbirlerinden ayrılabildiğini göstermiştir. Şimdi daha az sayıda gene odaklanmak amacıyla bu tablolardan belirli kriterleri sağlayan genler seçilmiştir.

dCHIP ve DAVID analizleri sonucu elde edilen veriler ile oluşturulan bu tablolarda aşağıdaki kriterler kullanılarak yeniden bir filtreleme yapıldı. Bu kriterler;

1- Herhangi bir yolakta bulunan genler.
2- Kat değişim oranı +2'den büyük -2'den küçük olan genler.
3- İkiden fazla anotasyon kümesinde bulunan genler.

Bu özelliklerden her hangi birisine sahip olan genler seçilmiş, ve bu genler Ek.4.'de listelenmiştir.

i- Aday Gen Listesinden Validasyon İçin Genlerin Seçilmesi

Ek.4.'de listelenen genler alfabetik sıraya dizilerek birden fazla ikili karşılaştırma grubunda bulunan genlerin alt alta gelmesi sağlanmış ve bu genler belirlenmiştir. Tekrar eden bu genler seçilerek bir tablo oluşturulmuş ve kat değişimi açısından grublar arasında bir korelasyonun ve dereceli bir artış veya azalışın olup olmadığı tespit edilmiştir. Bu şekilde oluşturulan ve seçilen genleri de içeren tablo çizelge 5.17'de verilmiştir.

Çizelge 5.17. Seçilen genlerin karşılaştırma grupları arasındaki kat değişim oranları.

	KONTROL vs. KANSER	KANSER vs. TROMBOZ	KANSER vs. KT	TROMBOZ vs. KONTROL	TROMBOZ vs. KT	KT vs. KONTROL	KORELASYON
CASPS8	-1.6	1.1	1.48	-1.52	1.38	-1.1	Korelasyon
CXCR4	-2.17	1.15	1.19	-1.69	1.04	-1.63	Korelasyon
CXCR4	-1.96	1.16	1.14	-1.56	-1.02	-1.59	Korelasyon
DDX17	-1.05	-2.28	-1.13	-1.78	1.67	-1.08	
DDX17	-1.87	-1.55	1.35	-2.9	2.19	-1.37	Korelasyon
DDX3Y	-2.86	1.3	1.35	-2.57	1.04	-2.25	Korelasyon
HSP90AA2	-1.24	-2.17	-1.29	-2.66	1.62	-1.61	Korelasyon
HSP90AB1	-1.17	-2.22	-1.07	-2.98	1.98	-1.25	Korelasyon
HSP90B1	-1.04	-2.13	-1.35	-2.05	1.55	-1.3	Korelasyon
HSP90B1	-1.09	-1.86	-1.12	-2.04	1.67	-1.22	Korelasyon
HSPD1	-1.9	-1.51	1.33	-3.28	2	-1.64	Korelasyon
HSPH1	-1.38	-1.63	-1.27	-2.22	1.28	-1.76	Korelasyon
JAK1	-1.87	-1.08	1.48	-2.2	1.59	-1.38	Korelasyon
JAK2	-1.3	-1.07	1.63	-1.4	1.85	1.32	KorelasyonKT
KRAS	-1.09	-1.85	1.07	-2.05	1.85	-1.01	Korelasyon
MBNL1	-2.07	-1.62	1.55	-3.89	2.16	-1.5	Korelasyon
MBNL1	-1.54	-2.77	1.18	-4.25	2.56	-1.31	Korelasyon
MBNL1	-1.37	-1.61	-1.28	-2.25	1.26	-1.76	Korelasyon
MLL	1.23	-1.79	-1.13	-1.49	1.62	1.08	KorelasyonKT
MLL	-1.4	-1.51	1.02	-2.11	1.54	-1.38	Korelasyon
RHOA	-2.71	1.15	1.59	-2.04	1.35	-1.51	Korelasyon
ROBO1	-1.77	-1.06	1.29	-2.09	1.38	-1.58	Korelasyon
SMC3	-1.34	-1.84	-1.1	-2.58	1.78	-1.47	Korelasyon
SMC3	1.13	-1.91	-1.29	-1.7	1.48	-1.15	KorelasyonKT
SMCHD1	-1.1	-2.07	-1.19	-2.46	1.91	-1.32	Korelasyon
SMCHD1	-2.11	-2.64	1.71	-5.53	3.86	-1.16	Korelasyon
SRF11	-1.6	-1.32	1.24	-2.14	1.64	-1.29	Korelasyon
SRF4	-2.03	-1.01	1.63	-2.25	1.84	-1.26	Korelasyon
STK38	-1.26	-1.75	1.1	-2.23	1.68	-1.15	
STK4	-1.7	-1.08	1.3	-1.84	1.41	-1.31	Korelasyon
TOP1	1.08	-2.92	1.01	-2.74	2.6	1.1	
UBE2D3	-1.85	1	1.68	-2.08	1.75	-1.17	Korelasyon
UBE2J1	-1.38	-1.51	1.45	-2.14	2.02	1.05	
UBE2W	-1.66	-1.24	1.3	-2.1	1.62	-1.27	Korelasyon
USP4	-1.2	-1.67	1.02	-2.07	1.65	-1.18	Korelasyon
USP47	-1.5	-1.79	-1.09	-2.75	1.76	-1.63	Korelasyon

Kırmızı renkli değerler ifade artışını, yeşil renkli değerler ise ifade azalışını temsil etmektedir. Sarı renkli değerler ise filtreleme sırasında elenen fakat gruplar arasında kat değişimi açısından bir gradientin olup olmadığını belirleyebilmek için filtrelemeyi kaldırıp tespit edilen değerlerdir.

Daha sonra çizelge 5.17 kullanılarak hangi genlerin ortak bir profile sahip oldukları belirlenmiştir. Yani gruplar arasındaki kat değişimi açısından benzerlik gösteren gen grupları belirlenmiş ve bunlarda ayrı çizelgelere yerleştirilmiştir. Bu

çizelgeler oluşturulurken sağlıklı kontrol bireylerin bulunduğu grubun ekspresyon değeri 1 olarak alınıp, diğer grupların kat değişimi bu değer baz alınarak belirlenmiştir. Aşağıdaki çizelgelerde genlerin ifade düzeyleri Kontrolden Kanser ve Tromboz yönünen doğru giderken azalmakta ve bu sıralama kırmızıdan yeşile doğru giden bir renk skalası ile gösterilmiştir.

Çizelge 5.18. Kat değişimi değerlerine göre **Kontrol > KT > Kanser > Tromboz** şeklinde bir profil sergileyen genler.

AffyID	Gene	KONTROL	KT	KANSER	TROMBOZ
213998_s_at	**DDX17**	1	1.37	1.87	2.9
200806_s_at	**HSPD1**	1	1.64	1.9	3.28
1552610_a_at	**JAK1**	1	1.38	1.87	2.2
214352_s_at	**KRAS**	1	1.01	1.09	2.05
235811_at	**MBNL1**	1	1.31	1.54	4.25
1558111_at	**MBNL1**	1	1.5	2.07	3.89
212076_at	**MLL**	1	1.38	1.4	2.11
213194_at	**ROBO1**	1	1.58	1.77	2.09
1558747_at	**SMCHD1**	1	1.16	2.11	5.53
213742_at	**SRF11**	1	1.29	1.6	2.14
239512_at	**SRF4**	1	1.26	2.03	2.25
244679_at	**STK38**	1	1.15	1.26	2.23
211085_s_at	**STK4**	1	1.31	1.7	1.84
233303_at	**UBE2D3**	1	1.17	1.85	2.08
218521_s_at	**UBE2W**	1	1.27	1.66	2.1
235376_at	**USP4**	1	1.18	1.2	2.07

Çizelge 5.19. Kat değişimi değerlerine göre **Kontrol > Kanser > KT > Tromboz** şeklinde bir profil sergileyen genler.

AffyID	Gene	KONTROL	KANSER	KT	TROMBOZ
230180_at	**DDX17**	1	1.05	1.08	1.78
211968_s_at	**HSP90AA2**	1	1.24	1.61	2.66
1557910_at	**HSP90AB1**	1	1.17	1.25	2.98
200598_s_at	**HSP90B1**	1	1.04	1.3	2.05
216449_x_at	**HSP90B1**	1	1.09	1.22	2.04
208744_x_at	**HSPH1**	1	1.38	1.76	2.22
201151_s_at	**MBNL1**	1	1.37	1.76	2.25
209257_s_at	**SMC3**	1	1.34	1.47	2.58
241620_at	**SMCHD1**	1	1.1	1.32	2.46
223701_s_at	**USP47**	1	1.5	1.63	2.75

Çizelge 5.20. Kat değişimi değerlerine göre **Kontrol > KT > Tromboz > Kanser** şeklinde bir profil sergileyen genler.

AffyID	Gene	KONTROL	KT	TROMBOZ	KANSER
207686_s_at	**CASPS8**	1	1.1	1.52	1.6
211919_s_at	**CXCR4**	1	1.63	1.69	2.17
205000_at	**DDX3Y**	1	2.25	2.57	2.86
1555814_a_at	**RHOA**	1	1.51	2.04	2.71

Yukarıda oluşturulan çizelgelerde 26 adet farklı gen bulunmaktadır. Bu 26 genden 13 tanesi ilgilendiğimiz bir takım yolaklarda görev alan genlerdir. Bu yüzden bu genler aday gen listesine alınmıştır. Bu işlemden sonra geriye 13 adet gen kalmaktadır. Bu 13 genden 6 tanesi yapılan literatür taraması sonucunda bizim çalışmamızla ilgisi olamadığı için elenmiştir.

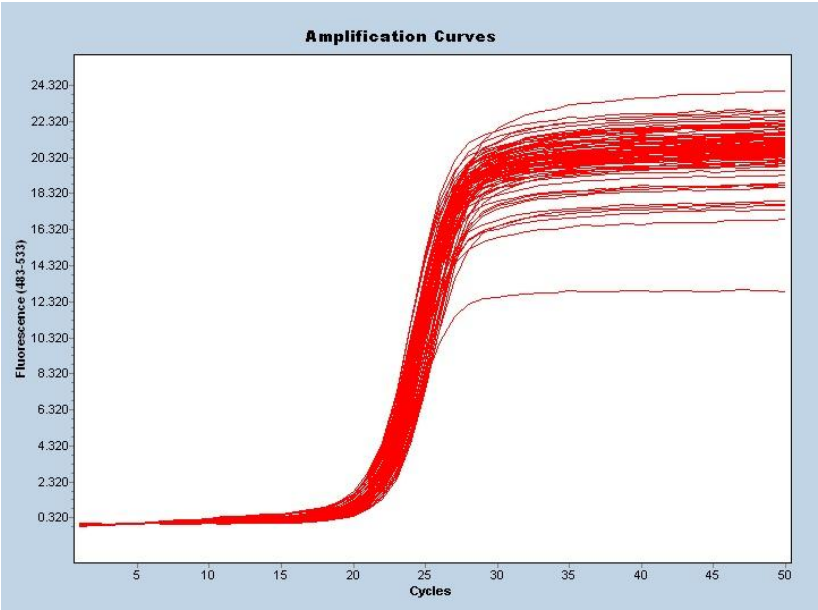
Nihayetinde aday gen listesini oluşturan 20 adet gen belirlemiştir. Bu liste aşağıda verilmiştir.

1- JAK1
2- CASPAS 8
3- HSP90AA2
4- HSP90AB1
5- HSP90b1
6- RHOA
7- STK4
8- KRAS
9- UBE2J1
10- UBE2D3
11- UBE2W
12- CXCR4
13- ROBO1
14- DDX17
15- HSP60
16- HSP105
17- SMCHD1
18- STK38
19- USP4
20- USP47

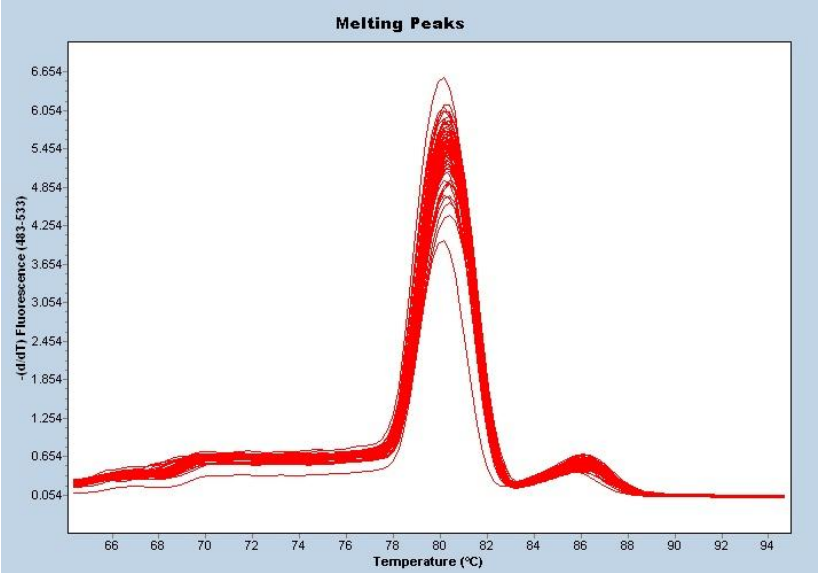
Daha sonra yukarıdaki listede bulunan 20 gen ve seçilen 3 referans gen için exon intron yapısı çıkarıldı. İki exon ve arada bir intronu kapsayacak şekilde Perl Primer dizayn programı ile primerler dizayn edildi. Seçilen 3 adet referans genin, insan kanında yapılan ifade analizlerinde ekspresyon düzeyinin stabil olduğu Stamova *et.al.* tarafından kanıtlanmıştır (161). TRAP1, DECR I ve PPIB genleri bu kaynak baz alınarak housekeeping genler olarak belirlenmiştir. Ek.5.'de tasarlanan primerler ve bu primerlerin bazı özellikleri listelenmiştir.

j. QRT-PCR Sonuçları

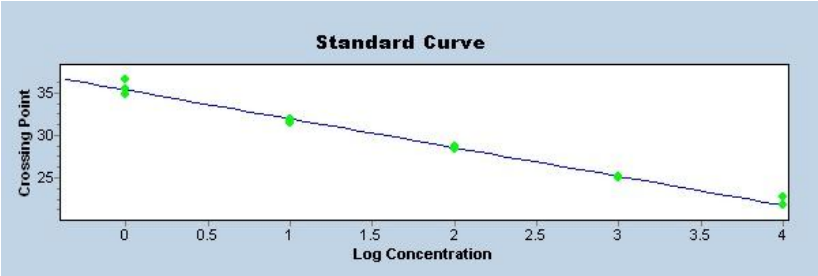
İlk aşamada seçilen genler için materyal ve metod kısmında verilen protokol üzerinden PCR reaksiyonu kurulmuştur. Herbir gen için reaksiyon sonunda elde edilen amplifikasyon eğrisi, erime eğrisi ve hazırlanan standartlardan elde edilen standart eğri değerlendirilip CT değerleri alınmıştır. Aşağıdaki Şekil 5.15, 5.16 ve 5.17'de Caspas 8 geni için elde edilen sırasıyla amplifikasyon eğrisi, erime eğrisi ve standart eğri verilmiştir.



Şekil 5.15 Caspas 8 geni amplifikasyon eğrisinin temsili görüntüsü.



Şekil 5.16 Caspas 8 geni erime eğrisinin temsili görüntüsü.



Şekil 5.17 Caspas 8 geni için elde edilen standart eğrinin temsili görüntüsü.

Daha sonra elde edilen Ct değerleri cihazdan alınarak 2001 yılında Pfaffl tarafından önerilen metoda göre gerekli hesaplamalar yapılmıştır (162). Hesaplamalar sonucu elde edilen tablo Çizelge 5.23'de verilmiştir.

Çizelge 5.21 QRT-PCR hesaplama sonuçları.

Örnek	Caspase8	CXCR4	DDX17	HSP90AB1	HSP90B1	HSPD1	HSPH	JAK1	RHOA	ROBO1	SMCHD1	STK4	STK38	UBE2D3	UBE2W	USP47
C1	1.088	1.113	0.896	0.779	0.609	0.685	0.587	0.822	0.824	0.12	0.595	0.728	0.683	0.916	0.956	0.617
C2	0.75	0.796	0.825	0.849	1.01	0.719	1.067	0.87	1.087	1.282	1.192	1.005	1.203	1.068	1.034	1.165
C3	1.154	0.748	0.864	0.841	1.146	1.073	1.091	0.799	1.112	3.418	1.366	1.308	1.142	1.152	1.274	1.177
C4	1.063	1.866	1.406	1.433	0.876	1.012	1.064	1.38	0.863	0.906	0.643	0.828	0.838	0.836	0.742	0.922
C5	0.678	0.626	0.774	0.556	1.11	0.97	1.005	0.756	1.061	0.565	1.17	0.871	0.944	1.167	1.076	0.779
C6	0.97	0.997	1.469	1.808	1.301	1.331	1.229	2.134	1.143	1.552	1.137	1.293	1.29	0.712	0.889	1.56
C7	1.519	1.302	0.981	1.25	1.124	1.454	1.117	0.789	0.961	2.399	1.212	1.124	1.049	1.278	1.123	1.056
K1	1.139	0.506	0.806	0.549	1.324	0.866	0.93	0.668	0.596	0.134	0.512	0.712	0.979	0.827	0.479	0.767
K2	0.788	0.715	0.828	0.996	1.415	1.132	1.436	1.192	0.984	0.227	0.662	0.889	1.129	0.968	0.895	0.749
K3	1.184	0.73	0.791	0.929	1.047	0.693	0.947	1.484	0.805	0.762	0.723	0.913	1.002	0.936	0.955	0.872
K4	0.764	0.798	0.784	0.822	1.414	0.712	0.872	1.076	0.789	0.738	0.509	0.813	0.839	0.812	0.667	0.856
K5	1.016	0.475	0.603	0.81	1.065	0.86	1.052	0.75	0.786	0.123	0.561	0.773	0.89	0.846	0.666	0.891
K6	0.915	0.51	0.709	0.486	0.856	0.998	0.898	0.551	0.774	1.278	0.524	0.708	0.787	0.721	0.813	0.703
K7	1.095	1.186	1.013	0.866	1.497	0.817	0.997	1.458	1.06	0.077	1.061	1.113	1.287	1.234	0.877	0.963
KT1	0.562	0.971	0.725	0.847	0.794	0.431	0.275	0.41	2.529	1.208	1.433	1.497	1.508	2.003	3.43	1.144
KT2	0.824	1.478	0.662	0.787	1.013	1.139	1.039	0.759	0.817	0.568	0.561	0.801	1.001	0.813	0.778	1.009
KT3	0.386	0.881	0.412	0.431	0.931	0.556	0.556	0.354	1.648	0.265	1.513	1.072	1.003	1.19	1.681	0.839
KT4	0.673	0.988	0.654	1.569	0.5	0.386	0.56	0.783	0.62	0.152	0.273	0.413	0.737	0.417	0.234	0.394
KT5	0.746	0.941	0.726	1.188	0.804	0.469	0.839	0.59	0.689	1.754	0.357	0.65	1.027	0.567	0.387	0.586
KT6	0.782	0.766	0.893	0.586	0.986	0.891	1.047	0.918	0.876	0.708	1.002	0.788	0.948	0.826	0.725	1.068
KT7	0.53	0.413	0.453	0.477	1.041	0.729	0.889	0.496	0.683	0.136	0.547	0.578	0.747	0.657	0.479	0.695
V1	0.635	0.785	0.671	0.769	1.032	0.914	0.884	0.758	1.016	0.917	0.592	0.853	0.897	0.92	1.211	0.924
V2	0.699	0.559	0.543	0.449	1.09	0.791	0.974	0.624	0.965	0.403	0.789	0.953	0.925	0.966	0.954	1.042
V3	0.837	0.771	0.71	0.657	1.363	0.882	0.998	0.917	0.949	0.226	1.002	1.134	1.12	0.97	0.933	1.102
V4	0.742	0.684	0.679	0.645	0.824	0.785	0.893	0.513	0.746	0.123	0.51	0.671	0.787	0.814	0.746	0.853
V5	1.187	0.966	1.023	0.817	1.382	1.426	1.344	1.346	1.309	1.033	0.981	1.442	1.326	1.22	1.412	1.618
V6	0.802	0.567	0.744	0.366	0.585	0.605	0.589	0.81	1.058	0.139	0.793	0.652	0.979	1.131	0.875	0.8
V7	1.624	0.86	1.047	0.762	1.262	0.983	1.13	1.329	1.195	0.8	0.993	1.257	1.39	1.274	1.184	1.29

Yapılan hesaplama sonucu elde edilen bu veri üzerine istatistiksel analizler uygulanmıştır. Veri seti nonparametrik Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş, elde edilen p değerleri üzerine Benjamini-Hochberg düzeltmesi yapılmıştır. Yapılan bu analizler sonucunda elde edilen p değerleri üzerinden hangi genlerin anlamlı olduğu değerlendirilmiştir. Yapılan bu analizde $p<0,05$ anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Analiz sonucu elde edilen veri seti aşağıdaki Çizelge 5.22'de verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü üzere seçilen bu genler açısından dört grup arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Ancak grupların ikili karşılaştırılması durumunda sadece caspas 8 geni Kanser ve KT karşılaştırmasında anlamlı çıkmaktadır. Caspas 8 geni için yapılan analiz ise Çizelge 5.23'de verilmektedir.

Çizelge 5.22 QRT-PCR istatistik analiz sonuçları.

grup		Casp8_PPIB	CXCR4_PPIB	DDX17_PPIB	HSP90AB1_PPIB	HSP90B1_PPIB	HSPD1_PPIB	HSPH_PPIB	JAK1_PPIB	RHOA_PPIB	ROBO1_PPIB	SMCHD1_PPIB	STK4_PPIB	STK38_PPIB	UBE2D3_PPIB	UBE2W_PPIB	USP47_PPIB
C	Mean	1.032	1.064	1.031	1.074	1.025	1.035	1.023	1.078	1.007	1.463	1.045	1.022	1.021	1.018	1.013	1.039
	Std. Deviation	0.278	0.422	0.286	0.440	0.225	0.286	0.204	0.513	0.126	1.130	0.300	0.228	0.214	0.203	0.172	0.307
	Median	1.063	0.997	0.896	0.849	1.110	1.012	1.067	0.822	1.061	1.282	1.170	1.005	1.049	1.068	1.034	1.056
	Minimum	0.678	0.626	0.774	0.556	0.609	0.685	0.587	0.756	0.824	0.120	0.595	0.728	0.683	0.712	0.742	0.617
	Maximum	1.519	1.866	1.469	1.808	1.301	1.454	1.229	2.134	1.143	3.418	1.366	1.308	1.290	1.278	1.274	1.560
K	Mean	0.986	0.703	0.791	0.780	1.231	0.868	1.019	1.026	0.828	0.477	0.650	0.846	0.988	0.906	0.765	0.829
	Std. Deviation	0.168	0.249	0.124	0.191	0.241	0.155	0.193	0.378	0.152	0.458	0.199	0.142	0.174	0.166	0.168	0.092
	Median	1.016	0.715	0.791	0.822	1.324	0.860	0.947	1.076	0.789	0.227	0.561	0.813	0.979	0.846	0.813	0.856
	Minimum	0.764	0.475	0.603	0.486	0.856	0.693	0.872	0.551	0.596	0.077	0.509	0.708	0.787	0.721	0.479	0.703
	Maximum	1.184	1.186	1.013	0.996	1.497	1.132	1.436	1.484	1.060	1.278	1.061	1.113	1.287	1.234	0.955	0.963
KT	Mean	0.643	0.920	0.646	0.841	0.867	0.657	0.744	0.616	1.123	0.684	0.812	0.828	0.996	0.925	1.102	0.819
	Std. Deviation	0.157	0.317	0.166	0.412	0.189	0.278	0.288	0.210	0.712	0.604	0.507	0.360	0.256	0.534	1.129	0.275
	Median	0.673	0.941	0.662	0.787	0.931	0.556	0.839	0.590	0.817	0.568	0.561	0.788	1.001	0.813	0.725	0.839
	Minimum	0.386	0.413	0.412	0.431	0.500	0.386	0.275	0.354	0.620	0.136	0.273	0.413	0.737	0.417	0.234	0.394
	Maximum	0.824	1.478	0.893	1.569	1.041	1.139	1.047	0.918	2.529	1.754	1.513	1.497	1.508	2.003	3.430	1.144
V	Mean	0.932	0.742	0.774	0.638	1.077	0.912	0.973	0.900	1.034	0.520	0.809	0.994	1.061	1.042	1.045	1.090
	Std. Deviation	0.353	0.149	0.189	0.170	0.294	0.257	0.233	0.326	0.181	0.388	0.199	0.298	0.227	0.169	0.231	0.285
	Median	0.802	0.771	0.710	0.657	1.090	0.882	0.974	0.810	1.016	0.403	0.793	0.953	0.979	0.970	0.954	1.042
	Minimum	0.635	0.559	0.543	0.366	0.585	0.605	0.589	0.513	0.746	0.123	0.510	0.652	0.787	0.814	0.746	0.800
	Maximum	1.624	0.966	1.047	0.817	1.382	1.426	1.344	1.346	1.309	1.033	1.002	1.442	1.390	1.274	1.412	1.618
BH düzeltmeli p değeri		0.204	0.204	0.204	0.204	0.204	0.204	0.204	0.204	0.204	0.258	0.204	0.311	0.948	0.311	0.204	0.204

Çizelge 5.23 Caspas 8 geninin Kanser ve KT ikili karşılaştırmasındaki p değeri.

grup		Eff.□1.965	Eff.□2.138	Casp8Cont-Sample	PPIBcont-PPIB	Eff.□Casp8	Eff.□PPIB	Casp8/PPIB
K	N	7	7	7	7	7	7	7
	Mean	21.0150	22.0007	.0000	-.0007	1.0113	1.0051	1.0136
	Std. Deviation	.24723	.15080	.24723	.15080	.15426	.11628	.17252
	Median	20.9330	21.9700	.0820	.0300	1.0570	1.0231	1.0451
	Minimum	20.75	21.76	-.50	-.19	.71	.87	.79
	Maximum	21.51	22.19	.27	.24	1.20	1.20	1.22
KT	N	7	7	7	7	7	7	7
	Mean	21.6821	22.0103	-.6671	-.0103	.6584	1.0028	.6612
	Std. Deviation	.41952	.21221	.41952	.21221	.17250	.14949	.16192
	Median	21.4660	21.9160	-.4510	.0840	.7374	1.0659	.6921
	Minimum	21.24	21.81	-1.29	-.42	.42	.73	.40
	Maximum	22.30	22.42	-.23	.19	.86	1.16	.85
	BH düzeltmeli p değeri	0.037	0.814	0.037	0.814	0.037	0.814	0.037

j. QRT-PCR Validasyonu İçin İkinci Gen Setinin Belirlenmesi

Yapılan QRT-PCR validasyon deneylerinden sonra elde edilen veriler ile hesaplamalar ve istatistiksel analizler sonucunda bu set içerisinde sadece Caspase 8 geni anlamlı bulunmuştur. Bu durumdan ötürü ikinci defa validasyon için gen seçimine gidilmiştir. Ek.4.'deki genlerden benzer kriterler kullanarak ve literatür taraması yapılarak 10 adet gen seçilmiştir.

Belirlenen genler;

1- GZMH

2- HSP90B1

3- DDX17

4- FOXO3

5- CEACAM8

6- CDC27

7- CD84

8- SOD2

9- IKBKB

10- MDM4

Daha sonra seçilen bu genler için primer dizaynı yapıldı. Dizayn edilen primerler Ek.6.'da verilmiştir.

k. İkinci Gen Seti QRT-PCR Sonuçları

İkinci aşamada seçilen 10 adet gen için yeniden QRT-PCR yapılmıştır. PCR reaksiyonu metot kısmında verildiği üzere birinci aşamadaki gibi aynen tekrarlanmıştır. Daha önce uygulanan QRT-PCR protokolü aynen uygulanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi ve yapılan hesaplar ile bu verilere uygulanan istatistik testler birinci aşama ile aynıdır. Buna göre elde edilen sonuçlar Çizelge 5.25'da verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü üzere ikinci aşamada seçilen 10 adet genden CEACAM8, HSP90B1 ve IKBKB genleri anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 5.24 İkinci aşamada seçilen 10 gen için yapılan QRT-PCR analiz sonuçları.

grup		Ratio CD84/PPIB	**Ratio CEACAM8/PPIB**	Ratio DDX17/PPIB	**Ratio HSP90B1/PPIB**	**Ratio IKBKB/PPIB**	Ratio SOD2/PPIB	Ratio CDC27/PPIB	Ratio FOXO3/PPIB	Ratio MDM4/PPIB
Kanser	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	1.40046822	3.56862919	0.95241985	1.21506202	0.98728416	1.14751814	37.02285051	1.93305998	1.05469290
	Std. Deviation	0.35022913	3.20477405	0.32315776	0.47395102	0.17452419	0.58418383	87.14554155	1.31125990	0.28245231
	Median	1.37696914	2.21808233	0.87599536	1.15593921	0.94790160	0.96496425	0.94667950	1.26423020	0.99742580
	Minimum	0.84449645	0.41717376	0.61902606	0.71140311	0.74264461	0.16578725	0.43660190	0.45787039	0.74983840
	Maximum	2.08715543	9.73706514	1.63196374	2.61535049	1.34720144	2.23882256	279.02716940	4.49953952	1.52915197
Kontrol	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	1.10872353	1.64650076	1.00736355	1.04454926	1.01302286	1.05917642	1.05146020	1.06092876	1.01363658
	Std. Deviation	0.42646098	1.72350076	0.12923283	0.32941268	0.17612003	0.43291815	0.34032560	0.40308159	0.17143473
	Median	1.12399062	1.11880452	0.98020611	0.93211359	0.95697159	0.94529433	1.02915337	0.87367992	1.02016369
	Minimum	0.21601911	0.14264342	0.85343061	0.57176282	0.81982161	0.69037817	0.62924577	0.62677061	0.75405297
	Maximum	1.88040151	6.31421262	1.26824194	1.72993842	1.39784360	2.26506913	1.59670617	1.78243117	1.24131351
KT	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	1.20817360	6.14351076	1.09795989	0.81062948	0.82436417	0.87036029	1.43822457	1.89205879	1.10492090
	Std. Deviation	0.60051418	7.59760959	0.43423206	0.17578404	0.31897119	0.31225357	1.32335346	2.02663976	0.44040664
	Median	1.06808208	4.09743525	1.01213670	0.81064641	0.85085635	0.81081727	1.23059931	1.36289044	1.04458179
	Minimum	0.51149810	0.14395362	0.37522803	0.53318993	0.25558904	0.16243487	0.26851887	0.15645466	0.43856574
	Maximum	2.60762444	27.94699571	1.88826028	1.16818182	1.38836055	1.35997191	5.43417366	7.94951475	1.75904316
T	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	1.19553088	1.38112419	0.79974006	0.87121844	0.75115586	0.90981993	0.85300308	0.92792211	0.88452639
	Std. Deviation	0.44082877	1.28642613	0.19854117	0.31897109	0.09554366	0.26911714	0.42041842	0.25898945	0.19667624
	Median	1.03006704	0.99022248	0.78282886	0.87736069	0.76812845	0.84721996	0.70089093	0.88174557	0.83243637
	Minimum	0.74263531	0.17709756	0.39505762	0.09944972	0.60770629	0.35453845	0.35333547	0.59676646	0.65711756
	Maximum	2.37323023	4.14403421	1.13256107	1.27892083	0.91533507	1.35419334	1.82974428	1.31131750	1.35002394
p değeri		0.476a	**0.032b**	0.107a	**0.025a**	**0.008a**	0.34a	0.384b	0.095a	0.303a

a: Tek Yönlü Varyans Analizi, b: Kruskal Wallis Testi

Çizelge 5.25 Anlamlı bulunan genlerin ikili karşılaştırmalardaki p değerleri.

	Ratio *CEACAM8/PPIB*	Ratio HSP90B1*/PPIB*	Ratio IKBKB*/PPIB*
T-Kontrol	0.804	0.603	**0.018**
T-Kanser	**0.038**	0.079	**0.038**
T-KT	**0.014**	0.972	0.823
Kontrol-Kanser	0.065	0.615	0.999
Kontrol-KT	**0.026**	0.347	0.132
Kanser-KT	0.686	**0.028**	0.234

VI. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser sıklıkla venöz tromboz ile ilişkilendirilmiştir. Kanserle venöz tromboz arasındaki ilişki çift yönlüdür. Diğer bir deyişle kanser trombozun, tromboz da kanserin nedeni/öncülü/habercisi olabilmektedir. Venöz tromboz, kanser hastalarında en sık görülen komplikasyonlardan birisidir. Bu kapsamı ile sekonder venöz tromboz daha önce bahsedilen kemoterapötik ajanlar, uzun süreli kateter kullanımı, uzun yatak istirahati veya tümör spesifik etkenlerden dolayı ortaya çıkmaktadır. Diğer taraftan 1865 yılında Armand Trousseau'nun ifade ettiği gibi, idiopatik venöz tromboz henüz teşhis edilmemiş gizli bir kanserin erken belirtisi olabilir. Bu fenomen Trousseau Sendromu olarak adlandırılmıştır. Giriş kısmında bahsedildiği üzere bu fenomenin ortaya çıkmasında selektinler için ligand görevi yapan müsinler, daha sonra P-ve L-selektinler, yüksek düzeyde doku faktörü ifade eden mikropartiküller sorumlu tutulmuştur. Epidemiyolojik çalışmalardan moleküler düzeydeki çalışmalara uzanan süreçte doku faktörü bu bağlantının ortaya çıkmasında rol oynayan en önemli molekül olmuştur. Zira doku faktörü bir yandan ekstrinsik koagülasyon yolağının başlatıcı molekülü iken diğer yandan PAR aracılığı ile bir sinyal kaskadını da başlatabilmektedir. Doku faktörünün bu sinyal yolağının sonunda özellikle integrinler ve hücre adezyon molekülleri ile de etkileşime geçerek kanser hücrelerinin invazyon ve metastazında da rol oynadığı belirlenmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar kanser hastalarında daha sonradan ortaya çıkabilecek tromboembolik komplikasyon risklerinin veya idiopatik venöz tromboz hastalarında daha sonradan malignant bir durumun ortaya çıkıp çıkmayacağının öngörülmesi açısından net bir bilgi vermemektedir. Bu noktadaki eksikliğin giderilmesine katkı sağlamak amacıyla yapılan bu tez çalışmasında, kanser, idiopatik venöz tromboz, kanser + tromboz ve sağlıklı kontrol bireylerde genom ebadında transkripsiyon analizi yapılarak bu patolojiler arasındaki bağlantı moleküler düzeyde incelenmiş ve bu amaçla 54675 adet transkript içeren HGU-133 plus 2.0 mikrodizinleri kullanılarak bu dört grup arasındaki genlerin ifade farklılıkları analiz edilmiştir. Böylece grupları birbirinden ayırabilecek moleküler bir imza profilinin olup olmadığı sorgulanmıştır.

Deneysel çalışmalardan sonra yapılan biyoinformatik analizlerin akış şeması Şekil 4.2'de verilmektedir. Yapılan ön analizler ve kalite kontrol analizlerinden sonra bu dört grup birbirleri karşılaştırılmış ve bu karşılaştırmalar sonucunda altı adet farklı ifade edilen gen listesi elde edilmiştir. Her bir listedeki toplam gen sayıları, bu genlerden kaç tanesinin ifadesinin artmış, kaç tanesinin ifadesinin azalmış oldukları ile ilgili veriler Çizelge 5.8'de verilmiştir.

VI.1. Kümeleme Analizleri

Çizelge 5.8'de görüldüğü üzere farklı ifade edilen gen sayıları 100 ila 400 arasında değişmektedir. Her bir karşılaştırmadan elde edilen bu gen listeleri kullanılarak dCHIP programı ile hiyerarşik kümeleme analizi yapılmıştır. Bu şekilde, bu genleri kullanarak yapılan bir kümeleme analizinde iki grubun birbirinden ayrılma durumu değerlendirilmiştir.

Şekil 5.4'de kanser ve kontrol grubu arasında 278 gen ile yapılan kümeleme analizi sonucunda elde edilen heatmap görülmektedir. Yapılan bu analiz sonucunda ***kanser ve kontrol grubu örneklerinin birbirlerinden % 100 oranında ayrılarak iki farklı profil sergileyen küme oluşturdukları görülmektedir.*** Kanser grubuna ait olan örnekler sağ tarafta kümelenirken kontrol grubu örnekleri sol tarafta kümelenmiştir.

Şekil 5.8'de ise ***tromboz ve kontrol*** grubu örneklerinin karşılaştırılması ile elde edilen heatmap görülmektedir. Şekil değerlendirildiğinde bu iki grubun listedeki ***331 gen ile % 100 oranında birbirlerinden ayrıldıkları görülmektedir.***

Şekil 5.5'de ise kanser ve kanser + tromboz grubu örnekleri arasında 147 gen ile yapılan kümeleme analizi sonucu görülmektedir. Şekildeki heatmap değerlendirildiğinde her iki grubun birbirinden farklı bir profil sergileyerek **% 80** oranında birbirlerinden ayrıldıkları görülmektedir. Özellikle kanser + tromboz grubu örnekleri açısından bakıldığında bu beklenmedik bir durum değildir. Bu gruptaki örnekler kanser ve venöz trombozun birlikte görüldüğü bireylerden oluşmaktadır. Yani bu grup heterojen bir gruptur ve her iki patolojinin de özelliklerini gösterebilen örnekler barındırmaktadır. Bu nedenle kümeleme analizi

sonucunda kanser + tromboz grubu örnekleri arasında kanser grubu ile kümelenen örnekler olabileceği gibi kanser grubu örnekleri arasında kanser + tromboz grubu ile kümelenen örnekler de olabilmektedir.

Buna benzer olarak Şekil 5.7 ve Şekil 5.9'da gösterilen heatmaplerde sırasıyla kanser + tromboz grubu ile kontrol grubu, kanser + tromboz grubu ile tromboz grubu karşılaştırılmıştır. Şekillerdeki heatmapler incelendiğinde yukarıda bahsedilen durumun burada da olduğu görülmektedir. Bu karşılaştırmalarda sırasıyla **% 77** ve **% 93** oranında bir kümelenme görülmektedir. Harita incelendiğinde ***grupların belirgin bir profil sergileyerek ayrı ayrı kümelendiği fakat bu kümelerin arasında karşı gruptan birkaç örneğin bulunduğu görülmektedir.***

Şekil 5.6'da kanser ve tromboz grubu örnekleri karşılaştırılarak 98 gen ile yapılan kümeleme analizinde grupların **% 83** oranında birbirlerinden ayrıldıkları görülmektedir. Şekil incelendiğinde tromboz ve kanser gruplarının kendine has bir ifade profili olduğu görülmektedir.

VI.2. Fonksiyonel Annotasyon Analizleri

Buraya kadar yapılan kalite kontrol analizleri, her bir probun ifade düzeyinin sayısal olarak belirlenmesi, grupların birbiri ile karşılaştırılmaları ve bu karşılaştırmalardan farklı ifade edilen gen listelerinin belirlenmesi dCHIP programı ile yapılan birinci basamak biyoinformatik analizlerdi. Bundan sonraki kısımda elde edilen farklı ifade edilen gen listelerinin yapılan karşılaştırmaya uygun olarak değerlendirilmesi ve yorumlanması gerekmektedir. Bu listelerde bulunan genler içerisinde benzer fonksiyona sahip olan, benzer yolaklarda rol oynayan genlerin olup olmadığı incelenmeli, ayrıca çalışmanın içeriği ve amacına uygun olmayan genlerin bu listelerden çıkarılması gerekir. Yukarıda da ifade edildiği üzere elde edilen bu listelerde yüzlerce gen bulunmaktadır. Bu kadar fazla sayıda genin tek tek yorumlanması ve yukarıda sayılan özelliklere sahip olup olmadıklarının belirlenmesi mümkün görünmemektedir. Bu amaçla ikinci aşama biyoinformatik analizlerde DAVID adı verilen bir program kullanılmıştır. Bu program ile ilgili bilgiler önceki bölümlerde verilmiştir. Kısaca, bu program ile

farklı ifade edilen gen listelerinde bulunan genleri fonksiyonlarına göre kümeleme, yolaklarını belirleme, hangi gen veya gen setlerinin benzer fonksiyona sahip olduğunu veya benzer yolaklarda rol aldığını belirleme imkanı bulunmaktadır. Ayrıca çalışma konumuzla ilgisi olmayan veya bizim için önemsiz olduğunu düşündüğümüz genleri de bu listelerden elemiş olacağız. Bu şekilde elimizdeki listeler bir kez daha filtre edilmiş olacak ve daha az sayıda gen içerecek şekilde yeniden düzenlenecektir. Bu şekilde elde edilen genler daha doğru bir şekilde yorumlanabilecektir. Yapılan bu tür çalışmalar aynı zamanda veri madenciliği olarak da adlandırılmaktadır.

Bu şekilde yapılan analiz sonucunda her bir gen listesinden elde edilen küme sayısı Çizelge 5.9'da gösterilmektedir. Çizelge 5.10'da ise her bir listeden elde edilen küme sayısı, bu kümelerin kaç tanesinin zenginleşme skorunun 1,3'den büyük olduğu ve bu kümeler içerisinde kaç adet gen bulunduğu özetlenmiştir.

Daha sonra yine DAVID programı kullanılarak bu listede bulunan gen veya gen setlerinin hangi yolaklarda rol oynadıklarını belirlemek için yolak analizi yapılmıştır. DAVID, KEGG ve BIOCARTA gibi veri tabanlarına bağlanarak yolak analizlenini bu veritabanları üzerinden yapmaktadır. Bu şekilde listedeki uygun genleri rol oynadıkları yolaklar üzerine yerleştirmektedir. Bu şekilde tüm yolak incelenebilmekte ve bizim ilgilendiğimiz gen veya genlerin yolağın neresinde bulunduğu belirlenebilmektedir.

Bu analiz sonucu elde edilen kümeler, kümelerin içerdiği genler ve sayıları ve bu genlerin hangi metabolik yolaklarda bulundukları bilgisi, büyük resmi görebilme ve yorumlayabilme amacıyla tablolar halinde özetlenmiştir. Her bir liste için oluşturulan bu tablolar, Çizelge 5.11-12-13-14-15 ve 16'da verilmiştir.

DAVID ile yapılan analizler sonucunda listelerde bulunan gen sayıları 100'ün altına düşmüştür. Bu rakamlar; kanser ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında 49, kanser ve tromboz gruplarının karşılaştırılmasında 38, kontrol ve kanser + tromboz gruplarının karşılaştırılmasında 59, tromboz ve kanser + tromboz gruplarının karşılaştırılmasında 20, tromboz ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında 73 ve kanser ve kanser + tromboz gruplarının

karşılaştırılmasında 40 olarak belirlenmiştir. Bu elemeden sonra elde edilen gen listeleri ile dCHIP programında tekrar kümeleme analizi yapılmıştır. Bu aşamada yapılan kümeleme analizinin amacı, yapılan eleme sonucunda elde edilen genler ile yani daha az sayıda gen kullanarak, gruplar arasında bir ayrım yapılabiliyor mu görmektir.

Daha az sayıda gen kullanarak gruplar arasında bir ayrım yapabiliyorsak spesifik moleküler imzanın belirlenmesinde kullanılacak genlerin seçiminde doğru bir yol izlediğimizi ifade edebiliriz. Yapılan kümeleme analizleri sonucunda elde edilen haritalar incelendiğinde, daha az sayıda gen ile hala bir ayrım yapabildiğimiz görünmektedir. Şekil 5.10'daki kanser ve kontrol grubunun karşılaştırılmasında grupların **49 gen ile % 90 oranında** birbirlerinden ayrıldıkları ve Şekil 5.14'deki kontrol ve tromboz gruplarının **73 gen ile % 100 oranında** birbirlerinden ayrı olarak kümelendikleri görülmektedir.

VI.3. Yolak Analizleri

DAVID ile yapılan analizlerde verilen listede bulunan genler için KEGG ve BIOCARTA gibi veri tabanları kullanılarak yolak analizi de yapılmaktadır. Yukarıda bahsedilen verilerin özetlendiği tablolarda bu yolak analizi sonuçları da verilmiştir. Aşağıdaki çizelgede ise hangi karşılaştırmada hangi metabolik yolakların öne çıktığı bilgisi verilmektedir.

Çizelge 6.1. İkili karşılaştırmalarda öne çıkan metabolik yolaklar.

Karşılaştırılan Gruplar	Belirlenen Metabolik Yolaklar
Kanser vs. Kontrol	Kanser Yolağı, Kemokin Sinyal Yolağı, Lökosit Transendotelyal Göçü, Axon Yönlendirme Yolağı
Kanser vs. KT	Hematopoietic Cell Lineage, Kanser Yolağı, Wnt Sinyal Yolağı, Apoptozis, Kemokin Sinyal Yolağı
Kanser vs. Tromboz	Aktin İskelet Regulasyonu, Prostat Kanser, NOD-like Reseptör Sinyal Yolağı, Kanser Yolağı
KT vs. Kontrol	Kanser Yolağı, Kolorektal Kanser Yolağı ve Hematopoietic Cell Lineage
Tromboz vs. Kontrol	Kanser, Prostat Kanser, Pankreas Kanser, VEGF, İnsülin Sinyal Yolağı, T Hücresi Sinyal Yolağı, NOD-like Reseptör Sinyal Yolağı
Tromboz vs. KT	Prostat Kanser, Nörotropin Sinyal Yolağı

Daha sonra bu tablolar değerlendirilerek belli kriterlere uyan genler seçilmiştir. Bu kriterlere göre herhangi bir yolakta bulunan genler, gruplar arasındaki ifade düzeyi değişimi 2 kat ve üstü olan genler ve DAVID ile yapılan fonksiyonel kümeleme analizinde ikiden fazla kümede bulunan genler belirlenmiştir. Belirlenen bu genlerin listesi Çizelge 5.17'de verilmektedir. Bu şekilde tüm tablolar

değerlendirilmiş ve toplamda tüm gruplar için 135 gen belirlenmiştir. Daha sonra bu liste incelenerek birden fazla gen listesinde bulunan genler ve karşılaştırılan ***gruplar arasındaki kat değişimi belirli bir korelasyon gösteren genler*** belirlenmiştir. Bu şekilde belirlenen genler ve gruplar arasındaki kat değişimleri Çizelge 5.18, 5.19 ve 5.20'de verilmiştir. **Bu çizelgeler incelendiğinde 26 adet özgün gen olduğu belirlenmiştir.** Yapılan literatür incelemesi sonucunda bu genlerden çalışmamızla ilgili olmadığı belirlenen 6 gen çıkarılmıştır. Sonuç olarak 20 adet gen belirlenmiş ve herbir gruptan 7 örnek kullanılarak QRT-PCR validasyonu yapılmıştır. Validasyon sonucunda 20 genden sadece ***CASPASE8*** **geni $p < 0.05$ için anlamlı bulunmuştur.** Sadece bir gen valide edilebildiği için ikinci bir seri validasyona ihtiyaç duyulmuş ve 10 adet gen daha seçilmiştir. İkinci validasyon reaksiyonları için herbir gruptan bu defa 12 örnek seçilmiştir. İkinci defa yapılan validasyonda ise **$p < 0.05$ için *CEACAM8, HSP90B1 ve IKBKB* genleri anlamlı bulunmuştur.**

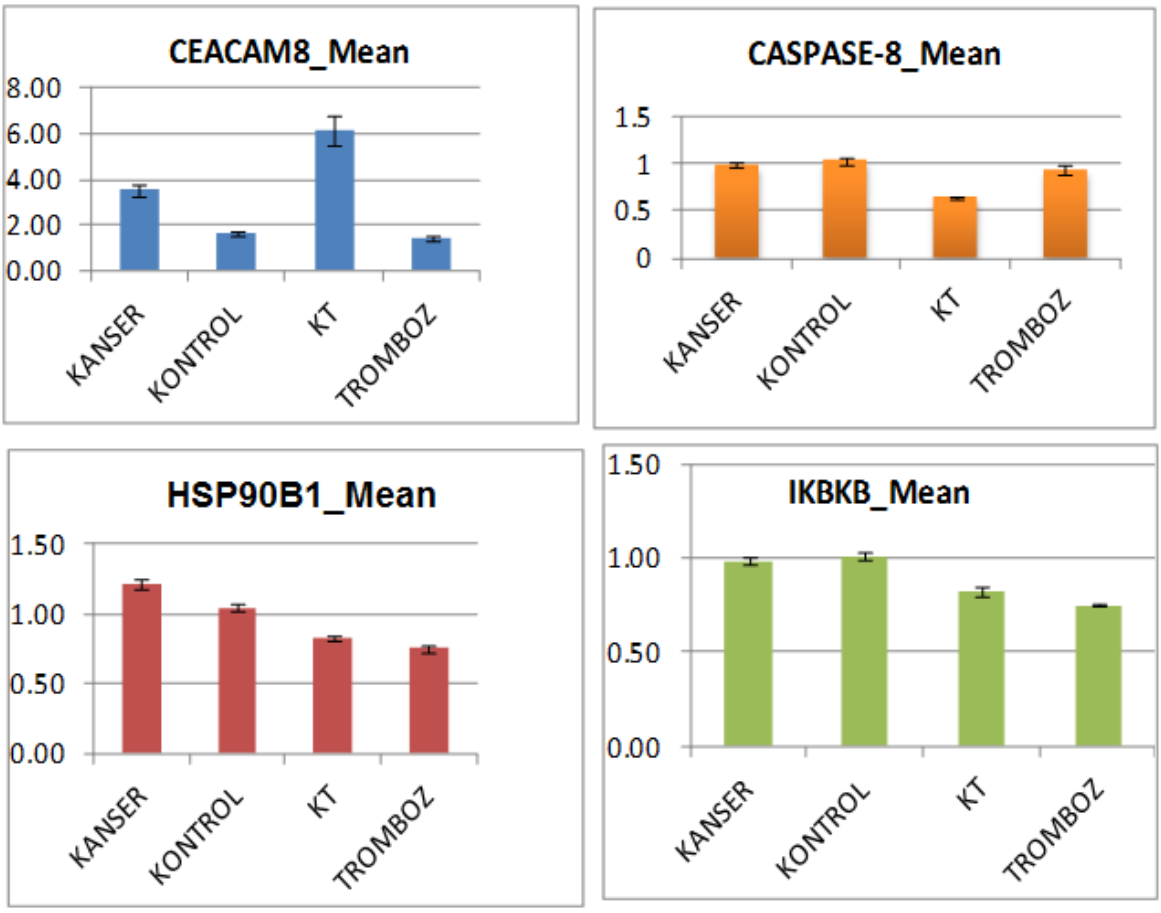
İlk aşamada yapılan validasyon reaksiyonlarında sadece bir genin valide olmasının kullanılan örnek sayısına bağlı olduğu düşünülmüştür. İkinci defa yapılan validasyonda örnek sayısı arttırıldığı için daha fazla gen valide olmuş ve yapılan istatistiksel analizin gücü artmıştır.

Anlamlı bulunan genlerden biri olan ***CEACAM8 (Carcinoembrionic antigen related cell adhesion molecule 8)*** hücre adezyonu, migrasyonu, sinyal iletimi, nötrofil göçü ve gen ifadesinin regülasyonu gibi görevlerde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda CEACAM8 geninin ALL blast hücrelerinde fazla miktarda ifade edildiğini ve bu ifade düzeyindeki artışın tümör hücrelerine avantaj sağladığı düşünülmektedir (163). Yaptığımız biyoinformatik analizler sonucunda *CEACAM8* geninin kanser vs. KT ve tromboz vs. KT ikili karşılaştırmalarında farklı ifade edildiği, ifade düzeyinin KT grubunda Kanser ve Tromboz grubuna göre yaklaşık 2,5 kat arttığı belirlendi. Şekil 6.1 incelendiğinde bizim yaptığımız çalışmada bu genin KT ve kanser grubunda ifadesinin arttığı görülmektedir.

CASPASE8 ve IKBKB genleri ise Toll-like receptor sinyal yolağında rol oynayan genlerdir. *CASPASE8* özellikle apoptozis mekanizmasında *IKBKB* ise doğal bağışıklık yanıtında yani inflamasyon yolağında rol oynamaktadır. *CASPASE8* geninin kanser vs. kontrol karşılaştırmasında ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir.

Malignant fenotipte apoptozisin baskılanması beklenen bir durumdur. Ancak kanser vs. KT karşılaştırılmasında *CASPASE8* geninin ifadesi KT grubunda 1,48 kat artmıştır. *IKBKB* geninin ifade düzeyi ise tromboz vs. kontrol karşılaştırmasında tromboz grubunda 2,17 kat artmıştır. Bu durum kanserde olduğu gibi tromboz durumunda da inflamasyonun aktive olabileceğini düşündürmektedir.

HSP90B1 ısı şok proteinleri protein katlanmasında rol oynayan stres proteinleridir. Bu proteinlerin tümör mikroçevresinin regülasyonunda ve neoplastik süreçte rol oynadıkları, özellikle *HSP90B1*'in meme kanserinde uzak metastazların ve genel sağkalım oranlarının değerlendirilmesinde kullanılabilecek bir biyomarkır adayı olabileceği ileri sürülmüştür (164). Bizim çalışmamızda ise şekil 6.1 incelendiğinde bu genin kanser grubunda yüksek düzeyde ifade edildiği görülecektir. Çizelge 4.3 incelendiğinde kanser grubunda bulunan örneklerin yaklaşık % 90'ı meme kanseridir. Bu planlanmış bir durum olmayıp tamamen ortak çalışılan ve kan örneklerinin gönderildiği merkezden kaynaklanan bir durumdur. Meme kanserinde venöz tromboz görülme riski diğer adenokarsinomlara nazaran daha düşüktür, yani meme kanseri daha az trombojenik özellik gösteren bir kanser türüdür (123). Böyle bir örnek grubunda kanser ile venöz tromboz arasındaki moleküler bir bağlantının incelenmesi bir avantaj olarak da değerlendirilebilir.



Şekil 6.1 QRT-PCR validasyonu sonucunda istatistiksel olarak anlamlı çıkan dört genin herbir gruptaki ifade düzeyleri (Hata çubuklarında *Standart Error* değerleri kullanılmıştır).

VII. SONUÇ VE ÖNERİLER

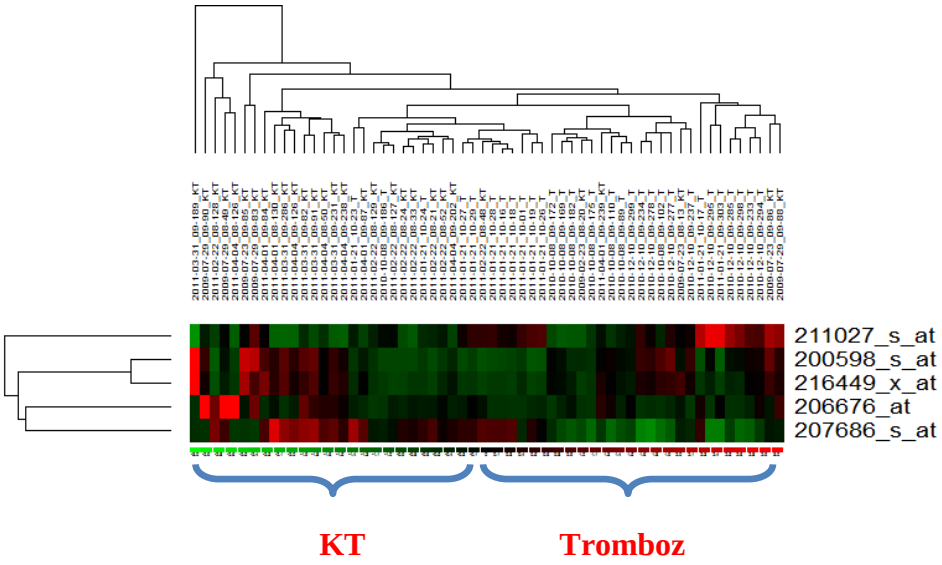
Çizelge 6.1 incelendiğinde Kanser vs. Kontrol, Kanser vs. KT, Kanser vs. Tromboz ve Tromboz vs. KT ikili karşılaştırmalarında Kanser yolağı, Kemokin sinyal yolağı, Wnt sinyal yolağı, Prostat kanser yolağı vb. yolakların öne çıkması beklenen bir durumdur. Çünkü bu örnek grupları içerisinde kanser teşhisi almış bireyler bulunmaktadır. Yukarıda bahsedilen yolakların da neoplastik süreçte aktive olan yolaklar oldukları bilinmektedir. Ancak Tromboz vs. Kontrol ikili karşılaştırmasında yoğun olarak Kanser yolağı, Prostat kanser yolağı, Pankreas kanser yolağının öne çıkması şaşırtıcı bir durumdur. Çünkü ne idiopatik venöz tromboz grubunda ne de kontrol grubunda kanser teşhis edilmiş hiçbir birey bulunmamaktadır. Aynı zamanda bu ikili karşılaştırmadan elde edilen gen listesine de bakılacak olursa, bu listede kanserle ilişkilendirilmiş birçok genin bulunduğu görülecektir. Örneğin *HSP90B1, JAK1, CDC42, K-RAS, RUNX1, IKBKB, RTKN* ve *MAPK11* genleri listede öne çıkan ve yolak analizlerinde kanserle ilgili yolaklara oturan genlerdir.

Böyle bir durumda ilk akla gelen düşünce idiopatik venöz tromboz ortaya çıktığında aslında preneoplastik sürecinde başlamış olabileceğidir. Ancak o zaman şu soru akla gelmektedir. Neden tüm idiopatik venöz tromboz hastalarında sonraki dönemde kanser teşhis edilmemektedir ?

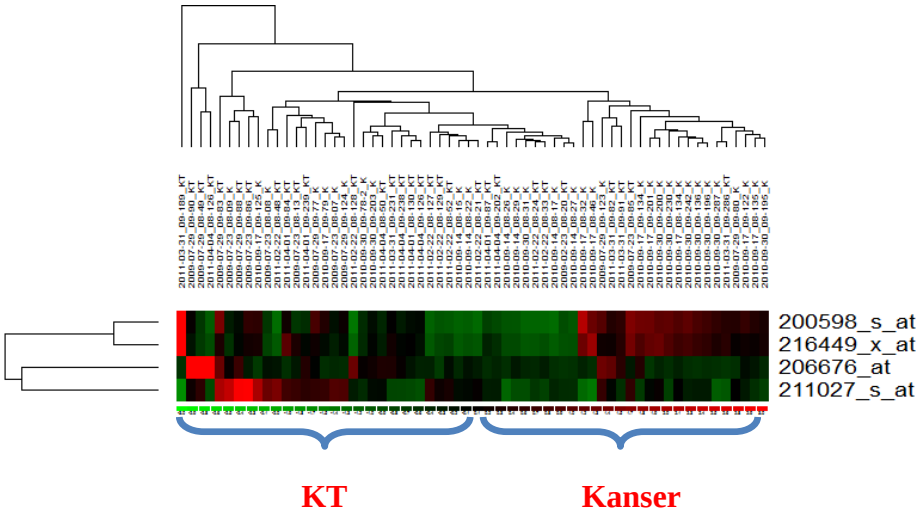
Neoplastik süreç çok farklı basamaklar ve farklı yolaklar üzerinden aktive olabilmektedir. Bu süreç sırasında aktive olan yolakların doğal bağışıklık yanıtını, inflamasyon yolağını veya tromboembolik süreci aktive edebilmesi mümkündür.

Yapılan çalışma sonucunda Kanser ve Tromboz arasındaki ilişki global ifade profillemesi yolu ile analiz edilmiştir. Yapılan biyoinformatik analizler ve veri madenciliği sonrasında elimizde gruplar arasında farklı ifade edilen genlerin bulunduğu bir veri seti bulunmaktadır. Bu süreçte gerek zaman gerekse finansal durumlar nedeniyle listede bulunan tüm genlerin validasyonu gerçekleştirilememiştir. Ancak bundan sonraki süreçte belirli yolaklarda bulunan genlerin farklı bir örnek grubundaki ifade düzeyleri analiz edilerek bu patolojilerde hangi yolakların aktive olabileceği veya hangi yolakların birbiri ile etkileşimde olabileceği belirlenebilir.

Bu çalışma sonucunda QRT-PCR ile valide ettiğimiz dört geni kullanarak gruplar arasında bir ayrım yapılıp yapılamayacağını görmek adına son bir kümeleme analizi yapıldı. Bu analizler sonucunda elde edilen haritalar aşağıda gösterilmektedir. Şekil 7.1'de görüldüğü üzere tromboz ve KT grupları **% 80 oranında ayrı ayrı kümelenmekte**, Şekil 7.2'de ise kanser ve KT grupları **% 77 oranında** ayrı ayrı kümelenmektedir. Bu kümelenme her ne kadar % 100 olmasa da bu dört gen ile bir moleküler profil elde edilebilmektedir. Bu genlerin biyomarkır adayı olarak değerlendirilebilmesi için farklı bir örnek grubunda valide edilmesi gerekmektedir.



Şekil 7.1. Tromboz ve KT gruplarının valide edilen dört gen ile yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu.



Şekil 7.2. Kanser ve KT gruplarının valide edilen üç gen ile yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu.

Yapılan bu tez çalışmasında genom ebadında ifade profillemesi yaparak 4 grup arasında ifade düzeyleri anlamlı şekilde artan veya azalan genlerin bulunması ve bulunan bu genleri kullanarak gruplar arasında spesifik bir profil olup olmadığının tespit edilmesi, bu imza profilini kullanarak grupların birbirinden ayrılabilmesi amaçlanmıştır. Mikrodizin çalışması ile hedefimiz tüm genomdan bir kaç yüz gene indirildi. Bu gen listesinden de toplamda 30 gen seçilip QRT-PCR ile validasyon yapıldı.

Nihayetinde bu 30 genden 4 tanesi istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu 4 genden 2 tanesi mikrodizin sonuçlarını valide ederken 2 tanesi valide etmedi. Mikrodizinde elde edilen artış ve azalış durumlarının bu iki gende QRT-PCR ile korele olmaması çok olumsuz bir durum değildir. Nihayetinde, bu genlerin mikrodizin sonuçlarında olduğu gibi gruplar arasında kat değişimi açısından anlamlı bir değişim gösterdiği valide edilmiş oldu.

Sonuç olarak mikrodizinden elde edilen ifade değerleri ve kat değişimleri çok güvenilir olmadığından sonuçların QRT-PCR ile valide edilmesi elzemdir. Bizim elde ettiğimiz değerlere göre bu 4 gen gruplar arasında farklı ifade edilmiş, belli bir kat değişimi göstermiş ve bu kat değişimleri yapılan istatistiksel analiz sonucunda anlamlı bulunmuştur.. Bu 4 geni kullanarak yaptığımız kümeleme analizi ile de Kanser, KT ve Tromboz gruplarını yüksek oranda birbirlerinden ayırabildiğimiz belirlenmiştir.

Bundan sonraki süreçte ise bağımsız bir örnek grubunda valide edilen bu genler ve ilave edilecek başka genler ile biyobelirteç tanımlama yolunda çalışmalara devam edilecektir.

KAYNAKLAR

1. Wun T, White RH. Venous thromboembolism (VTE) in patients with cancer: epidemiology and risk factors. Cancer Invest. 2009;27 Suppl 1:63-74.

2. Goldhaber SZ, Bounameaux H. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis. Lancet. 2012 May 12;379(9828):1835-46.

3. Baron JA, Gridley G, Weiderpass E, Nyren O, Linet M. Venous thromboembolism and cancer. Lancet. 1998 Apr 11;351(9109):1077-80.

4. Anisimov VN. Biology of aging and cancer. Cancer Control. 2007 Jan;14(1):23-31.

5. Peto R, Parish SE, Gray RG. There is no such thing as ageing, and cancer is not related to it. IARC Sci Publ. 1985(58):43-53.

6. Frei E, Holland JF. Cancer medicine-5 review : a companion to Holland-Frei Cancer medicine-5. Hamilton, Ont. ; Lewiston, NY: B.C. Decker; 2000.

7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

8. Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer. J Biochem Mol Biol. 2003 Jan 31;36(1):60-5.

9. van Heemst D, den Reijer PM, Westendorp RG. Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers. Eur J Cancer. 2007 Oct;43(15):2144-52.

10. Memorial University of Newfoundland. 2013 [cited; Available from:

11. Yokota J. Tumor progression and metastasis. Carcinogenesis. 2000 Mar;21(3):497-503.

12. Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. Nature. 2002 Aug 22;418(6900):823.

13. Kleinsmith LJ. Principles of cancer biology. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2006.

14. Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG. Molecular biology of cancer. 2nd ed. London ; New York, N.Y.: BIOS Scientific Publishers; 2004.

15. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. Science. 1991 Jul 5;253(5015):49-53.

16. Bertram JS. The molecular biology of cancer. Mol Aspects Med. 2000 Dec;21(6):167-223.

17. Vogelstein B, Kinzler KW. The genetic basis of human cancer. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2002.

18. Lawen A. Apoptosis-an introduction. Bioessays. 2003 Sep;25(9):888-96.

19. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer. 1994 Apr 15;73(8):2013-26.

20. Bishopric NH, Andreka P, Slepak T, Webster KA. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. Curr Opin Pharmacol. 2001 Apr;1(2):141-50.

21. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Sep;8(9):729-40.

22. Caino MC, Meshki J, Kazanietz MG. Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players. Apoptosis. 2009 Apr;14(4):392-408.

23. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. Cell. 2001 Sep 21;106(6):661-73.

24. Hunter KW, Crawford NP, Alsarraj J. Mechanisms of metastasis. Breast Cancer Res. 2008;10 Suppl 1:S2.

25. Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003 Jun 24;100(13):7737-42.

26. Butler TP, Gullino PM. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. Cancer research. 1975 Mar;35(3):512-6.

27. Weiss L, Nannmark U, Johansson BR, Bagge U. Lethal deformation of cancer cells in the microcirculation: a potential rate regulator of hematogenous metastasis. Int J Cancer. 1992 Jan 2;50(1):103-7.

28. Riethmuller G, Klein CA. Early cancer cell dissemination and late metastatic relapse: clinical reflections and biological approaches to the dormancy problem in patients. Semin Cancer Biol. 2001 Aug;11(4):307-11.

29. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. Am J Pathol. 1998 Sep;153(3):865-73.

30. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol. 2002 May;282(5):C947-70.

31. Rafii S, Heissig B, Hattori K. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. Gene Ther. 2002 May;9(10):631-41.

32. Hattori K, Heissig B, Wu Y, et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. Nat Med. 2002 Aug;8(8):841-9.

33. Hattori K, Dias S, Heissig B, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. The Journal of experimental medicine. 2001 May 7;193(9):1005-14.

34. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer. 2003 Jun;3(6):401-10.

35. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D. Clotting mechanisms and cancer: implications in thrombus formation and tumor progression. Clin Adv Hematol Oncol. 2003 Nov;1(11):673-8.

36. Luxembourg B, Bauersachs R. [Malignancy and thrombosis: a double-sided clinical relationship]. Vasa. 2005 Nov;34(4):225-34.

37. Atamer T. Temel Hemostaz Tromboz Kursu. Türk Hematoloji Derneği. Zonguldak: Türk Hematoloji Derneği; 2008.

38. Kumar V, Robbins SL. Robbins basic pathology. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2007.

39. Seegers WH. Basic enzymology of blood coagulation. Thromb Diath Haemorrh. 1965 Sep 1;14(1-2):213-28.

40. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. Science. 1964 Sep 18;145(3638):1310-2.

41. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. Nature. 1964 May 2;202:498-9.

42. Davie EW. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. J Biol Chem. 2003 Dec 19;278(51):50819-32.

43. McMichael M. New models of hemostasis. Topics in companion animal medicine. 2012 May;27(2):40-5.

44. Smith SA. The cell-based model of coagulation. Journal of veterinary emergency and critical care. 2009 Feb;19(1):3-10.

45. Mann KG, Krishnaswamy S, Lawson JH. Surface-dependent hemostasis. Seminars in hematology. 1992 Jul;29(3):213-26.

46. Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cosemans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2013 Jan;11(1):2-16.

47. Gailani D, Renne T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2007 Jun;5(6):1106-12.

48. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. Physiol Rev. 2013 Jan;93(1):327-58.

49. Guyton A, Hall, JE. Tıbbi Fizyoloji. 10 ed: Nobel Tıp Kitapevi; 2001.

50. Hyers TM. Venous thromboembolism. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Jan;159(1):1-14.

51. Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: a question of attribution. Br J Haematol. 2008 Oct;143(2):180-90.

52. Battinelli EM, Murphy DL, Connors JM. Venous thromboembolism overview. Hematol Oncol Clin North Am. 2012 Apr;26(2):345-67, ix.

53. Grossman AB, Sowa, M. A Closer Look At Deep Vein Thrombosis. 2004 [cited; Available from:

54. Kottke-Marchant K, Duncan A. Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis. Arch Pathol Lab Med. 2002 Nov;126(11):1326-36.

55. Perry DJ, Carrell RW. Molecular genetics of human antithrombin deficiency. Hum Mutat. 1996;7(1):7-22.

56. Bock SC, Levitan DJ. Characterization of an unusual DNA length polymorphism 5' to the human antithrombin III gene. Nucleic Acids Res. 1983 Dec 20;11(24):8569-82.

57. Esmon CT. The protein C pathway. Chest. 2003 Sep;124(3 Suppl):26S-32S.

58. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. J Clin Invest. 1981 Nov;68(5):1370-3.

59. Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, et al. Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. On behalf of the Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. Thromb Haemost. 1995 May;73(5):876-89.

60. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, et al. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. Thromb Haemost. 1995 Jan;73(1):87-93.

61. Garcia de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. Thromb Haemost. 2007 Sep;98(3):543-56.

62. Anderson JA, Weitz JI. Hypercoagulable states. Crit Care Clin. 2011 Oct;27(4):933-52, vii.

63. Dahlback B. The discovery of activated protein C resistance. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2003 Jan;1(1):3-9.

64. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993 Feb 1;90(3):1004-8.

65. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature. 1994 May 5;369(6475):64-7.

66. Camire RM, Kalafatis M, Cushman M, Tracy RP, Mann KG, Tracy PB. The mechanism of inactivation of human platelet factor Va from normal and activated protein C-resistant individuals. J Biol Chem. 1995 Sep 1;270(35):20794-800.

67. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood. 1996 Nov 15;88(10):3698-703.

68. Kraaijenhagen RA, in't Anker PS, Koopman MM, et al. High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. Thromb Haemost. 2000 Jan;83(1):5-9.

69. Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. Lancet. 1995 Jan 21;345(8943):152-5.

70. Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. N Engl J Med. 2000 Mar 9;342(10):696-701.

71. van Hylckama Vlieg A, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. Blood. 2000 Jun 15;95(12):3678-82.

72. Anderson FA, Jr., Spencer FA. Risk factors for venous thromboembolism. Circulation. 2003 Jun 17;107(23 Suppl 1):I9-16.

73. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism. Semin Thromb Hemost. 2006 Oct;32(7):716-23.

74. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet. 1995 May;10(1):111-3.

75. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. Am J Hum Genet. 1988 Oct;43(4):414-21.

76. den Heijer M, Koster T, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. N Engl J Med. 1996 Mar 21;334(12):759-62.

77. Lee AY, Levine MN. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. Circulation. 2003 Jun 17;107(23 Suppl 1):I17-21.

78. Trousseau A. Plegmasia alba dolens. Lectures on Clinical Medicine. 1865;5:281-332.

79. Billroth T. Lectures on surgical pathology and therapeutics: a handbook for students and practitioners. 8th. Edition ed. London: The New Sydenham Society; 1878.

80. Illtyd James T. MN. Thrombophlebitis in cancer. Practitioner. 1935;134(683-4).

81. Aderka D, Brown A, Zelikovski A, Pinkhas J. Idiopathic deep vein thrombosis in an apparently healthy patient as a premonitory sign of occult cancer. Cancer 1986 May 1 [cited 57 9]; 1986/05/01:[1846-9]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3955523

82. Goldberg RJ, Seneff M, Gore JM, et al. Occult malignant neoplasm in patients with deep venous thrombosis. Arch Intern Med. 1987 Feb;147(2):251-3.

83. Monreal M, Lafoz E, Casals A, et al. Occult cancer in patients with deep venous thrombosis. A systematic approach. Cancer. 1991 Jan 15;67(2):541-5.

84. Sorensen HT, Mellemkjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. N Engl J Med. 2000 Dec 21;343(25):1846-50.

85. Mandala M, Ferretti G, Cremonesi M, Cazzaniga M, Curigliano G, Barni S. Venous thromboembolism and cancer: new issues for an old topic. Crit Rev Oncol Hematol. 2003 Oct;48(1):65-80.

86. Falanga A, Panova-Noeva M, Russo L. Procoagulant mechanisms in tumour cells. Best practice & research Clinical haematology. 2009 Mar;22(1):49-60.

87. Noble S, Pasi J. Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. British journal of cancer. 2010 Apr 13;102 Suppl 1:S2-9.

88. Pineo GF, Brain MC, Gallus AS, Hirsh J, Hatton MW, Regoeczi E. Tumors, mucus production, and hypercoagulability. Ann N Y Acad Sci. 1974;230:262-70.

89. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. Nat Rev Cancer. 2004 Jan;4(1):45-60.

90. Kim YJ, Borsig L, Han HL, Varki NM, Varki A. Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium. Am J Pathol. 1999 Aug;155(2):461-72.

91. Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A. Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. J Clin Invest. 2003 Sep;112(6):853-62.

92. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998 Aug 4;95(16):9325-30.

93. Komatsu M, Arango ME, Carraway KL. Synthesis and secretion of Muc4/sialomucin complex: implication of intracellular proteolysis. Biochem J. 2002 Nov 15;368(Pt 1):41-8.

94. Chen M, Geng JG. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 2006 Mar-Apr;54(2):75-84.

95. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. Nature. 1992 Oct 29;359(6398):848-51.

96. Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. The Journal of experimental medicine. 2003 Jun 2;197(11):1585-98.

97. Komiyama Y, Pedersen AH, Kisiel W. Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. Biochemistry. 1990 Oct 9;29(40):9418-25.

98. Eiseman G, Stefanini M. Thromboplastic activity of leukemic white cells. Proc Soc Exp Biol Med. 1954 Aug-Sep;86(4):763-5.

99. Rao LV. Tissue factor as a tumor procoagulant. Cancer Metastasis Rev. 1992 Nov;11(3-4):249-66.

100. Shoji M, Hancock WW, Abe K, et al. Activation of coagulation and angiogenesis in cancer: immunohistochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. Am J Pathol. 1998 Feb;152(2):399-411.

101. Khorana AA, Ahrendt SA, Ryan CK, et al. Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2007 May 15;13(10):2870-5.

102. Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. Cancer. 1996 May 1;77(9):1877-83.

103. Kakkar AK, Lemoine NR, Scully MF, Tebbutt S, Williamson RC. Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. Br J Surg. 1995 Aug;82(8):1101-4.

104. Lima LG, Monteiro RQ. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression. Bioscience reports. 2013;33(5).

105. Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, et al. Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. Blood. 2004 Apr 15;103(8):3029-37.

106. Li A, Varney ML, Valasek J, Godfrey M, Dave BJ, Singh RK. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. Angiogenesis. 2005;8(1):63-71.

107. Unlu B, Versteeg HH. Effects of tumor-expressed coagulation factors on cancer progression and venous thrombosis: is there a key factor? Thrombosis research. 2014 May;133 Suppl 2:S76-84.

108. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. Br J Haematol. 1967 May;13(3):269-88.

109. Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, et al. Tumor shedding and coagulation. Science. 1981 May 22;212(4497):923-4.

110. Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2003 Dec;1(12):2561-8.

111. Carr JM, Dvorak AM, Dvorak HF. Circulating membrane vesicles in leukemic blood. Cancer research. 1985 Nov;45(11 Pt 2):5944-51.

112. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2007 Mar;5(3):520-7.

113. Owens AP, 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. Circulation research. 2011 May 13;108(10):1284-97.

114. Gordon SG, Mourad AM. The site of activation of factor X by cancer procoagulant. Blood Coagul Fibrinolysis. 1991 Dec;2(6):735-9.

115. Mielicki WP, Gordon SG. Three-stage chromogenic assay for the analysis of activation properties of factor X by cancer procoagulant. Blood Coagul Fibrinolysis. 1993 Jun;4(3):441-6.

116. Gordon SG, Franks JJ, Lewis BJ. Comparison of procoagulant activities in extracts of normal and malignant human tissue. J Natl Cancer Inst. 1979 Apr;62(4):773-6.

117. Mielicki W, Serwa J, Kurzawinski T, Wierzbicki R. Procoagulant activity of human stomach and colon cancers. Oncology. 1990;47(4):299-302.

118. Gordon SG, Benson B. Analysis of serum cancer procoagulant activity and its possible use as a tumor marker. Thrombosis research. 1989 Nov 1;56(3):431-40.

119. Alessio MG, Falanga A, Consonni R, et al. Cancer procoagulant in acute lymphoblastic leukemia. Eur J Haematol. 1990 Aug;45(2):78-81.

120. Zwicker JI, Furie BC, Furie B. Cancer-associated thrombosis. Crit Rev Oncol Hematol. 2007 May;62(2):126-36.

121. Buller HR, van Doormaal FF, van Sluis GL, Kamphuisen PW. Cancer and thrombosis: from molecular mechanisms to clinical presentations. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. 2007 Jul;5 Suppl 1:246-54.

122. Rickles FR, Falanga A. Activation of clotting factors in cancer. Cancer Treat Res. 2009;148:31-41.

123. Wun T, White RH. Epidemiology of cancer-related venous thromboembolism. Best practice & research Clinical haematology. 2009 Mar;22(1):9-23.

124. Garnier D, Magnus N, D'Asti E, et al. Genetic pathways linking hemostasis and cancer. Thrombosis research. 2012 Apr;129 Suppl 1:S22-9.

125. Yu JL, May L, Lhotak V, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. Blood. 2005 Feb 15;105(4):1734-41.

126. Boccaccio C, Comoglio PM. Genetic link between cancer and thrombosis. J Clin Oncol. 2009 Oct 10;27(29):4827-33.

127. Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. Cancer research. 2005 Feb 15;65(4):1406-13.

128. Rak J, Yu JL, Luyendyk J, Mackman N. Oncogenes, trousseau syndrome, and cancer-related changes in the coagulome of mice and humans. Cancer research. 2006 Nov 15;66(22):10643-6.

129. van den Berg YW, Osanto S, Reitsma PH, Versteeg HH. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. Blood. 2012 Jan 26;119(4):924-32.

130. Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1988 Dec;85(24):9533-7.

131. Denko NC, Giaccia AJ. Tumor hypoxia, the physiological link between Trousseau's syndrome (carcinoma-induced coagulopathy) and metastasis. Cancer research. 2001 Feb 1;61(3):795-8.

132. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. Cancer cell. 2003 Apr;3(4):347-61.

133. Boccaccio C, Sabatino G, Medico E, et al. The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. Nature. 2005 Mar 17;434(7031):396-400.

134. Palumbo JS. Mechanisms linking tumor cell-associated procoagulant function to tumor dissemination. Semin Thromb Hemost. 2008 Mar;34(2):154-60.

135. Versteeg HH, Ruf W. Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. Semin Thromb Hemost. 2006 Feb;32(1):24-32.

136. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. Nat Med. 2004 May;10(5):502-9.

137 Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and protease-activated receptor signaling in cancer. Semin Thromb Hemost. 2008 Mar;34(2):147-53.

138. Radjabi AR, Sawada K, Jagadeeswaran S, et al. Thrombin induces tumor invasion through the induction and association of matrix metalloproteinase-9 and beta1-integrin on the cell surface. J Biol Chem. 2008 Feb 1;283(5):2822-34.

139. Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM. Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. Mol Cancer Res. 2004 Jul;2(7):395-402.

140. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. 1975 Nov 5;98(3):503-17.

141. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science. 1995 Oct 20;270(5235):467-70.

142. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science. 1991 Feb 15;251(4995):767-73.

143. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nat Biotechnol. 1996 Dec;14(13):1675-80.

144. Russell S, Meadows, LA., Russell, RR. Microarray Technology in Practice. Cambridge, UK.: Academic Press; 2009.

145. Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. Nat Genet. 1999 Jan;21(1 Suppl):20-4.

146. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, et al. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast Saccharomyces cerevisiae by microarray hybridization. Mol Biol Cell. 1998 Dec;9(12):3273-97.

147. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. Science. 1999 Jan 1;283(5398):83-7.

148. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.

149. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature. 2002 Jan 31;415(6871):530-6.

150. Naef F, Magnasco MO. Solving the riddle of the bright mismatches: labeling and effective binding in oligonucleotide arrays. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. 2003 Jul;68(1 Pt 1):011906.

151. Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001 Jan 2;98(1):31-6.

152. Hackstadt AJ, Hess AM. Filtering for increased power for microarray data analysis. BMC Bioinformatics. 2009;10:11.

153. Zeeberg BR, Qin H, Narasimhan S, et al. High-Throughput GoMiner, an 'industrial-strength' integrative gene ontology tool for interpretation of multiple-microarray experiments, with application to studies of Common Variable Immune Deficiency (CVID). BMC Bioinformatics. 2005;6:168.

154. Beissbarth T, Speed TP. GOstat: find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes. Bioinformatics. 2004 Jun 12;20(9):1464-5.

155 Khatri P, Bhavsar P, Bawa G, Draghici S. Onto-Tools: an ensemble of web-accessible, ontology-based tools for the functional design and interpretation of high-throughput gene expression experiments. Nucleic Acids Res. 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W449-56.

156. Martin D, Brun C, Remy E, Mouren P, Thieffry D, Jacq B. GOToolBox: functional analysis of gene datasets based on Gene Ontology. Genome Biol. 2004;5(12):R101.

157. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005 Oct 25;102(43):15545-50.

158. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biol. 2003;4(5):P3.

159. Huang da W, Sherman BT, Tan Q, et al. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. Nucleic Acids Res. 2007 Jul;35(Web Server issue):W169-75.

160. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc. 2009;4(1):44-57.

161. Stamova BS, Apperson M, Walker WL, et al. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood. BMC Med Genomics. 2009;2:49.

162. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45.

163. Lasa A, Serrano E, Carricondo M, et al. High expression of CEACAM6 and CEACAM8 mRNA in acute lymphoblastic leukemias. Annals of hematology. 2008 Mar;87(3):205-11.

164. Cawthorn TR, Moreno JC, Dharsee M, et al. Proteomic analyses reveal high expression of decorin and endoplasmin (HSP90B1) are associated with breast cancer metastasis and decreased survival. PloS one. 2012;7(2):e30992.

EKLER

Ek- 1: Farklı ifade edilen gen listeleri

Kanser ve Kontrol grubunda farklı ifade edilen gen listesi.

Affy ID	Baseline Ortalama	Experiment Ortalama	Kat Değişimi	t istatistik	p değeri
1558048_x_at	64.28	495.77	7.71	2.268	0.030937
221419_s_at	226.28	559.52	2.47	4.672	0.000028
220561_at	95.44	219.81	2.3	3.421	0.0016
213350_at	271.88	613.38	2.26	5.9	0.000001
226811_at	1043.5	2295	2.2	3.552	0.00101
232610_at	132.26	290.31	2.2	3.343	0.002144
228527_s_at	110.43	239.23	2.17	5.693	0.000003
207166_at	34.79	73.41	2.11	8.604	0
1562240_at	51.34	107.94	2.1	4.913	0.000021
1570033_at	46.96	98.35	2.09	3.144	0.003244
230698_at	31.05	64.44	2.08	6.052	0
228269_x_at	128.56	265.89	2.07	3.456	0.001537
217878_s_at	228.38	470.02	2.06	5.246	0.000003
219672_at	884.3	1820.06	2.06	3.144	0.003467
226675_s_at	191.57	391.3	2.04	3.026	0.004826
225025_at	107.46	218.36	2.03	3.762	0.000636
226928_x_at	108.94	220.39	2.02	5.912	0.000001
206352_s_at	90.2	178.35	1.98	3.591	0.000884
211074_at	905.37	1789.3	1.98	5.614	0.000002
211190_x_at	129.36	255.48	1.98	3.531	0.001096
1552484_at	65.04	128.95	1.98	3.073	0.004002
1553721_at	32.42	64.03	1.98	6.76	0
1564277_a_at	200.05	396.68	1.98	4.697	0.00004
210321_at	1043.42	2032.58	1.95	3.297	0.002306
1569200_at	323.83	631.54	1.95	3.999	0.000345
232966_at	91.7	177.93	1.94	3.617	0.000896
1564544_x_at	80.79	156.97	1.94	3.835	0.000474
228520_s_at	84.51	162.84	1.93	9.369	0

210035_s_at	25.64	48.91	1.91	6.567	0
1559616_x_at	163.8	311.09	1.9	4.103	0.00023
238667_at	113.62	214.68	1.89	4.467	0.000089
220314_at	115.55	215.56	1.87	4.685	0.000037
1565900_at	26.92	50.32	1.87	3.431	0.001528
1555558_at	19.66	36.58	1.86	6.64	0
1562892_at	65.32	121.57	1.86	5.53	0.000002
208605_s_at	68.67	126.5	1.84	6.618	0
229717_at	108.95	200.59	1.84	3.548	0.001129
1554375_a_at	26.31	48.23	1.83	5.038	0.000009
220183_s_at	88.31	160.45	1.82	3.677	0.000856
207617_at	68.52	124.05	1.81	3.422	0.001622
230656_s_at	124.89	224.81	1.8	3.567	0.001031
211192_s_at	159.2	284.26	1.79	3.81	0.000507
1561728_a_at	31.75	56.72	1.79	6.593	0
224549_x_at	241.82	430.27	1.78	4.368	0.000128
241083_at	27.7	49.43	1.78	3.72	0.000596
242941_x_at	58.08	103.39	1.78	9.053	0
222359_x_at	14.9	26.41	1.77	4.129	0.000144
1555842_at	85.85	151.77	1.77	3.637	0.000897
228322_at	33.75	59.07	1.75	6.771	0
244259_s_at	104.39	182.83	1.75	6.518	0
240373_at	72.21	125.39	1.74	6.479	0
241982_at	80.67	140.14	1.74	3.789	0.000556
1563431_x_at	165.94	288.45	1.74	5.1	0.000007
217685_at	35.66	61.67	1.73	7.199	0
240986_at	32.23	55.77	1.73	6.724	0
239663_x_at	74.6	128.58	1.72	4.451	0.000072
244188_at	30.74	52.77	1.72	5.222	0.000004
1564220_a_at	35.88	61.74	1.72	5.949	0
1565685_at	28.32	48.59	1.72	6.405	0
232654_s_at	30.61	52.39	1.71	6.454	0
242664_at	36.85	63.14	1.71	6.315	0
223829_at	35.84	60.96	1.7	7.604	0
228452_at	282.95	479.93	1.7	4.307	0.000114

239454_at	40.1	68.23	1.7	7.046	0
1557749_at	279.05	474.36	1.7	4.079	0.000251
200649_at	332.54	560.42	1.69	6.767	0
208538_at	44.16	74.59	1.69	6.741	0
210769_at	114.8	194.57	1.69	5.711	0.000001
237718_at	76.35	129.07	1.69	4.777	0.00002
1555188_at	37.65	63.58	1.69	6.235	0
212384_at	91.82	154.46	1.68	6.043	0.000001
217535_at	135.07	227.08	1.68	4.937	0.000018
204865_at	21.48	35.78	1.67	5.525	0.000001
211485_s_at	55.02	92.16	1.67	7.549	0
219909_at	71.59	119.58	1.67	4.539	0.000063
224157_at	91.46	152.41	1.67	5.321	0.000004
1562052_at	35.3	58.99	1.67	4.75	0.000022
201061_s_at	726.22	1204.79	1.66	4.829	0.000023
221065_s_at	63.63	105.67	1.66	5.389	0.000003
237444_at	37.49	62.19	1.66	7.067	0
238232_at	59.89	99.16	1.66	6.307	0
243365_s_at	35.49	58.79	1.66	7.383	0
244839_at	27.68	45.85	1.66	6.85	0
1553812_at	80.1	132.91	1.66	4.349	0.000118
236570_at	68.89	113.69	1.65	7.621	0
241670_x_at	76.16	125.59	1.65	8.159	0
1569005_at	30.53	50.24	1.65	5.481	0.000001
229399_at	85.67	140.78	1.64	5.301	0.000005
237535_x_at	60.81	99.5	1.64	6.301	0
208550_x_at	52.73	86.03	1.63	5.513	0.000002
215232_at	82.89	135.39	1.63	7.161	0
224063_at	36.2	59.01	1.63	6.865	0
244477_at	90.3	146.98	1.63	7.42	0
1553590_at	46.11	75.19	1.63	6.86	0
1555028_at	60.79	99.22	1.63	5.673	0.000002
1558784_at	207.93	339.04	1.63	6.454	0
1566582_x_at	74.68	121.36	1.63	6.675	0
227386_s_at	71.9	116.3	1.62	5.725	0.000001

228779_at	76.13	123.18	1.62	5.653	0.000002
204390_at	55.6	89.33	1.61	7.107	0
211174_s_at	46.21	74.33	1.61	6.201	0
213931_at	328.36	527.37	1.61	5.743	0.000002
236311_at	36.3	58.53	1.61	7.758	0
237976_at	52.25	83.89	1.61	6.47	0
244800_x_at	78.81	126.67	1.61	5.829	0.000001
1564559_at	55.9	89.92	1.61	6.601	0
214222_at	62.03	99.41	1.6	6.7	0
216707_at	64.9	104.05	1.6	6.755	0
229547_s_at	45.9	73.59	1.6	6.179	0
237454_at	50.82	81.53	1.6	6.988	0
242240_at	68.56	109.71	1.6	9.194	0
1566002_at	95.75	152.79	1.6	7.411	0
229979_x_at	60.13	95.59	1.59	6.496	0
234832_at	82.38	130.7	1.59	5.775	0.000001
1555052_a_at	34.34	54.74	1.59	5.885	0
1566581_at	93.4	148.46	1.59	6.779	0
232144_at	79.81	125.95	1.58	6.796	0
1566003_x_at	80.26	126.86	1.58	7.763	0
207675_x_at	57.93	90.88	1.57	6.616	0
221681_s_at	44.56	70.02	1.57	8.036	0
239657_x_at	74.64	117.33	1.57	8.081	0
1555718_x_at	40.72	64.08	1.57	7.383	0
1563367_at	52.09	81.98	1.57	6.42	0
228447_at	81.16	126.38	1.56	6.839	0
239172_x_at	80.61	125.59	1.56	7.843	0
1569073_x_at	50.19	78.13	1.56	7.084	0
205701_at	62.61	96.95	1.55	7.122	0
241247_at	43.11	66.77	1.55	7.262	0
244465_at	58.6	90.61	1.55	7.317	0
1553637_s_at	76.69	119.03	1.55	6.809	0
233734_s_at	82.69	127.4	1.54	7.883	0
210596_at	89.56	137.1	1.53	8.084	0
243849_at	87.79	134.65	1.53	7.469	0
217909_s_at	223.32	148.37	-1.5	-10.81	0

			1	1	
218420_s_at	199.21	130.27	-1.53	-7.595	0
208983_s_at	709.27	460.92	-1.54	-8.84	0
210904_s_at	229.97	148.15	-1.55	-7.469	0
222809_x_at	205.32	132.16	-1.55	-7.426	0
1552612_at	198.75	127.01	-1.56	-8.417	0
201364_s_at	710.31	453	-1.57	-7.867	0
202593_s_at	259	165.25	-1.57	-8.05	0
212178_s_at	523.47	334.26	-1.57	-7.225	0
211672_s_at	683.11	430.51	-1.59	-6.874	0
216814_at	63.63	39.99	-1.59	-8.964	0
222507_s_at	230.84	144.93	-1.59	-7.946	0
1552417_a_at	52.59	33.04	-1.59	-6.137	0
1555420_a_at	136.87	86.27	-1.59	-7.987	0
203300_x_at	1295.73	808.84	-1.6	-6.639	0
207686_s_at	186.96	117.02	-1.6	-9.163	0
214543_x_at	315.02	197.24	-1.6	-6.181	0
207085_x_at	296.77	184.14	-1.61	-7.547	0
202226_s_at	192.58	118.93	-1.62	-9.474	0
224343_x_at	117.56	72.62	-1.62	-6.415	0
1552670_a_at	96.04	59.11	-1.62	-6.868	0
1554417_s_at	182.36	112.61	-1.62	-10.111	0
1567222_x_at	194.7	119.86	-1.62	-6.306	0
214992_s_at	305.91	187.81	-1.63	-8.867	0
217356_s_at	1968.27	1204.25	-1.6	-7.545	0

			3		
1552822_at	52.67	32.39	-1.63	-5.263	0.000003
1555214_a_at	145.13	89.1	-1.63	-6.29	0
201043_s_at	517.22	316.01	-1.64	-7.854	0
208194_s_at	190.25	115.81	-1.64	-6.675	0
227257_s_at	251.24	153.26	-1.64	-8.168	0
210178_x_at	199.6	121.04	-1.65	-8.347	0
211287_x_at	249.78	151.08	-1.65	-7.238	0
1562044_at	82.62	50.12	-1.65	-4.75	0.000028
201444_s_at	671.79	404.44	-1.66	-4.834	0.000018
202164_s_at	427.23	257.57	-1.66	-5.919	0
205321_at	328.32	197.23	-1.66	-7.463	0
224533_s_at	67.09	40.52	-1.66	-5.828	0
240154_at	767.91	461.3	-1.66	-8.271	0
241782_at	34.1	20.49	-1.66	-6.004	0
202654_x_at	428.74	256.4	-1.67	-6.31	0
208810_at	496.13	296.43	-1.67	-5.739	0.000001
217489_s_at	71.91	43.11	-1.67	-6.594	0
239245_at	55.31	33.12	-1.67	-7.575	0
203032_s_at	46.3	27.58	-1.68	-6.447	0
208750_s_at	607.4	362.26	-1.68	-7.824	0
210935_s_at	95.64	57.1	-1.68	-6.988	0
220832_at	142.04	84.7	-1.68	-6.52	0
224074_at	103.46	61.68	-1.6	-6.168	0

			8		
225408_at	106.73	63.6	-1.68	-10.928	0
243441_at	249.84	148.81	-1.68	-6.777	0
207782_s_at	157.73	93.42	-1.69	-9.026	0
201490_s_at	221.56	130.19	-1.7	-8.704	0
211085_s_at	357.47	210.29	-1.7	-8.187	0
218156_s_at	231.65	136.45	-1.7	-7.27	0
241774_at	179.68	105.9	-1.7	-6.209	0
204426_at	53.47	31.19	-1.71	-5.105	0.000006
208364_at	158.97	93.04	-1.71	-8.415	0
209189_at	299.63	174.97	-1.71	-4.385	0.000056
222625_s_at	169.74	99.27	-1.71	-9.609	0
224853_at	191.95	112.21	-1.71	-8.745	0
229192_s_at	104.02	60.78	-1.71	-6.577	0
231595_at	223.5	130.37	-1.71	-8.421	0
200008_s_at	565.52	329.54	-1.72	-9.088	0
216252_x_at	142.65	82.77	-1.72	-5.221	0.000003
207419_s_at	1272.16	737.36	-1.73	-6.464	0
221268_s_at	74.55	43.01	-1.73	-4.669	0.000019
200974_at	329.5	189.25	-1.74	-6.55	0
211749_s_at	256.49	147.63	-1.74	-8.364	0
215780_s_at	972.9	557.59	-1.74	-9.466	0
223758_s_at	120.45	69.37	-1.74	-7.831	0
232364_at	62.36	35.88	-1.74	-6.091	0
241820_at	152.17	87.64	-1.74	-5.483	0.000002

1555154_a_at	132.76	76.11	-1.74	-8.789	0
210338_s_at	2188.32	1249.92	-1.75	-8.168	0
223143_s_at	56.95	32.48	-1.75	-6.044	0
224854_s_at	219.35	125.6	-1.75	-8.275	0
1553158_at	307.07	175.88	-1.75	-6.295	0
1555419_a_at	947.33	540.49	-1.75	-6.124	0
208304_at	290.85	164.52	-1.77	-4.535	0.000032
211676_s_at	565.09	318.48	-1.77	-6.978	0
213194_at	59.3	33.58	-1.77	-7.529	0
1554206_at	209.97	118.64	-1.77	-5.642	0.000001
221428_s_at	151.71	85.14	-1.78	-6.808	0
222496_s_at	462.58	260.37	-1.78	-5.76	0.000001
233331_at	72.54	40.76	-1.78	-7.845	0
243124_at	123.75	69.48	-1.78	-9.427	0
206222_at	396.11	221.38	-1.79	-6.026	0
201971_s_at	165.51	92	-1.8	-7.743	0
209754_s_at	49.75	27.64	-1.8	-7.9	0
223341_s_at	41.44	23.05	-1.8	-5.35	0.000002
235744_at	69.11	38.49	-1.8	-6.398	0
1555408_at	53.24	29.65	-1.8	-7.297	0
211661_x_at	1132	626.61	-1.81	-7.752	0
209131_s_at	87.24	47.95	-1.82	-6.308	0
214895_s_at	97.92	53.68	-1.82	-6.584	0
241216_at	167.96	92.4	-1.82	-6.12	0
210264_at	235.46	128.92	-1.83	-10.209	0

226442_at	284.33	154.94	-1.84	-8.319	0
233878_s_at	192.31	104.67	-1.84	-9.04	0
233303_at	205.22	110.89	-1.85	-7.328	0
205502_at	115.01	61.93	-1.86	-6.52	0
234816_at	243.54	130.82	-1.86	-8.207	0
207983_s_at	740.36	396	-1.87	-9.667	0
210948_s_at	183.52	98.24	-1.87	-5.108	0.000007
213998_s_at	1257.35	672.4	-1.87	-5.809	0
220477_s_at	212.55	113.61	-1.87	-7.515	0
1552610_a_at	209.97	112.2	-1.87	-10.67	0
1555797_a_at	780.74	417.37	-1.87	-6.67	0
1558014_s_at	43.97	23.35	-1.88	-4.415	0.000053
200806_s_at	289.04	151.93	-1.9	-10.943	0
208057_s_at	486.48	254.4	-1.91	-9.873	0
210190_at	135.85	70.55	-1.93	-5.417	0.000003
223650_s_at	759.34	392.75	-1.93	-6.581	0
200796_s_at	126.03	64.55	-1.95	-5.858	0.000001
225600_at	286.66	147.05	-1.95	-5.873	0.000001
209201_x_at	895.85	457.64	-1.96	-7.067	0
204006_s_at	4328.37	2201.06	-1.97	-5.734	0.000001
1569952_x_at	66.63	33.63	-1.98	-5.782	0.000001
1554834_a_at	98.53	49.56	-1.99	-8.941	0
239512_at	100.84	49.75	-2.03	-10.407	0

208960_s_at	565.07	272.98	-2.07	-11.616	0
1558111_at	378.53	182.46	-2.07	-7.97	0
206700_s_at	85.47	41.01	-2.08	-3.733	0.000566
210461_s_at	522.06	249.66	-2.09	-8.603	0
206396_at	75.3	35.67	-2.11	-8.621	0
1558747_at	633.92	300.33	-2.11	-4.806	0.000016
212031_at	748.73	352.57	-2.12	-6.449	0
201367_s_at	173.58	81.39	-2.13	-8.703	0
204427_s_at	132.8	61.68	-2.15	-8.696	0
212595_s_at	1272.79	588.73	-2.16	-7.36	0
211919_s_at	1079.31	497.85	-2.17	-8.041	0
211559_s_at	95.1	43.19	-2.2	-6.22	0
222458_s_at	151.32	68.3	-2.22	-10.614	0
214544_s_at	114.04	51.1	-2.23	-8.147	0
215236_s_at	127.55	56.94	-2.24	-8.884	0
228492_at	53.84	23.56	-2.29	-3.725	0.000662
210773_s_at	372.79	158.98	-2.34	-6.461	0
200641_s_at	754.29	313.21	-2.41	-7.459	0
214131_at	68.58	28.03	-2.45	-3.26	0.0023
1555814_a_at	1736.25	641.55	-2.71	-9.879	0
207001_x_at	373.5	134.29	-2.78	-9.726	0
1555167_s_at	1303.41	462.23	-2.82	-7.975	0
205000_at	109.96	38.42	-2.86	-3.228	0.002552
204409_s_at	387.16	120.42	-3.2	-2.485	0.016474

			2		
201909_at	1005.86	263.3	-3.82	-3.165	0.003061

Kanser ve Tromboz grubunda farklı ifade edilen gen listesi.

Affy ID	Baseline Ortalama	Experiment Ortalama	Kat Değişimi	t istatistik	p değeri
236269_at	83.49	245.51	2.94	5.005	0.000016
206632_s_at	113.32	324.82	2.87	2.763	0.008458
231827_at	79.79	210.44	2.64	4.133	0.0002
237669_at	34.14	89.94	2.63	4.282	0.000134
211104_s_at	53.92	134.43	2.49	5.575	0.000002
203916_at	171.6	400.68	2.33	4.033	0.000266
241647_x_at	6.07	14.08	2.32	3.648	0.000786
216625_at	6.84	15.68	2.29	3.428	0.001419
233847_x_at	7.49	16.5	2.2	3.699	0.000707
1565653_at	24.68	53.49	2.17	5.461	0.000004
214401_at	63.2	136.25	2.16	5.28	0.000006
237875_at	156.93	330.37	2.11	3.872	0.000401
232593_at	75.2	153.74	2.04	4.009	0.000257
234434_at	58.51	118	2.02	3.567	0.001028
228429_x_at	91.66	182.07	1.99	3.656	0.000713
214925_s_at	66.99	132.46	1.98	3.949	0.000328
1556735_at	44.06	87.21	1.98	5.03	0.000012
219636_s_at	73.71	144.86	1.97	5.045	0.000009
210271_at	34.29	67.16	1.96	4.672	0.00004
243217_at	42.64	82.93	1.94	4.723	0.000035
233985_x_at	60.52	116.78	1.93	5.346	0.000005
1554126_at	295.02	568.37	1.93	4.438	0.000045
209784_s_at	81.26	155.95	1.92	5.421	0.000003
238422_at	51.26	98.5	1.92	4.72	0.000032
207142_at	19.82	37.79	1.91	4.396	0.000089

234397_at	42.79	81.89	1.91	4.498	0.000061
1569811_at	20.9	39.84	1.91	4.599	0.000045
211836_s_at	75.83	142.12	1.87	4.558	0.000054
205053_at	117.98	219.51	1.86	4.473	0.000051
1570534_a_at	23.42	43.62	1.86	4.599	0.000045
221402_at	124.83	228.77	1.83	4.928	0.000014
231785_at	55.91	101.44	1.81	5.129	0.000008
1560859_at	61.97	111.91	1.81	5.552	0.000003
215644_at	94.33	163.07	1.73	6.251	0
241196_at	68.5	118.8	1.73	5.684	0.000001
200951_s_at	78.14	45.42	-1.72	-6.7	0
33148_at	64.28	36.59	-1.76	-5.942	0
212079_s_at	148.1	82.59	-1.79	-5.002	0.000016
223701_s_at	60.72	33.89	-1.79	-5.271	0.000005
201083_s_at	143.23	79.78	-1.8	-6.088	0
216315_x_at	139.67	77.81	-1.8	-6.125	0
231340_at	97.85	54.22	-1.8	-4.717	0.000032
238013_at	129.62	71.6	-1.81	-5.194	0.000006
221765_at	135.75	74.34	-1.83	-5.529	0.000002
241866_at	71.28	38.92	-1.83	-4.991	0.000014
208325_s_at	139.13	75.57	-1.84	-4.393	0.000082
209257_s_at	134.54	73.17	-1.84	-5.429	0.000002
214352_s_at	309.32	167.63	-1.85	-4.822	0.000023
1554249_a_at	87.27	47.26	-1.85	-6.454	0
238341_at	140.01	75.42	-1.86	-4.883	0.000017
242408_at	138.76	74.43	-1.86	-5.231	0.000005
1554708_s_at	60.66	32.54	-1.8	-4.87	0.000019

			6	4	
201635_s_at	295.24	157.53	-1.87	-5.537	0.000002
206500_s_at	98.67	52.89	-1.87	-4.788	0.000018
208965_s_at	1354.97	725.17	-1.87	-4.332	0.000086
210943_s_at	819.17	438.14	-1.87	-4.324	0.000106
217234_s_at	149.33	79.83	-1.87	-4.788	0.000022
209024_s_at	310.5	163.91	-1.89	-5.318	0.000002
1558686_at	80.55	42.54	-1.89	-5.925	0
216361_s_at	63.55	33.49	-1.9	-4.532	0.00006
209258_s_at	236.25	123.61	-1.91	-5.132	0.000005
1558173_a_at	88.67	46.43	-1.91	-5.685	0.000002
1552480_s_at	134.51	70	-1.92	-5.834	0.000001
230180_at	1237.52	638.06	-1.94	-4.829	0.000023
235765_at	168.63	87.04	-1.94	-4.818	0.000026
1561615_s_at	79.69	40.7	-1.96	-5.366	0.000005
1565614_at	32.59	16.45	-1.98	-4.985	0.00001
1565320_at	101.59	50.26	-2.02	-5.451	0.000003
241955_at	146.22	71.87	-2.03	-5.053	0.000013
242163_at	60.24	29.64	-2.03	-5.014	0.000012
214693_x_at	1446.6	705.24	-2.05	-4.064	0.00018
242975_s_at	75.75	36.87	-2.05	-5.062	0.000011
241620_at	93.25	45.03	-2.07	-4.781	0.000026
215078_at	54.25	25.96	-2.09	-4.645	0.000045
231235_at	67.68	32.45	-2.0	-4.72	0.000031

			9	4	
224567_x_at	3432.41	1620.93	-2.12	-4.319	0.000088
200598_s_at	540.61	253.28	-2.13	-5.031	0.000007
241012_at	234.33	109.85	-2.13	-3.74	0.00062
215434_x_at	953.69	444.71	-2.14	-4.192	0.00012
211968_s_at	879.14	404.46	-2.17	-5.037	0.00001
213446_s_at	569.94	263.08	-2.17	-5.012	0.000011
229399_at	111.45	50.13	-2.22	-5.35	0.000004
213875_x_at	181.98	79.86	-2.28	-7.517	0
208859_s_at	264.71	113.92	-2.32	-5.92	0
1558924_s_at	93.38	40.03	-2.33	-6.039	0.000001
219387_at	70.68	29.62	-2.39	-6.006	0
1557910_at	190.44	79.64	-2.39	-5.888	0.000001
201101_s_at	368.69	153.63	-2.4	-5.841	0.000001
235009_at	159.64	65.7	-2.43	-5.298	0.000006
227152_at	1222.1	495.98	-2.46	-4.736	0.000036
229966_at	154.55	62.57	-2.47	-3.714	0.00072
235811_at	178.86	68.6	-2.61	-4.796	0.000025
1558747_at	299.06	113.32	-2.64	-5.362	0.000005
223940_x_at	1339.03	493.02	-2.72	-4.448	0.000092
224568_x_at	1458.74	522.49	-2.79	-4.988	0.000019
208900_s_at	440.31	150.97	-2.92	-6.757	0
214723_x_at	181.09	60.35	-3	-5.166	0.00001
226675_s_at	351.61	110.17	-3.1	-3.90	0.000387

			9	2	

Kanser + Tromboz ve Kanser Grubunda farklı ifade edilen gen listesi.

Affy ID	Baseline Ortalama	Experiment Ortalama	Kat Değişimi	t istatistik	p değeri
204409_s_at	85.72	421.64	4.92	2.177	0.036749
231688_at	78.39	282.67	3.61	2.691	0.011372
207269_at	199.64	553.12	2.77	3.094	0.003927
215248_at	26.99	74.58	2.76	2.127	0.041804
233126_s_at	19.87	51.88	2.61	2.107	0.043527
205557_at	88.85	224.99	2.53	2.46	0.019778
238439_at	82.82	208.73	2.52	2.515	0.017308
206676_at	93.92	210.87	2.25	2.461	0.019117
207802_at	40.83	90.92	2.23	2.58	0.014372
218978_s_at	153.78	330.16	2.15	4.207	0.000179
212531_at	279.15	589.82	2.11	2.628	0.01221
202018_s_at	354.82	730.25	2.06	2.57	0.013828
233847_x_at	7.51	15.5	2.06	3.457	0.001484
210244_at	435.35	882.19	2.03	3.035	0.004345
231595_at	85.25	172.39	2.02	2.386	0.023485
210254_at	84.44	169.36	2.01	2.59	0.014036
201367_s_at	62.63	124.33	1.98	5.119	0.000004
207329_at	27.38	52.72	1.93	2.794	0.008673
226442_at	120.47	231.32	1.92	5.138	0.000006
218717_s_at	38.13	72.26	1.9	3.325	0.002128
207001_x_at	105.21	198.47	1.89	4.094	0.000217
205513_at	114.56	215.69	1.88	2.899	0.006351
241647_x_at	6.95	12.84	1.85	3.25	0.002432
1555643_s_at	384.27	709.39	1.85	3.042	0.004495
203757_s_at	58.42	106.92	1.83	2.924	0.006103
206222_at	175.12	318.42	1.82	4.992	0.00001
214472_at	92.72	168.15	1.81	3.133	0.003542

222139_at	138.12	250.15	1.81	3.34	0.001918
201644_at	370.56	666.98	1.8	3.319	0.00205
204427_s_at	42.82	77	1.8	4.137	0.000202
216714_at	42.21	74.89	1.77	3.124	0.003728
223952_x_at	132.04	233.32	1.77	4.106	0.00023
224009_x_at	130.57	230.68	1.77	3.929	0.000389
1554834_a_at	35.8	63.24	1.77	4.105	0.000236
211749_s_at	110.41	191.81	1.74	5.68	0.000001
234446_at	79.01	136.04	1.72	3.627	0.000807
204881_s_at	118.46	202.58	1.71	3.013	0.005005
229192_s_at	42.47	72.6	1.71	3.81	0.000509
244299_at	71.56	122.6	1.71	3.767	0.000609
211413_s_at	44.21	74.64	1.69	3.421	0.001625
214544_s_at	35.79	60.56	1.69	3.732	0.000688
227501_at	173.4	292.18	1.69	3.669	0.000784
211140_s_at	78.42	131.66	1.68	4.168	0.000161
233303_at	78.74	132.05	1.68	3.885	0.000335
234816_at	98.66	164.71	1.67	4.806	0.000024
1560047_s_at	35.12	58.59	1.67	4.916	0.000015
218279_s_at	63.69	105.55	1.66	4.023	0.000269
222625_s_at	75.23	124.8	1.66	5.668	0.000001
222730_s_at	273.95	456.01	1.66	3.226	0.00251
207578_s_at	144.08	237.63	1.65	4.291	0.000099
210655_s_at	61.33	100.78	1.64	3.819	0.000515
211287_x_at	115.56	189.33	1.64	3.719	0.000631
211451_s_at	69.12	112.77	1.63	3.711	0.000607
239512_at	34.84	56.73	1.63	4.542	0.00006
1562031_at	70.11	114.62	1.63	3.805	0.000523
207085_x_at	137.4	222.07	1.62	3.763	0.000597
222435_s_at	155.87	252.67	1.62	3.534	0.001146
204445_s_at	117.5	187.87	1.6	3.715	0.000514
243496_at	181.46	289.66	1.6	3.67	0.000832
1553158_at	131.29	209.42	1.6	4.112	0.000172
1552670_a_at	42.24	67.29	1.59	4.371	0.000091
1555814_	520.9	826.49	1.59	3.895	0.000

a_at	2				287
240577_at	62.05	98.03	1.58	3.799	0.000393
204510_at	66.52	104.58	1.57	3.908	0.000349
210935_s_at	40.84	63.75	1.56	3.749	0.000638
214522_x_at	48.73	75.94	1.56	4.006	0.000254
216933_x_at	178.43	279.14	1.56	4.135	0.000135
1554047_at	30.11	46.82	1.56	3.824	0.000453
211672_s_at	355.31	550.88	1.55	4.994	0.000005
1555420_a_at	60.68	93.26	1.54	4.485	0.000054
222507_s_at	105.05	159.71	1.52	5.463	0.000002
240154_at	378.94	575.78	1.52	4.561	0.000031
208750_s_at	289.91	437.03	1.51	4.888	0.00001
202593_s_at	123.94	185.9	1.5	4.724	0.000024
210564_x_at	233.8	349.74	1.5	4.708	0.000025
207686_s_at	85.25	126.52	1.48	5.384	0.000003
202226_s_at	84.66	124.35	1.47	5.088	0.000006
227558_at	608.07	416.01	-1.46	-6.018	0
202117_at	1382.92	930.6	-1.49	-4.809	0.000012
202326_at	201.91	134.84	-1.5	-4.869	0.000012
207760_s_at	518.49	344.83	-1.5	-4.54	0.000033
214315_x_at	202.66	135.17	-1.5	-5.366	0.000001
225478_at	260.45	174.11	-1.5	-4.958	0.000006
225588_s_at	211.86	141.19	-1.5	-5.582	0.000001
1560399_a_at	108.92	72.68	-1.5	-4.874	0.000009
203055_s_at	483.5	320.47	-1.51	-5.326	0.000002
203193_at	355.66	236.02	-1.51	-4.54	0.00003
217266_at	374.33	248.54	-1.51	-4.617	0.000024
218166_s_at	76.43	50.77	-1.51	-4.413	0.000062
220342_x_at	103.78	68.33	-1.52	-4.939	0.000007
201038_s_at	262.04	171.65	-1.53	-4.753	0.000013
204198_s_at	1775.54	1164.08	-1.53	-4.546	0.000027
222762_x_at	120.94	79.22	-1.53	-4.456	0.000037
227641_at	176.8	115.25	-1.53	-4.27	0.000072
203468_at	113.44	73.67	-1.54	-4.709	0.000015
208623_s_at	528.42	343.93	-1.54	-4.486	0.000034

214049_x_at	432.05	280.41	-1.54	-4.623	0.000022
217092_x_at	455.35	294.68	-1.55	-4.5	0.000033
210607_at	159.58	101.93	-1.57	-4.583	0.000024
222062_at	338.41	215.68	-1.57	-5.04	0.000006
227002_at	399.61	253.77	-1.57	-4.383	0.000049
227173_s_at	99.65	63.65	-1.57	-4.136	0.000116
1555355_a_at	190.34	121.02	-1.57	-4.429	0.000046
1555844_s_at	912.32	580.22	-1.57	-4.566	0.000026
201473_at	165.24	104.34	-1.58	-4.797	0.000011
201687_s_at	310.71	197.1	-1.58	-4.616	0.000026
202221_s_at	68.5	43.23	-1.58	-4.487	0.000038
205255_x_at	1401.18	886.07	-1.58	-4.115	0.000123
206761_at	188.59	119.37	-1.58	-4.277	0.000069
212144_at	1232.72	780.11	-1.58	-4.718	0.000015
226548_at	270.88	170.73	-1.59	-4.855	0.000009
200610_s_at	945.77	592.74	-1.6	-4.544	0.000028
225187_at	359.72	224.72	-1.6	-5.505	0.000001
208995_s_at	111.07	68.92	-1.61	-4.731	0.000017
219599_at	153.29	94.93	-1.61	-4.864	0.000011
223282_at	105.84	65.91	-1.61	-4.343	0.000058
225756_at	107	66.37	-1.61	-4.093	0.000147
201589_at	184.42	113.98	-1.62	-3.649	0.000585
201746_at	202.93	125.37	-1.62	-4.108	0.000125
217707_x_at	160.78	99.27	-1.62	-5.209	0.000003
1555653_at	2860.94	1755.07	-1.63	-3.879	0.000274
214615_at	91.45	55.84	-1.64	-3.88	0.000275
219528_s_at	249.82	151.89	-1.64	-3.856	0.000286
222164_at	53.29	32.42	-1.64	-5.555	0.000001
222279_at	56.44	34.16	-1.65	-3.936	0.000243
236554_x_at	115.66	70.13	-1.65	-4.383	0.000055
242399_at	167.28	101.49	-1.65	-4.543	0.000038
227299_at	89.83	54.25	-1.66	-4.23	0.000111
212827_at	2084.4	1250.62	-1.67	-3.603	0.000651
218381_s_at	360.11	212.65	-1.69	-5.966	0
219667_s	156.4	92.67	-1.69	-	0.000

_at	7			3.576	713
222439_s_at	298.12	176.55	-1.69	-3.53	0.000808
228071_at	1016.81	601.01	-1.69	-4.905	0.000008
217347_at	226.26	133.31	-1.7	-4.754	0.000013
213818_x_at	125.29	73.16	-1.71	-4.261	0.000094
226218_at	1585.19	927.54	-1.71	-3.347	0.001485
228527_s_at	176.8	103.28	-1.71	-4.021	0.00022
200694_s_at	613.94	356.08	-1.72	-5.83	0
204642_at	167.21	95.91	-1.74	-3.865	0.000315
205049_s_at	617.72	349.75	-1.77	-3.551	0.000754
203091_at	227.17	126.36	-1.8	-5.779	0
209602_s_at	73.65	40.94	-1.8	-3.751	0.00048
228065_at	192.75	106.98	-1.8	-5.216	0.000003
206337_at	731.9	404.16	-1.81	-4.765	0.000013
224833_at	1338.49	695.8	-1.92	-4.419	0.000049
203547_at	580.08	300.32	-1.93	-6.626	0
1558048_x_at	502.59	119.13	-4.22	-2.3	0.028022

Tromboz ve Kanser + Tromboz grubunda farklı ifade edilen gen listesi.

Affy ID	Baseline Ortalama	Experiment Ortalama	Kat Değişimi	t istatistik	p değeri
231688_at	34.26	183.74	5.36	3.122	0.004021
219669_at	45.24	224.29	4.96	2.218	0.034441
204409_s_at	65.41	280	4.28	2.118	0.042013
1558747_at	67.23	259.45	3.86	4.738	0.000049
207269_at	114.55	355.92	3.11	3.368	0.001975
205557_at	52.06	151.81	2.92	2.851	0.007808
202018_s_at	168.64	471.08	2.79	3.392	0.001808
205837_s_at	27.56	76.32	2.77	2.241	0.032685
235568_at	208.84	560.82	2.69	2.74	0.010272
206177_s_at	99.91	268.18	2.68	2.281	0.029732
212531_at	143.09	374.93	2.62	3.218	0.002975
208900_s_at	85.52	222	2.6	4.93	0.000019
206676_at	54.1	138.64	2.56	2.956	0.005857
235811_at	44.01	112.5	2.56	4.287	0.000149
205950_s_at	599.1	1516.33	2.53	2.84	0.007311
210999_s_at	42.97	106.24	2.47	2.279	0.030071
236439_at	236.41	581.36	2.46	3.204	0.002 69
207802_at	26.48	64.27	2.43	3.24	0.002897
227152_at	241.09	584.42	2.42	5.395	0.000005
212768_s_at	29.71	71.62	2.41	3.225	0.002732
235643_at	72.84	172.28	2.37	5.004	0.000017
1554481_a_at	153.9	358.5	2.33	3.906	0.000436
226675_s_at	66.77	154.01	2.31	2.544	0.0157
224567_x_at	834.37	1915.26	2.3	4.629	0.000036
235380_at	138.14	316.19	2.29	4.502	0.000086
219978_s_at	37.28	84.7	2.27	3.928	0.000433
1568830_at	46.7	106.23	2.27	4.274	0.00017
209273_s_at	169.98	382.88	2.25	3.054	0.0045
238439_at	61.64	138.94	2.25	2.499	0.01799

236254_at	103.76	232.59	2.24	6.54	0
204881_s_at	61.73	134.94	2.19	4.445	0.000109
213998_s_at	220.88	484.04	2.19	4.621	0.000044
209301_at	75.32	162.44	2.16	2.603	0.014111
1558111_at	61.34	132.47	2.16	6.056	0.000001
229966_at	40.67	87.54	2.15	4.238	0.000161
218978_s_at	99.75	212.75	2.13	4.346	0.000105
206303_s_at	190.08	403.8	2.12	3.114	0.003465
221809_at	87.39	182.94	2.09	3.446	0.001562
221425_s_at	111.27	231.14	2.08	2.752	0.009636
223940_x_at	246.9	511.61	2.07	3.509	0.001351
210244_at	272.66	562.17	2.06	3.068	0.004283
241041_at	55.02	113.17	2.06	2.773	0.00933
202129_s_at	131.6	270.37	2.05	4.124	0.000223
240923_at	26.7	54.11	2.03	2.826	0.007709
217826_s_at	113.34	229.3	2.02	4.968	0.000021
1558924_s_at	29.32	58.87	2.01	6.251	0
208470_s_at	86.57	173.35	2	2.98	0.005288
1557910_at	49.96	98.67	1.98	3.843	0.000494
224693_at	293.83	579.96	1.97	3.777	0.000564
227223_at	88.69	173.4	1.96	4.677	0.000035
243031_at	33.03	64.19	1.94	5.551	0.000003
1555920_at	47.16	91.54	1.94	4.092	0.000272
1567575_at	29.29	56.74	1.94	3.509	0.00136
241012_at	61.16	117.93	1.93	3.415	0.00163
1569385_s_at	67.1	129.5	1.93	4.436	0.000078
224568_x_at	262.26	502.97	1.92	3.623	0.000961
202131_s_at	241.27	461.28	1.91	3.21	0.002886
214723_x_at	38.7	73.98	1.91	4.007	0.000274
222420_s_at	278.84	532.14	1.91	3.617	0.000998
205033_s_at	2502.39	4742.14	1.9	3.883	0.000303
238464_at	24.67	46.68	1.89	5.066	0.000012
239296_at	160.5	302.13	1.88	4.281	0.000124
212794_s_at	175.33	325.58	1.86	4.255	0.000156
214352_s	94.75	175.35	1.85	5.239	0.000

_at					007
236338_at	61.83	114.36	1.85	3.238	0.002728
210943_s_at	218.16	400.78	1.84	4.677	0.000036
213875_x_at	53.56	98.29	1.84	5.485	0.000004
216933_x_at	96.55	177.37	1.84	6.427	0
241955_at	45.22	83.12	1.84	5.677	0.000002
204750_s_at	33.3	60.87	1.83	3.336	0.002216
241824_at	47.95	87.85	1.83	3.865	0.000507
221765_at	46.83	85.23	1.82	3.92	0.000441
211993_at	82.04	148.9	1.81	3.505	0.001221
224828_at	76.37	137.18	1.8	4.61	0.00005
239027_at	126.19	226.78	1.8	5.035	0.00001
235999_at	90.14	161	1.79	4.755	0.000031
242946_at	264.3	472.52	1.79	4.17	0.000177
207038_at	58.02	103.12	1.78	4.662	0.000042
228603_at	68.44	121.56	1.78	4.707	0.000039
238851_at	67.36	119.95	1.78	4.431	0.00008
223123_s_at	37.74	66.68	1.77	3.928	0.000333
237119_at	43.25	76.76	1.77	4.15	0.000194
209006_s_at	206.91	363.95	1.76	4.069	0.000205
235009_at	42.15	74.34	1.76	5.206	0.000006
239597_at	77.15	135.47	1.76	4.293	0.000089
243182_at	48.41	85.23	1.76	3.898	0.000421
231680_at	58.54	101.82	1.74	4.631	0.000052
238563_at	61.89	107.99	1.74	4.43	0.000078
239274_at	142.98	248.51	1.74	4.926	0.000013
201635_s_at	89.13	153.87	1.73	5.486	0.000003
208325_s_at	46.85	81.07	1.73	4.571	0.000051
236533_at	100.05	173.16	1.73	4.009	0.000292
236966_at	59.28	102.34	1.73	5.644	0.000001
1552274_at	76.25	132.19	1.73	4.664	0.000045
1570021_at	20.61	35.57	1.73	4.57	0.000051
215955_x_at	56.44	97.19	1.72	4.955	0.000017
227501_at	109.69	188.21	1.72	4.119	0.000223
214843_s_at	81.9	140.11	1.71	5.278	0.000005

229776_at	97.37	166.47	1.71	4.546	0.000055
238800_s_at	94.57	161.3	1.71	5.422	0.000003
243496_at	110.1	187.12	1.7	4.285	0.000131
203007_x_at	86.5	145.87	1.69	5.451	0.000003
229398_at	69.39	117.29	1.69	4.488	0.000063
212188_at	173.07	290.56	1.68	4.525	0.000048
212417_at	33.47	56.26	1.68	4.701	0.000029
244679_at	39.77	66.89	1.68	5.205	0.000006
230180_at	313.79	524.98	1.67	4.56	0.000047
235376_at	90.29	148.58	1.65	5.155	0.000007
237264_at	70.15	115.15	1.64	4.728	0.000034
238350_at	48.16	79.18	1.64	5.057	0.00001
242279_at	32.45	52.97	1.63	5.312	0.000003
212178_s_at	128.83	207.6	1.61	5.212	0.000007
214305_s_at	138.7	223.33	1.61	5.427	0.000003
1557950_at	63.15	101.77	1.61	5.395	0.000003
212008_at	40.62	64.33	1.58	5.589	0.000003
203413_at	185.36	110.48	-1.68	-4.953	0.000007
205456_at	284.1	168.77	-1.68	-5.096	0.000004
212400_at	450.96	264.13	-1.71	-5.19	0.000003
235085_at	215.66	124.16	-1.74	-6.332	0
221558_s_at	546.69	310.21	-1.76	-4.565	0.000027
206337_at	553.69	291.35	-1.9	-4.81	0.000013
231798_at	98.58	47.51	-2.08	-4.589	0.00004

Kanser + Tromboz ve Kontrol grubunda farklı ifade edilen gen listesi.

Affy ID	Baseline Ortalama	Experiment Ortalama	Kat Değişimi	t istatistik	p değeri
202411_at	82.71	501.69	6.07	2.196	0.036184
219669_at	88.39	346.18	3.92	2.063	0.047037
231688_at	73.63	276.97	3.76	2.865	0.007344
205950_s_at	599.86	2228	3.71	3.799	0.000619

206494_s_at	68.48	201.77	2.95	3.615	0.001089
214407_x_at	184	539.44	2.93	3.034	0.004723
209273_s_at	213.94	612.38	2.86	3.921	0.000462
207459_x_at	148.36	412.78	2.78	2.949	0.005923
216833_x_at	157.96	439.88	2.78	3.041	0.004643
213338_at	100.8	274.56	2.72	2.65	0.012471
236081_at	69.12	187.13	2.71	3.97	0.000345
233126_s_at	21.83	58.46	2.68	2.339	0.026201
221425_s_at	144.09	375.57	2.61	3.407	0.001861
205557_at	93.45	240.8	2.58	2.608	0.013877
206493_at	87.46	220.58	2.52	3.299	0.002502
206698_at	72.32	182.32	2.52	3.748	0.000693
212768_s_at	45.44	113.15	2.49	3.042	0.004458
1558048_x_at	50.7	124.38	2.45	2.884	0.007232
208470_s_at	116.26	284.15	2.44	3.449	0.001548
235568_at	369.22	896.42	2.43	2.647	0.012139
206302_s_at	325.27	786.8	2.42	3.554	0.00114
203502_at	372.85	884.66	2.37	3.887	0.00044
205856_at	102.77	240.82	2.34	3.703	0.000772
207815_at	61.17	143.35	2.34	3.092	0.004029
201058_s_at	67.06	155	2.31	4.496	0.000091
206697_s_at	117.11	271.1	2.31	3.122	0.003654
233371_at	159.41	365.45	2.29	2.993	0.004968
206303_s_at	278.99	634.1	2.27	3.648	0.000862
207802_at	43.7	98.51	2.25	2.641	0.012389
209339_at	258.44	580.26	2.25	3.877	0.000475
230942_at	143.78	320.2	2.23	3.918	0.000459
1552583_s_at	124.58	275.31	2.21	2.909	0.006219
1555659_a_at	164.01	359.75	2.19	3.958	0.000398
203115_at	155.94	340.28	2.18	3.721	0.000648
230840_at	157.41	342.83	2.18	3.178	0.002667
201644_at	321.02	676.58	2.11	4.273	0.000152
202018_s_at	353.28	743.6	2.1	2.797	0.00789
227309_at	176.8	371.02	2.1	2.888	0.006843
231307_at	44.9	93.18	2.08	3.814	0.000

					574
229151_at	54.91	112.99	2.06	3.252	0.002758
229717_at	85.82	177.09	2.06	3.841	0.000507
203661_s_at	138.44	283.34	2.05	3.795	0.000582
210504_at	292.02	595.56	2.04	3.019	0.004814
208791_at	307.4	624.7	2.03	3.768	0.000678
206655_s_at	261.16	526.94	2.02	3.864	0.000505
223432_at	225.99	455.42	2.02	3.496	0.001338
226811_at	792.63	1601.61	2.02	3.437	0.00138
203911_at	154.94	311.86	2.01	3.12	0.00321
36936_at	285.54	571.2	2	4.172	0.000216
211190_x_at	102.33	203.31	1.99	3.101	0.003701
217878_s_at	184.56	366.7	1.99	3.759	0.000524
231021_at	106.43	210.94	1.98	4.151	0.00023
210035_s_at	20.29	40.01	1.97	4.552	0.00005
218644_at	158.03	311.98	1.97	3.416	0.001693
225025_at	88.35	174.04	1.97	3.317	0.002211
1562383_at	34.27	67.01	1.96	4.271	0.000124
215382_x_at	50.62	98.76	1.95	3.201	0.002927
234386_s_at	66.5	129.53	1.95	3.476	0.001493
214433_s_at	962.46	1871.42	1.94	3.986	0.000287
205900_at	399	768.58	1.93	3.393	0.001495
208792_s_at	212.41	410.64	1.93	3.536	0.001275
1562687_x_at	48.85	94.33	1.93	4.658	0.000047
220561_at	78.12	149.66	1.92	3.199	0.002619
240373_at	55.65	106.67	1.92	5.778	0.000001
211485_s_at	41.02	78.29	1.91	3.674	0.000869
224157_at	73.64	140.51	1.91	5.603	0.000002
1554419_x_at	67.07	127.81	1.91	4.434	0.000071
231148_at	44.46	84.57	1.9	4.53	0.000069
1563874_at	35.08	66.54	1.9	3.359	0.001999
223754_at	117.88	223.18	1.89	3.565	0.001124
232507_at	48.94	92.61	1.89	3.982	0.000372
1569200_at	266.86	503.28	1.89	3.913	0.000441
202130_at	859.72	1613.4	1.88	3.878	0.000472

210297_s_at	37.1	69.44	1.87	4.506	0.000077
210112_at	201.83	375.26	1.86	3.7	0.000741
1562240_at	40.13	74.5	1.86	4.163	0.000182
202095_s_at	66.17	122.46	1.85	4.04	0.000219
204467_s_at	432.49	800.53	1.85	3.495	0.001183
206048_at	45.85	84.99	1.85	4.359	0.000117
220844_at	54.26	100.2	1.85	3.598	0.001027
237291_at	45.9	85.07	1.85	3.587	0.001117
204187_at	630.59	1152.73	1.83	3.417	0.001545
216139_s_at	144.32	264.17	1.83	4.286	0.000133
220744_s_at	109.03	199.2	1.83	3.481	0.001385
220807_at	666.75	1217.2	1.83	3.965	0.000312
226686_at	123.48	225.88	1.83	4.155	0.00022
233258_at	93.65	171.32	1.83	3.409	0.001526
220491_at	73.05	133.27	1.82	5.279	0.000009
216956_s_at	79.27	143.71	1.81	4.31	0.000142
1569617_at	49.77	90.03	1.81	4.179	0.000166
211560_s_at	2638.8	4762.84	1.8	4.543	0.00004
234832_at	64.95	116.93	1.8	4.336	0.000125
243734_x_at	23.12	41.71	1.8	5.308	0.000005
201061_s_at	572.11	1026.3	1.79	4.828	0.00003
221977_at	31.9	57.02	1.79	3.576	0.001092
230863_at	59.39	106.43	1.79	3.991	0.000267
237718_at	59.52	106.28	1.79	4.581	0.00004
201294_s_at	137.74	245.73	1.78	3.508	0.001416
215232_at	55.89	99.33	1.78	6.058	0.000001
220314_at	94.86	169.06	1.78	4.512	0.000061
224262_at	73.7	131.47	1.78	4.529	0.000073
230698_at	24.89	44.43	1.78	3.99	0.000292
217328_at	46.92	83.07	1.77	4.982	0.000018
223570_at	47.44	83.88	1.77	4.733	0.000019
1553721_at	25.96	45.92	1.77	5.165	0.000005
1561002_at	24.98	44.17	1.77	4.424	0.000077
221672_s_at	98.42	173.59	1.76	4.352	0.000099
1557749_	202.6	357.45	1.76	4.401	0.000

at	4				095
217736_s_at	802.84	1407.13	1.75	3.868	0.000448
220908_at	55.98	97.82	1.75	3.794	0.000592
224752_at	1118.71	1957.29	1.75	3.892	0.000422
1560910_at	60.91	106.55	1.75	5.031	0.000014
211396_at	149.01	259.59	1.74	5.267	0.000006
239663_x_at	59.2	102.86	1.74	5.374	0.000003
1570173_at	27.08	47.04	1.74	4.179	0.000185
229740_at	182.46	316.16	1.73	3.908	0.000348
236051_at	33.7	58.42	1.73	5.739	0.000001
244800_x_at	62.1	107.45	1.73	6.394	0
233723_at	33.51	57.57	1.72	4.358	0.000108
234560_at	102.8	175.31	1.71	4.793	0.000025
202954_at	123.19	209.42	1.7	4.872	0.000025
206275_s_at	73.56	125.3	1.7	5.493	0.000004
208605_s_at	54.61	93.1	1.7	5.671	0.000001
241615_x_at	91.82	155.78	1.7	5.402	0.000005
207166_at	27.49	46.37	1.69	4.741	0.000024
231738_at	40.59	68.45	1.69	7.074	0
200067_x_at	857.03	1443.47	1.68	4.163	0.000219
209973_at	103.71	174.27	1.68	4.974	0.000016
214146_s_at	2680.01	4501.54	1.68	4.614	0.000046
236570_at	53.64	89.92	1.68	6.371	0
223829_at	28.16	47.04	1.67	5.118	0.000007
232144_at	64.2	107.42	1.67	6.165	0
237412_at	97.4	163.11	1.67	4.622	0.000048
243989_at	80.63	134.7	1.67	5.024	0.000014
216609_at	74.9	124.15	1.66	4.773	0.000023
238232_at	45.62	75.9	1.66	5.955	0
1554707_at	39.96	66.27	1.66	6.289	0
222006_at	92.55	153.12	1.65	5.55	0.000003
41553_at	76.9	126.64	1.65	5.565	0.000003
214337_at	51.5	84.5	1.64	5.689	0.000001
231985_at	80.7	132.29	1.64	4.559	0.000065
1557185_at	54.85	90	1.64	6.392	0
237454_at	39.26	63.87	1.63	6.256	0

237511_at	41.47	67.48	1.63	5.984	0
239593_at	61.52	100.21	1.63	4.897	0.000025
241670_x_at	60.57	98.92	1.63	6.899	0
243459_x_at	128.63	209.86	1.63	6.778	0
1566582_x_at	58.7	95.44	1.63	6.13	0
218945_at	106.92	173.41	1.62	5.293	0.000007
220910_at	63.26	102.39	1.62	6.764	0
237869_at	81.77	132.65	1.62	5.018	0.000015
204390_at	42.32	68.2	1.61	6.783	0
231140_at	49.64	79.8	1.61	5.173	0.000007
241144_at	82.82	133.2	1.61	6.165	0
244477_at	71.62	115.36	1.61	6.726	0
1559438_at	103.7	166.48	1.61	5.236	0.000006
243288_at	89.16	142.32	1.6	6.918	0
1553094_at	45.36	72.47	1.6	5.266	0.000007
1557275_a_at	69.75	111.56	1.6	6.61	0
223426_s_at	71.78	114.29	1.59	6.193	0
232048_at	75.44	120.13	1.59	6.03	0
239172_x_at	63.75	101.34	1.59	6.922	0
1556679_at	65.81	104.42	1.59	5.868	0.000001
214174_s_at	81.26	128.59	1.58	6.2	0
1566002_at	75.41	119.38	1.58	5.894	0.000001
1566003_x_at	62.59	98.97	1.58	6.097	0
222419_x_at	64.86	101.61	1.57	6.281	0
244465_at	46.05	71.5	1.55	6.581	0
235457_at	264.07	166.67	-1.58	-6.723	0
209105_at	136.6	85.73	-1.59	-5.925	0
201165_s_at	312.15	194.49	-1.6	-6.242	0
218532_s_at	100.86	62.42	-1.62	-5.992	0
218842_at	241.14	146.75	-1.64	-6.799	0
222850_s_at	255.97	155.75	-1.64	-5.995	0
209259_s_at	183	110.13	-1.66	-5.772	0
218312_s_at	143.79	86.67	-1.66	-6.84	0
220235_s_at	116.02	70.08	-1.66	-5.226	0.000003
205798_at	2514.53	1501.84	-1.67	-6.386	0
1553856_s_at	152.66	91.38	-1.67	-5.765	0

200595_s_at	305.98	181.25	-1.69	-4.921	0.000008
227173_s_at	119.73	70.71	-1.69	-4.439	0.000053
201624_at	129.91	76.38	-1.7	-5.336	0.000002
204793_at	72.43	42.7	-1.7	-6.512	0
218918_at	142.35	82.88	-1.72	-5.565	0.000001
226251_at	114.7	66.6	-1.72	-4.63	0.000032
1569952_x_at	53.09	30.72	-1.73	-4.325	0.000064
206544_x_at	107.62	61.86	-1.74	-5.937	0
209189_at	247.7	142.39	-1.74	-4.536	0.000035
209307_at	160.37	92.35	-1.74	-4.401	0.000052
202431_s_at	295.13	168.14	-1.76	-4.825	0.000011
224074_at	84.81	48.21	-1.76	-5.437	0.000001
224833_at	1244.6	706.83	-1.76	-5.078	0.000004
203939_at	173.99	98.12	-1.77	-5.342	0.000002
226218_at	1662.79	937.39	-1.77	-5.125	0.000004
227198_at	66.29	37.26	-1.78	-3.916	0.000304
235085_at	358.86	200.11	-1.79	-6.551	0
201773_at	257.67	141.89	-1.82	-5.524	0.000001
243878_at	142.35	78.18	-1.82	-5.418	0.000001
1558662_s_at	227.91	125.04	-1.82	-3.733	0.000519
202770_s_at	162.38	88.44	-1.84	-4.104	0.000164
206337_at	775.36	419.03	-1.85	-5.291	0.000002
215342_s_at	257.61	139.34	-1.85	-4.892	0.000008
219667_s_at	190.01	101.99	-1.86	-4.042	0.000182
214615_at	115.03	61.65	-1.87	-5.862	0
226272_at	459.84	243.16	-1.89	-5.66	0.000001
203413_at	336.27	175.61	-1.91	-5.636	0.000001
211734_s_at	411.89	214.81	-1.92	-4.63	0.000022
221491_x_at	306.98	159.93	-1.92	-3.716	0.000527
221558_s_at	973.79	500.84	-1.94	-5.638	0.000001
221234_s_at	195.98	100.74	-1.95	-5.033	0.000006
241871_at	138.95	70.48	-1.97	-5.564	0.000001
217418_x_at	297.34	146.42	-2.03	-3.854	0.000322
243495_s_at	95.98	47.29	-2.03	-3.502	0.000973
209706_at	109.9	52.38	-2.1	-	0.006

	4			2.864	827
231798_at	157.68	71.51	-2.2	-6.542	0
205000_at	90.26	40.12	-2.25	-2.688	0.010283
209840_s_at	266.93	95.96	-2.78	-4.618	0.000031

Tromboz ve Kontrol grubunda farklı ifade edilen gen listesi.

Affy ID	Baseline Ortalama	Experiment Ortalama	Kat Değişimi	t istatistik	p değeri
1558048_x_at	53.42	277.51	5.19	5.878	0.000002
202411_at	90.92	361.54	3.98	2.854	0.007461
221419_s_at	219.4	730.79	3.33	7.5	0
236640_at	38.45	123.58	3.21	5.614	0.000002
221672_s_at	109.35	336.02	3.07	6.497	0
210295_at	36.67	106.25	2.9	5.76	0.000002
221065_s_at	46.56	132.92	2.86	8.329	0
215232_at	58	165.43	2.85	10.004	0
228178_s_at	61.61	167.82	2.72	6.805	0
211485_s_at	39.8	105.48	2.65	9.993	0
215382_x_at	53.46	138.47	2.59	5.604	0.000002
1569617_at	51	130.9	2.57	6.563	0
243828_at	33.66	85.75	2.55	4.355	0.000108
1569200_at	332.99	850.12	2.55	7.079	0
207166_at	27.48	67.85	2.47	9.582	0
237535_x_at	46.77	113.8	2.43	9.213	0
237899_at	37.51	90.99	2.43	5.929	0.000001
236673_at	67.61	160.58	2.38	6.053	0.000001
206352_s_at	76.41	180.83	2.37	5.44	0.000001
224316_at	56.42	133.78	2.37	4.306	0.000093
238638_at	69.33	164.47	2.37	7.952	0
237266_at	85.12	199.87	2.35	6.324	0
229097_at	57.54	134.21	2.33	4.841	0.000018
230698_at	24.97	58.15	2.33	6.011	0
239663_x_at	64.65	150.3	2.32	7.478	0
242664_at	26.65	61.81	2.32	9.477	0

1553721_at	25.54	59.29	2.32	7.608	0
211499_s_at	63.5	146.81	2.31	5.81	0.000001
235544_x_at	66.39	153.42	2.31	6.634	0
244477_at	78.44	178.8	2.28	10.954	0
208538_at	33.29	75.43	2.27	8.016	0
231021_at	122.31	277.29	2.27	5.616	0.000002
213270_at	59.53	134.58	2.26	7.594	0
240373_at	60.76	137.03	2.26	8.769	0
204854_at	54.68	123.19	2.25	6.454	0
207376_at	73.51	165.54	2.25	5.614	0.000002
230656_s_at	109.61	246.73	2.25	5.702	0.000001
1562586_at	42.6	96	2.25	4.279	0.00013
208461_at	29.59	65.6	2.22	6.269	0
232966_at	82.31	182.98	2.22	5.598	0.000001
234694_at	48.7	108.07	2.22	9.348	0
210277_at	78.22	172.76	2.21	5.224	0.000004
236570_at	57.58	127.09	2.21	9.42	0
234832_at	69.05	152.24	2.2	8.064	0
1570534_a_at	19.63	43.18	2.2	4.98	0.000014
229605_at	53.22	116.8	2.19	7.812	0
232313_at	78.11	171.16	2.19	5.037	0.000009
240241_at	69.65	152.75	2.19	4.944	0.000016
236094_at	76.04	165.53	2.18	5.915	0
211027_s_at	39.75	86.11	2.17	6.626	0
241670_x_at	67.2	146.08	2.17	11.748	0
244833_at	26.67	57.87	2.17	7.964	0
222784_at	135.03	291.85	2.16	6.381	0
237454_at	40.01	86.11	2.15	9.148	0
1564559_at	42.62	91.47	2.15	9.828	0
214316_x_at	91.62	196.13	2.14	8.293	0
232085_at	43.97	94.18	2.14	5.626	0.000002
222897_s_at	45.12	96.22	2.13	6.471	0
230358_at	46.06	97.66	2.12	9.074	0
1555429_at	31.57	66.88	2.12	8.179	0
216289_at	56.64	119.6	2.11	8.025	0
1564277_a_at	202.81	428.12	2.11	6.376	0
1569005_at	22.45	47.41	2.11	7.462	0
200637_s_at	35.82	75.32	2.1	5.329	0.000004

215114_at	94.91	199.29	2.1	6.293	0
225513_at	90.36	189.63	2.1	5.848	0.000001
242941_x_at	44.8	93.81	2.09	9.711	0
224189_x_at	23.31	48.52	2.08	6.53	0
232654_s_at	23.56	48.91	2.08	8.209	0
1566582_x_at	63.3	130.85	2.07	8.368	0
207684_at	77.86	160.2	2.06	7.264	0
225518_x_at	30.29	62.48	2.06	7.417	0
230289_at	46.61	95.95	2.06	5.4	0.000004
244021_at	46.98	97	2.06	10.401	0
221402_at	116.8	239.74	2.05	5.734	0.000001
237945_at	30.47	62.46	2.05	7.277	0
238232_at	46.76	96.1	2.05	8.064	0
244188_at	23.72	48.73	2.05	7.867	0
1557185_at	58.19	119.35	2.05	10.04	0
1564220_a_at	28.41	58.2	2.05	7.395	0
206333_at	27.99	57.19	2.04	5.932	0.000001
216707_at	52.98	108.33	2.04	8.329	0
230576_at	61.7	126.1	2.04	6.54	0
207306_at	43.91	89.31	2.03	7.016	0
208129_x_at	79.01	160.47	2.03	6.644	0
214222_at	49.52	100.56	2.03	9.441	0
225151_at	47.9	97.11	2.03	9.764	0
230309_at	24.24	49.29	2.03	8.547	0
234447_at	36.4	73.89	2.03	7.628	0
1566002_at	82.45	167.69	2.03	10.084	0
1566003_x_at	66.87	136.04	2.03	10.561	0
201205_at	48.64	98.13	2.02	9.448	0
211074_at	862.08	1737.6	2.02	8.861	0
215778_x_at	126.94	256.17	2.02	8.619	0
236448_at	73.46	148.42	2.02	6.357	0
1556679_at	71.82	145.41	2.02	8.502	0
228447_at	66.21	133.26	2.01	8.618	0
236056_s_at	55.26	110.92	2.01	7.111	0
244824_at	45.99	92.57	2.01	7.832	0
1552948_at	39.1	78.4	2.01	6.901	0
1561728_a_at	24.86	49.97	2.01	7.65	0
210939_s_at	62.3	124.48	2	7.205	0
217339_x_	69	137.91	2	8.939	0

at					
224157_at	83.86	167.97	2	8.334	0
240242_at	39.42	78.78	2	8.601	0
241709_s_at	27.3	54.71	2	7.805	0
1560141_at	69.01	138.24	2	9.251	0
208550_x_at	40.07	79.54	1.99	7.773	0
243365_s_at	26.41	52.45	1.99	7.46	0
206827_s_at	77.78	153.75	1.98	8.518	0
240986_at	25.32	50.1	1.98	8.35	0
242810_x_at	71.99	142.33	1.98	7.255	0
204551_s_at	39.17	77.01	1.97	7.075	0
234331_s_at	50.65	99.81	1.97	6.789	0
244017_at	40.18	79.04	1.97	7.854	0
214673_s_at	53.09	104.21	1.96	8.635	0
219379_x_at	87.51	171.63	1.96	9.104	0
226928_x_at	90.98	178.5	1.96	8.051	0
240396_at	41.14	80.71	1.96	9.221	0
204390_at	42.89	83.48	1.95	8.597	0
222711_s_at	64.7	126.31	1.95	7.367	0
208504_x_at	53.06	103.02	1.94	7.641	0
228668_x_at	109.93	212.75	1.94	10.759	0
236496_at	59.75	115.75	1.94	7.848	0
240686_x_at	46.81	90.86	1.94	8.342	0
241144_at	90.46	175.47	1.94	10.184	0
230007_at	46.46	89.75	1.93	8.367	0
231643_s_at	55.73	107.45	1.93	8.714	0
205272_s_at	89.36	171.57	1.92	8.688	0
214174_s_at	89.5	171.67	1.92	9.463	0
215319_at	36.15	69.26	1.92	9.521	0
239172_x_at	70.03	134.64	1.92	9.951	0
241633_x_at	64.72	124.33	1.92	9.174	0
244012_x_at	85.86	164.62	1.92	8.23	0
232900_at	66.41	127.12	1.91	8.677	0
244712_at	64.59	123.33	1.91	9.953	0
1566581_at	78.59	150	1.91	8.722	0
208497_x_at	60.99	116.09	1.9	8.321	0
241247_at	34.27	65.22	1.9	9.483	0
1554260_	97.96	51.23	-1.91	-	0

a_at				9.064	
1559133_at	69.44	36.36	-1.91	-9.19	0
200951_s_at	81.03	42.12	-1.92	-10.168	0
235003_at	163.66	84.94	-1.93	-8.902	0
235765_at	160.88	83.36	-1.93	-8.128	0
242760_x_at	182.96	94.69	-1.93	-9.277	0
202742_s_at	138.96	71.34	-1.95	-8.577	0
210943_s_at	893.32	458.27	-1.95	-8.845	0
215955_x_at	186.7	95.63	-1.95	-7.874	0
235743_at	43.57	22.36	-1.95	-9.096	0
1552417_a_at	41.34	21.19	-1.95	-8.515	0
214305_s_at	532.63	271.87	-1.96	-8.352	0
216814_at	53.67	27.43	-1.96	-11.311	0
243206_at	44.57	22.75	-1.96	-8.519	0
212008_at	118.1	59.88	-1.97	-12.319	0
222586_s_at	227.58	115.65	-1.97	-8.713	0
223758_s_at	106.29	53.99	-1.97	-8.09	0
224343_x_at	105.55	53.66	-1.97	-7.892	0
1558924_s_at	74.8	38	-1.97	-9.057	0
208960_s_at	585.35	295.4	-1.98	-9.685	0
209754_s_at	38.36	19.41	-1.98	-8.684	0
212249_at	101.66	51.42	-1.98	-8.228	0
214814_at	76.06	38.39	-1.98	-7.838	0
239798_at	155.03	78.34	-1.98	-9.371	0
243182_at	154.72	78.17	-1.98	-8.25	0
208003_s_at	260.46	130.69	-1.99	-9.468	0
208663_s_at	300.63	150.87	-1.99	-8.839	0
229776_at	356.62	178.84	-1.99	-9.809	0
227257_s_at	253.88	127.17	-2	-12.956	0
233178_at	95.53	47.74	-2	-8.971	0
201083_s_at	158.51	78.95	-2.01	-10.195	0
210458_s_at	76.97	38.35	-2.01	-6.868	0
210461_s_	514.77	256.39	-2.01	-	0

at				7.852	
212027_at	310.6	154.63	-2.01	-7.932	0
225565_at	409.29	203.52	-2.01	-9.361	0
200727_s_at	481.85	238.35	-2.02	-6.708	0
218273_s_at	110.8	54.79	-2.02	-11.196	0
236524_at	151.43	75.06	-2.02	-7.879	0
244287_at	112.2	55.56	-2.02	-10.232	0
1564776_at	221.7	109.84	-2.02	-7.689	0
201951_at	161.39	79.45	-2.03	-9.688	0
237119_at	134.99	66.63	-2.03	-8.543	0
1559883_s_at	171.42	84.59	-2.03	-6.429	0
201946_s_at	166.8	81.93	-2.04	-9.866	0
209583_s_at	101.04	49.42	-2.04	-7.702	0
212065_s_at	94.43	46.26	-2.04	-9.463	0
214659_x_at	140.16	68.85	-2.04	-6.874	0
216449_x_at	222.54	108.98	-2.04	-8.089	0
1555814_a_at	1639.26	803.66	-2.04	-7.256	0
200598_s_at	541.21	263.6	-2.05	-7.11	0
214352_s_at	349.59	170.83	-2.05	-10.307	0
215698_at	190.37	92.94	-2.05	-8.911	0
228643_at	68.74	33.45	-2.05	-9.091	0
235009_at	129.39	63.13	-2.05	-7.467	0
237884_x_at	67.67	33.05	-2.05	-9.659	0
235376_at	361.31	175.44	-2.06	-12.799	0
239788_at	123.48	59.93	-2.06	-9.571	0
1556931_at	203.41	98.66	-2.06	-8.982	0
1562230_at	47.56	23.11	-2.06	-9.48	0
214843_s_at	307.44	148.84	-2.07	-12.267	0
224247_s_at	231.64	111.77	-2.07	-11.499	0
232055_at	98.52	47.55	-2.07	-7.394	0
1555797_a_at	764.28	370.04	-2.07	-8.038	0
220764_at	111.54	53.69	-2.08	-7.673	0

233303_at	200.29	96.35	-2.08	-7.824	0
242279_at	94.48	45.4	-2.08	-9.846	0
1558937_s_at	101.42	48.83	-2.08	-10.432	0
202118_s_at	88.73	42.56	-2.09	-7.275	0
213194_at	52.17	24.94	-2.09	-8.169	0
235577_at	255.31	121.96	-2.09	-8.103	0
207983_s_at	729.82	347.56	-2.1	-13.275	0
209131_s_at	71.09	33.89	-2.1	-6.475	0
215342_s_at	315.9	150.14	-2.1	-5.87	0
218521_s_at	289.39	137.72	-2.1	-7.789	0
222585_x_at	273.33	129.91	-2.1	-10.225	0
238341_at	154.53	73.42	-2.1	-9.843	0
212076_at	179.43	85.09	-2.11	-10.053	0
231562_at	100.6	47.73	-2.11	-7.926	0
1554708_s_at	63.25	29.95	-2.11	-6.484	0
1561763_at	81.11	38.5	-2.11	-10.225	0
221428_s_at	140.82	66.45	-2.12	-7.9	0
227101_at	220.67	104.21	-2.12	-11.533	0
232364_at	54.78	25.88	-2.12	-6.819	0
214500_at	223.64	104.83	-2.13	-12.615	0
224853_at	181.91	85.6	-2.13	-10.549	0
204427_s_at	118.32	55.32	-2.14	-6.3	0
213742_at	192.16	89.95	-2.14	-8.291	0
217826_s_at	448.91	209.35	-2.14	-8.632	0
218197_s_at	205.27	96.14	-2.14	-11.717	0
224568_x_at	1159.07	542.75	-2.14	-5.606	0.000002
239432_at	294.05	137.7	-2.14	-10.957	0
1552274_at	288.16	134.72	-2.14	-10.271	0
1554249_a_at	94.32	44.01	-2.14	-8.97	0

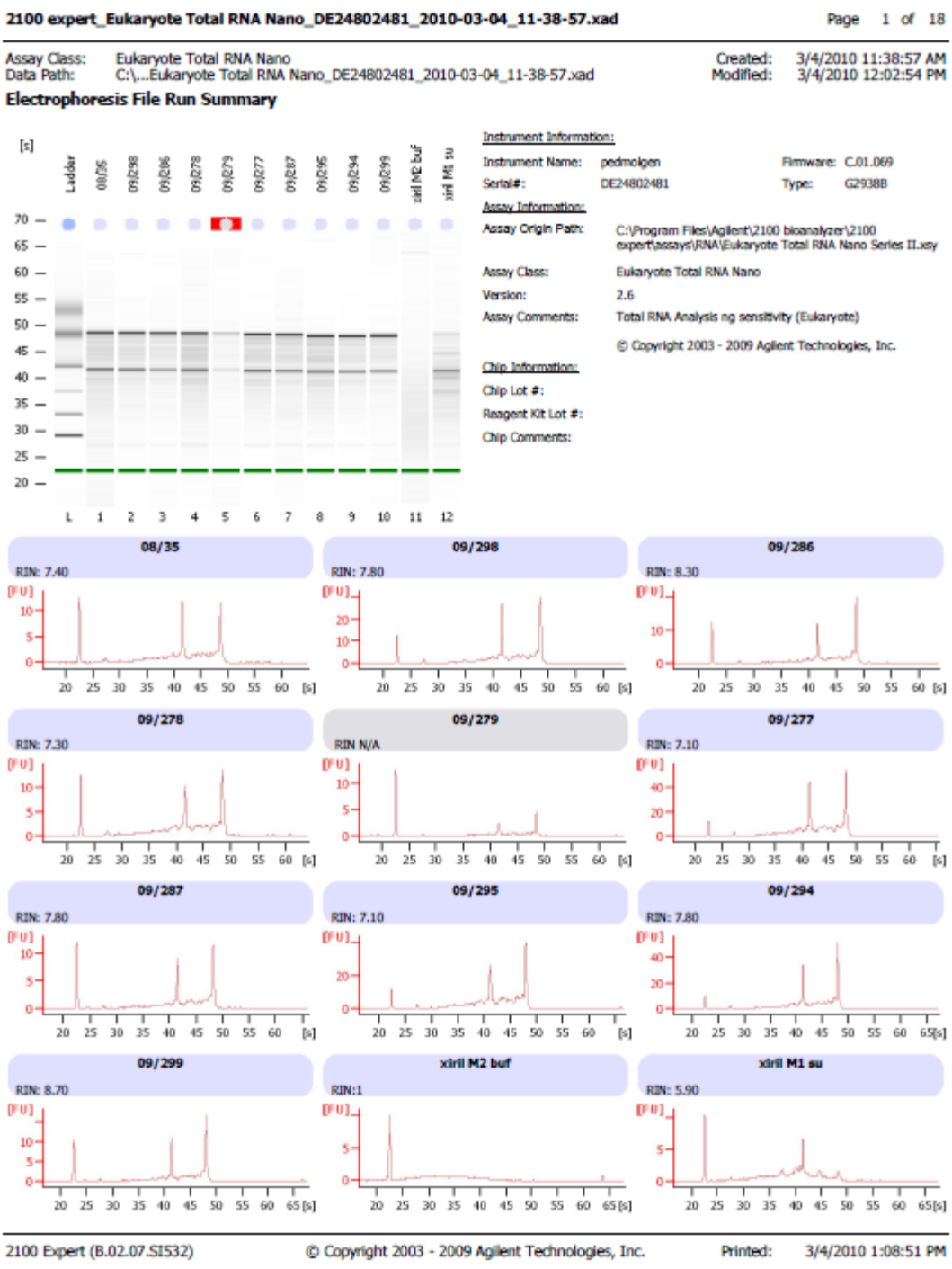
204732_s_at	95.96	44.6	-2.15	-9.458	0
211352_s_at	170.09	79.11	-2.15	-10.236	0
1562044_at	76.43	35.61	-2.15	-5.189	0.000007
201861_s_at	1744.23	807.93	-2.16	-10.738	0
220477_s_at	200.11	92.8	-2.16	-7.377	0
221268_s_at	62.09	28.8	-2.16	-6.128	0
233957_at	57.93	26.83	-2.16	-6.66	0
212720_at	120.62	55.67	-2.17	-8.223	0
229571_at	195.55	90.15	-2.17	-9.179	0
241774_at	174.39	80.43	-2.17	-8.405	0
1554676_at	159.04	73.17	-2.17	-5.863	0.000001
214723_x_at	130.43	59.42	-2.19	-8.057	0
236254_at	434.23	198.21	-2.19	-12.169	0
1557950_at	236.17	107.78	-2.19	-13.438	0
200641_s_at	766.39	348.76	-2.2	-6.371	0
200796_s_at	114.2	52.01	-2.2	-5.679	0.000001
243124_at	109.37	49.62	-2.2	-10.039	0
1552610_a_at	200.37	91.28	-2.2	-8.708	0
1556336_at	153.74	69.91	-2.2	-9.174	0
211559_s_at	78.23	35.33	-2.21	-5.379	0.000003
208744_x_at	162.58	73.34	-2.22	-10.041	0
210178_x_at	192.48	86.81	-2.22	-10.803	0
1570194_x_at	114.55	51.51	-2.22	-6.111	0
208194_s_at	197.11	88.46	-2.23	-8.842	0
219024_at	153.85	69.09	-2.23	-11.667	0
224854_s_at	220.8	99.13	-2.23	-10.236	0
238563_at	246.98	110.83	-2.23	-8.912	0
238800_s_at	359.35	160.81	-2.23	-9.312	0
244679_at	143.87	64.44	-2.23	-10.513	0
239027_at	539.84	240.78	-2.24	-9.132	0

1557895_at	91.8	40.9	-2.24	-7.092	0
201151_s_at	160.09	71.23	-2.25	-5.813	0.000001
203141_s_at	162.99	72.32	-2.25	-12.683	0
210281_s_at	100.19	44.53	-2.25	-9.652	0
213926_s_at	107.6	47.91	-2.25	-9.157	0
216361_s_at	68.92	30.64	-2.25	-9.555	0
228250_at	156.81	69.76	-2.25	-10.171	0
239512_at	83.93	37.37	-2.25	-9.072	0
1570021_at	51.73	23.03	-2.25	-8.241	0
209024_s_at	379.78	167.91	-2.26	-7.229	0
219858_s_at	40.44	17.91	-2.26	-9.746	0
1568680_s_at	150.49	66.47	-2.26	-11.612	0
208610_s_at	756.95	333.08	-2.27	-8.448	0
206471_s_at	145.59	63.84	-2.28	-7.691	0
220668_s_at	81.77	35.86	-2.28	-5.709	0.000002
241955_at	157.73	69.21	-2.28	-10.881	0
204881_s_at	233.41	102.12	-2.29	-10.009	0
206470_at	256.24	111.66	-2.29	-6.767	0
212417_at	114.37	49.9	-2.29	-12.327	0
229010_at	175.24	76.64	-2.29	-9.072	0
201101_s_at	367.03	159.75	-2.3	-8.416	0
223940_x_at	1185.86	514.97	-2.3	-5.961	0.000001
243031_at	121.54	52.75	-2.3	-10.566	0
1569385_s_at	284.61	123.61	-2.3	-8.332	0
1558015_s_at	168.25	72.81	-2.31	-7.283	0
210282_at	110.69	47.63	-2.32	-10.357	0
209060_x_at	162.24	69.55	-2.33	-10.13	0
211993_at	273.89	117.72	-2.33	-6.887	0
222538_s_at	157.73	67.6	-2.33	-8.733	0
202719_s_at	588	250.8	-2.34	-8.858	0
236533_at	443.32	189.79	-2.34	-9.749	0

227223_at	388.24	165.5	-2.35	-8.779	0
235744_at	56.21	23.9	-2.35	-8.228	0
214544_s_at	96.92	40.33	-2.4	-6.788	0
1558093_s_at	67.14	27.97	-2.4	-7.897	0
215078_at	58.51	23.87	-2.45	-7.29	0
241620_at	103.84	42.28	-2.46	-7.855	0
243878_at	172.69	70.32	-2.46	-7.048	0
228868_x_at	118.43	47.96	-2.47	-9.153	0
210172_at	194.33	78.52	-2.48	-7.487	0
222458_s_at	135.61	54.61	-2.48	-9.813	0
1555167_s_at	1232.05	496.12	-2.48	-7.252	0
215236_s_at	108.1	42.88	-2.52	-8.186	0
200607_s_at	374.97	147.81	-2.54	-9.459	0
235167_at	109.84	43.18	-2.54	-9.67	0
222858_s_at	838.12	327.4	-2.56	-9.626	0
209257_s_at	181.16	70.24	-2.58	-9.279	0
222562_s_at	83.54	32.28	-2.59	-11.263	0
213875_x_at	222.12	84.48	-2.63	-10.271	0
211968_s_at	1125.19	422.67	-2.66	-10.492	0
243495_s_at	107.88	40.34	-2.67	-4.591	0.000069
217234_s_at	203.76	76.04	-2.68	-7.504	0
225751_at	296.95	110.79	-2.68	-14.744	0
206396_at	68.82	25.52	-2.7	-9.139	0
208364_at	148.35	54.96	-2.7	-13.876	0
212177_at	139.48	51.75	-2.7	-9.735	0
227152_at	1362.09	503.63	-2.7	-11.319	0
208900_s_at	421.32	153.74	-2.74	-10.521	0
223701_s_at	85.72	31.16	-2.75	-10.698	0
207001_x_at	396.96	144.08	-2.76	-8.133	0
208325_s_at	197.55	71.1	-2.78	-12.294	0
210356_x_at	410.81	143.3	-2.87	-5.537	0.000004

213998_s_at	1362.68	470.07	-2.9	-11.59	0
1557910_at	231.38	77.57	-2.98	-5.391	0.000006
217418_x_at	364.95	114.9	-3.18	-5.736	0.000002
200806_s_at	286.94	87.56	-3.28	-14.411	0
1558111_at	387.94	99.82	-3.89	-12.561	0
235811_at	279.31	65.78	-4.25	-9.608	0
1558747_at	627.94	113.52	-5.53	-9.044	0

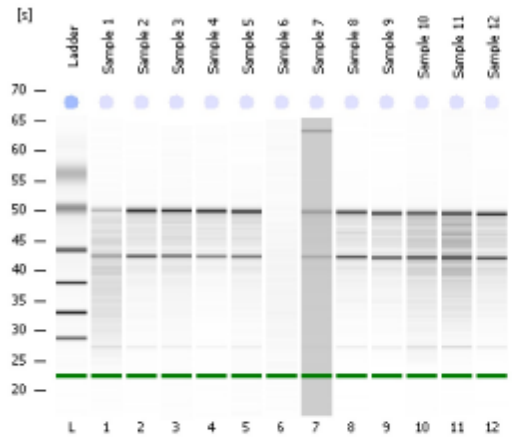
Ek-2: Biyoanalizör Sonuçları



Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2008-10-30_23-16-26.xad

Created: 10/30/2008 9:16:26 PM
Modified: 11/4/2008 6:41:25 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

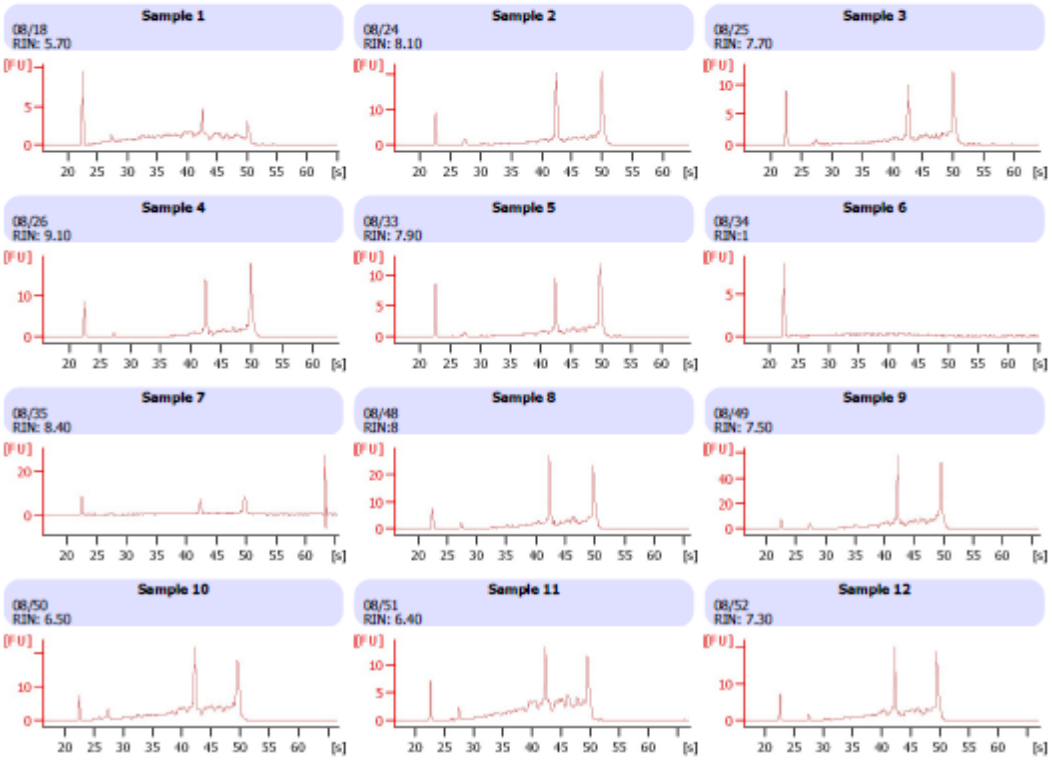
Instrument Name: DE24802481 Firmware: C.01.055
Serial#: DE24802481 Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #:
Reagent Kit Lot #:
Chip Comments:

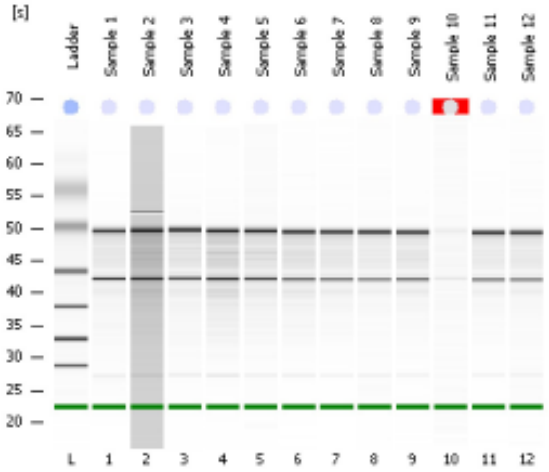


© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2008-10-31_00-08-53.xad

Created: 10/30/2008 10:08:53 PM
Modified: 11/4/2008 6:41:08 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

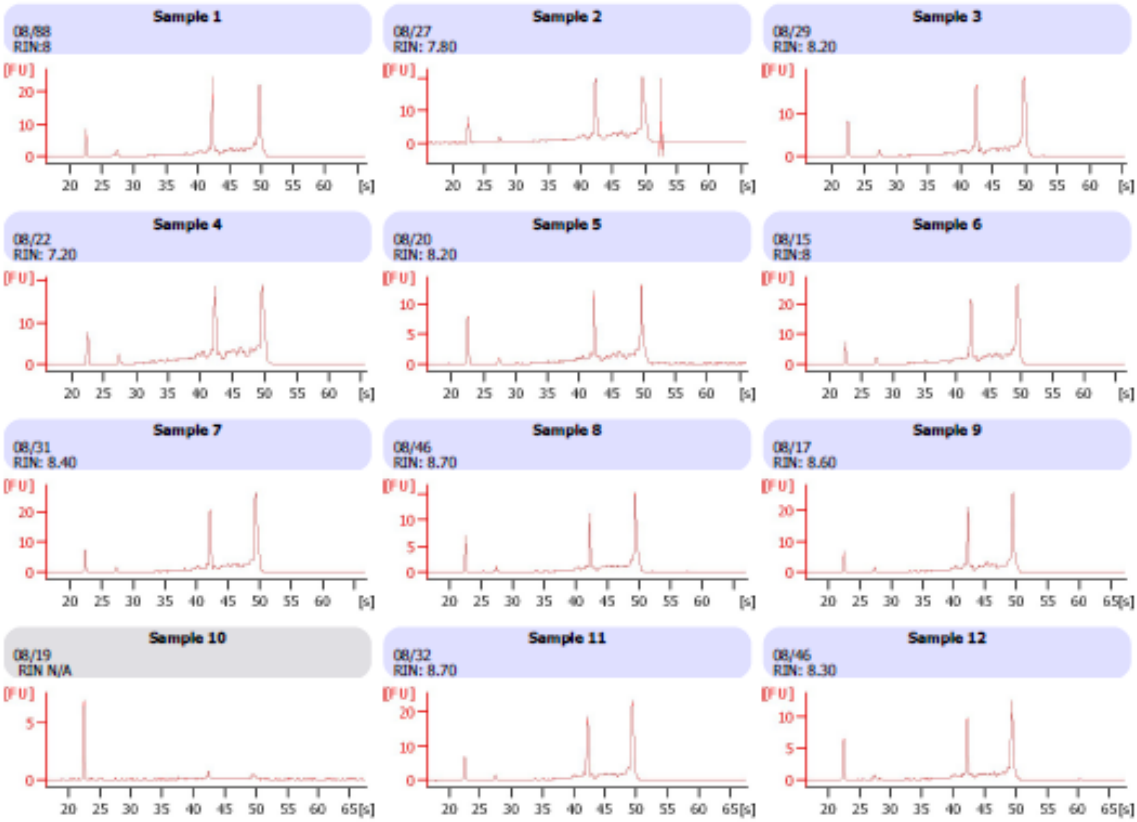
Instrument Name:	DE24802481	Firmware:	C.01.055
Serial#:	DE24802481	Type:	G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #:
Reagent Kit Lot #:
Chip Comments:

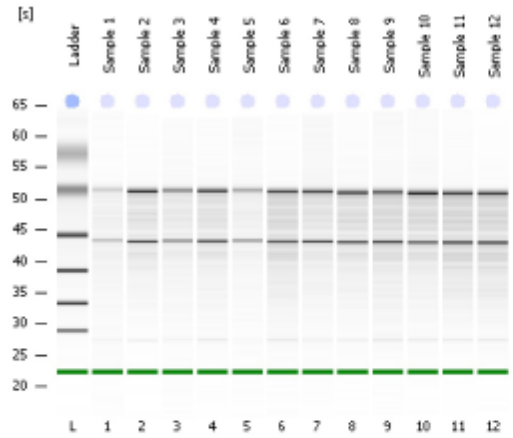


© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2008-11-10_01-59-51.xad

Created: 11/9/2008 11:59:51 PM
Modified: 11/10/2008 12:23:50 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

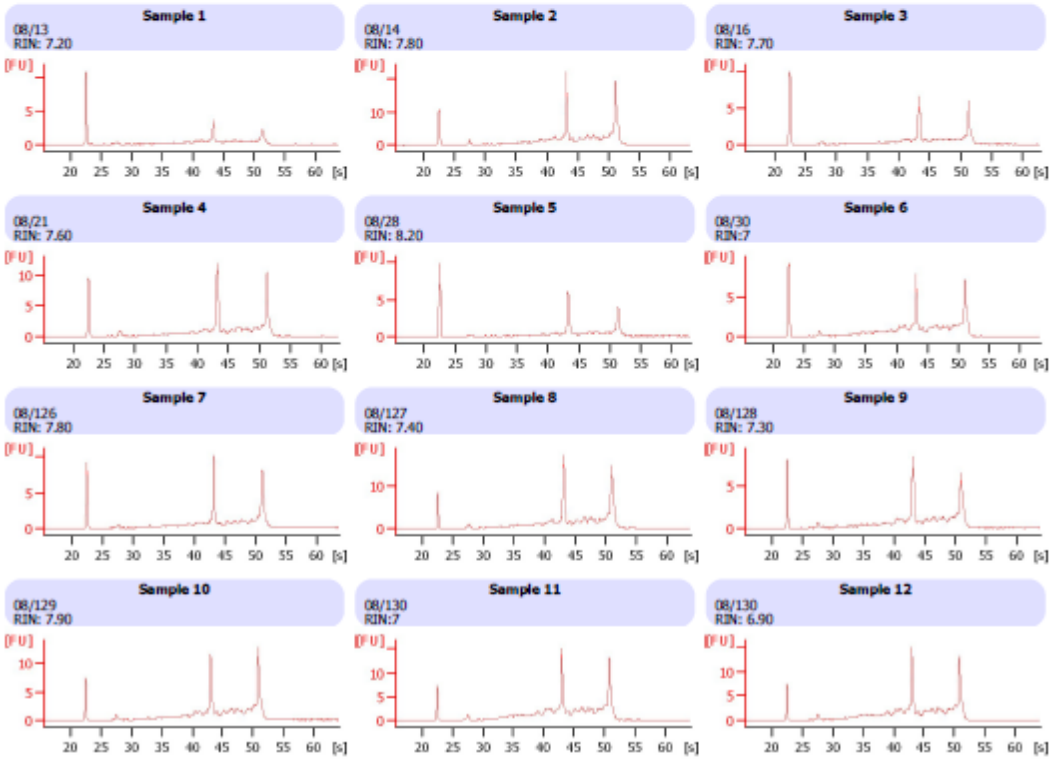
Instrument Name: DE24802481 Firmware: C.01.055
Serial#: DE24802481 Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #:
Reagent Kit Lot #:
Chip Comments:

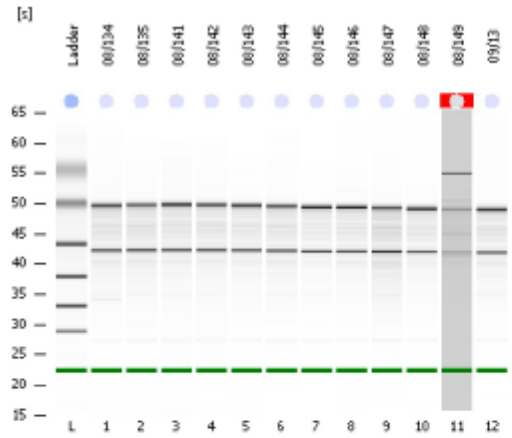


 © Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2009-01-16_22-38-30.xad

Created: 1/16/2009 8:38:30 PM
Modified: 1/16/2009 9:02:29 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

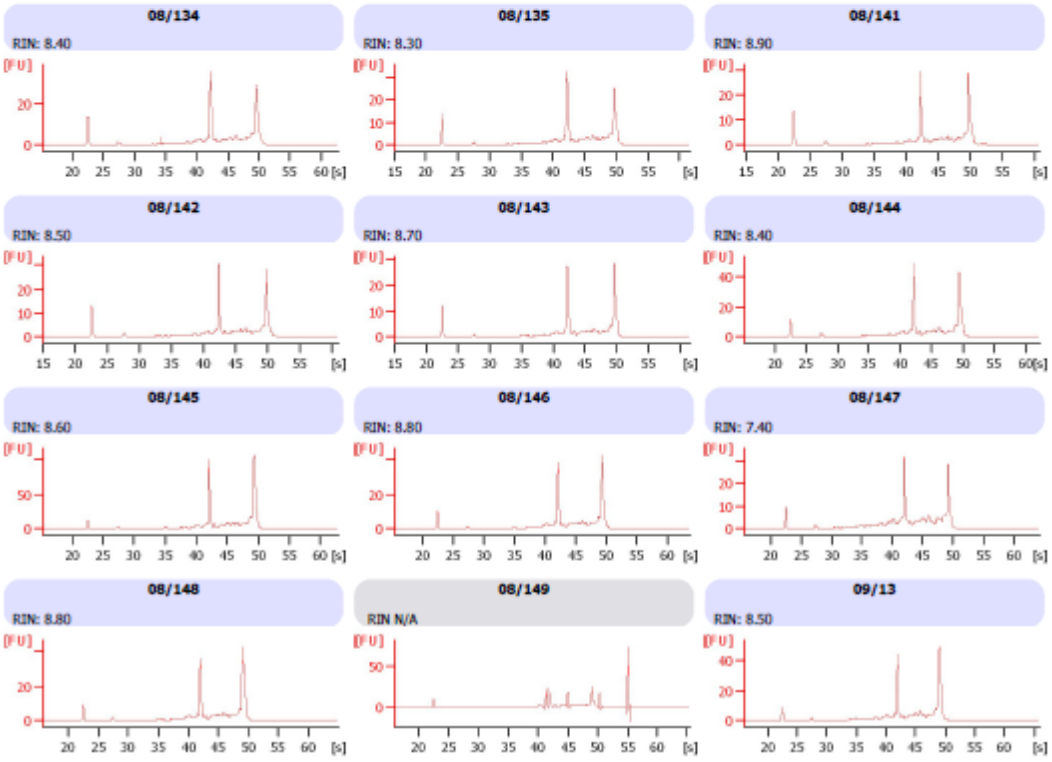
Instrument Name: DE24802481 Firmware: C.01.055
Serial#: DE24802481 Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #:
Reagent Kit Lot #:
Chip Comments:

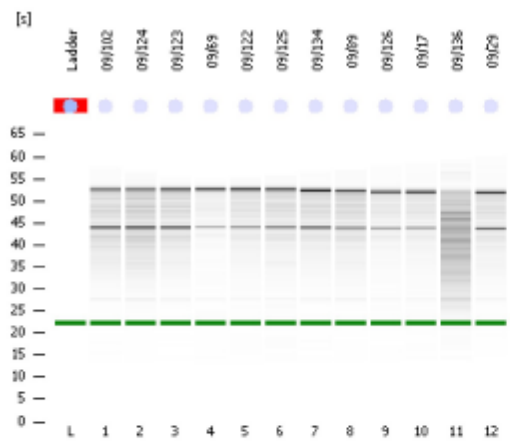


© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2009-03-30_02-29-04.xad

Created: 3/30/2009 12:29:04 AM
Modified: 3/30/2009 12:53:02 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

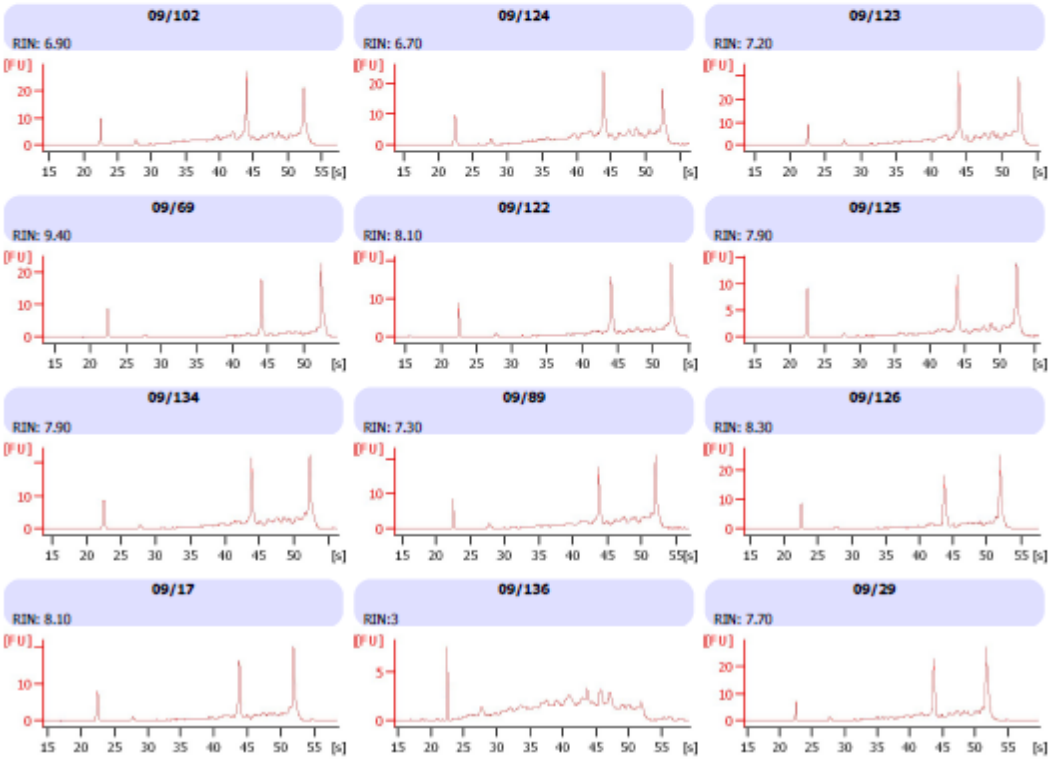
Instrument Name: DE24802481 Firmware: C.01.055
Serial#: DE24802481 Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #:
Reagent Kit Lot #:
Chip Comments:

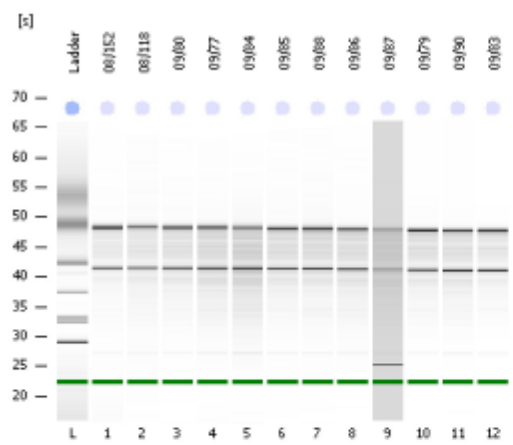


© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2009-03-30_03-51-20.xad

Created: 3/30/2009 1:51:20 AM
Modified: 3/30/2009 2:14:31 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

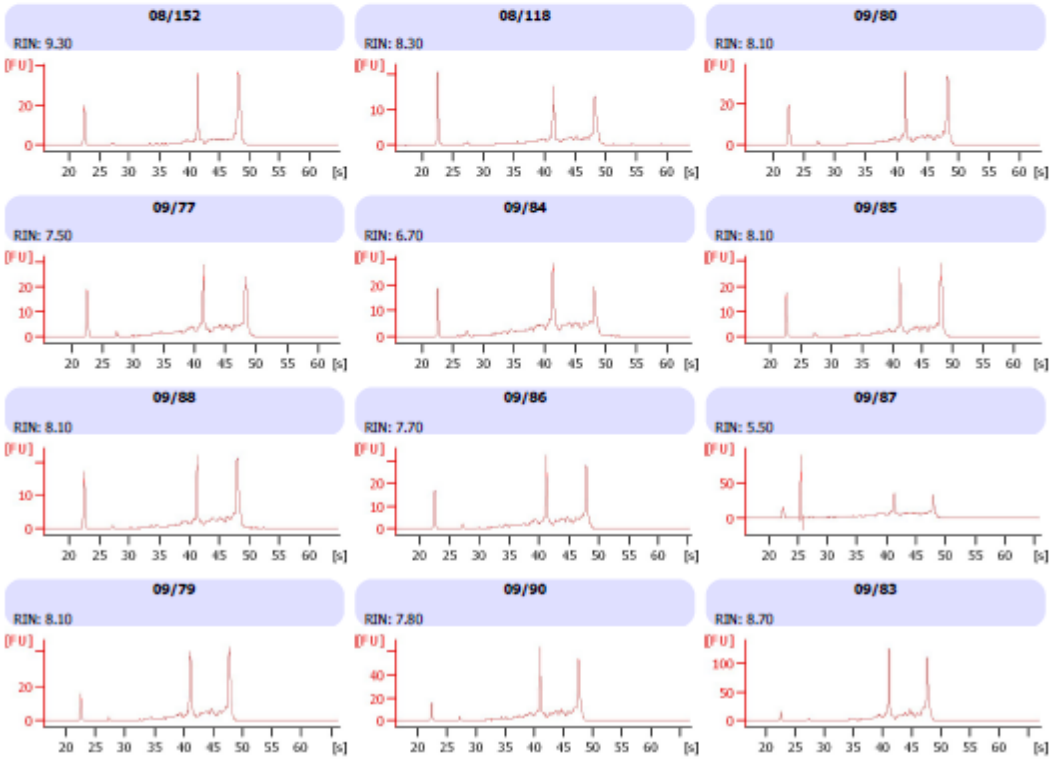
Instrument Name: DE24802481 Firmware: C.01.055
Serial#: DE24802481 Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #:
Reagent Kit Lot #:
Chip Comments:

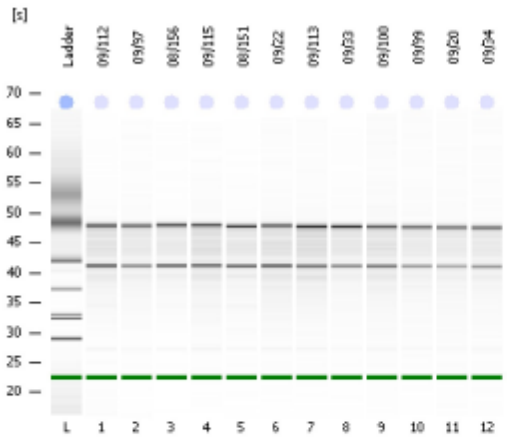


© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2009-03-30_04-46-28.xad

Created: 3/30/2009 2:46:28 AM
Modified: 3/30/2009 3:09:37 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

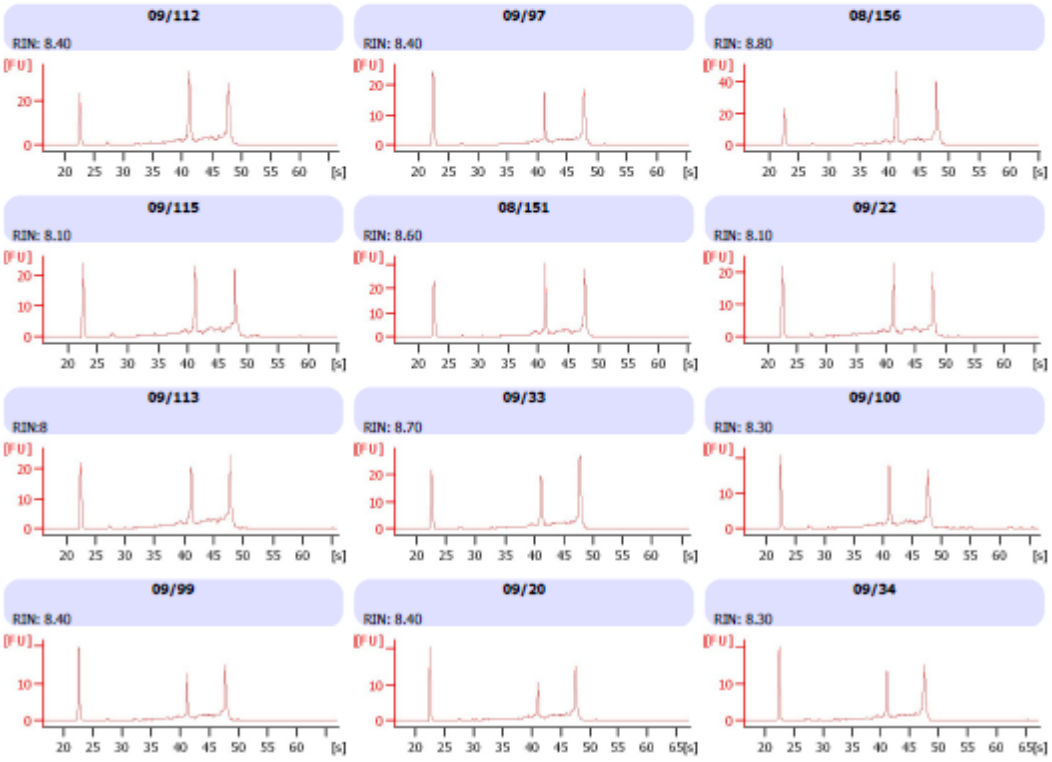
Instrument Name: DE24802481 Firmware: C.01.055
Serial#: DE24802481 Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #:
Reagent Kit Lot #:
Chip Comments:

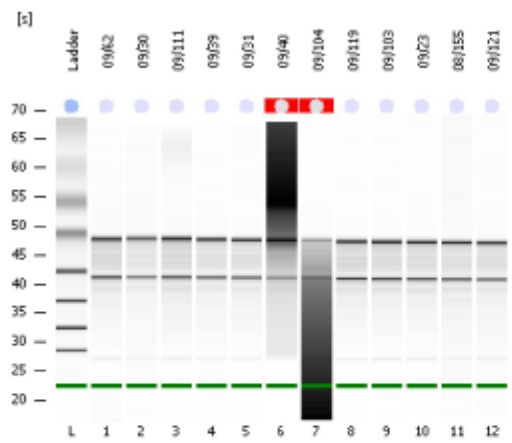


© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2009-04-07_00-21-23.xad

Created: 4/6/2009 10:21:23 PM
Modified: 4/6/2009 10:44:34 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

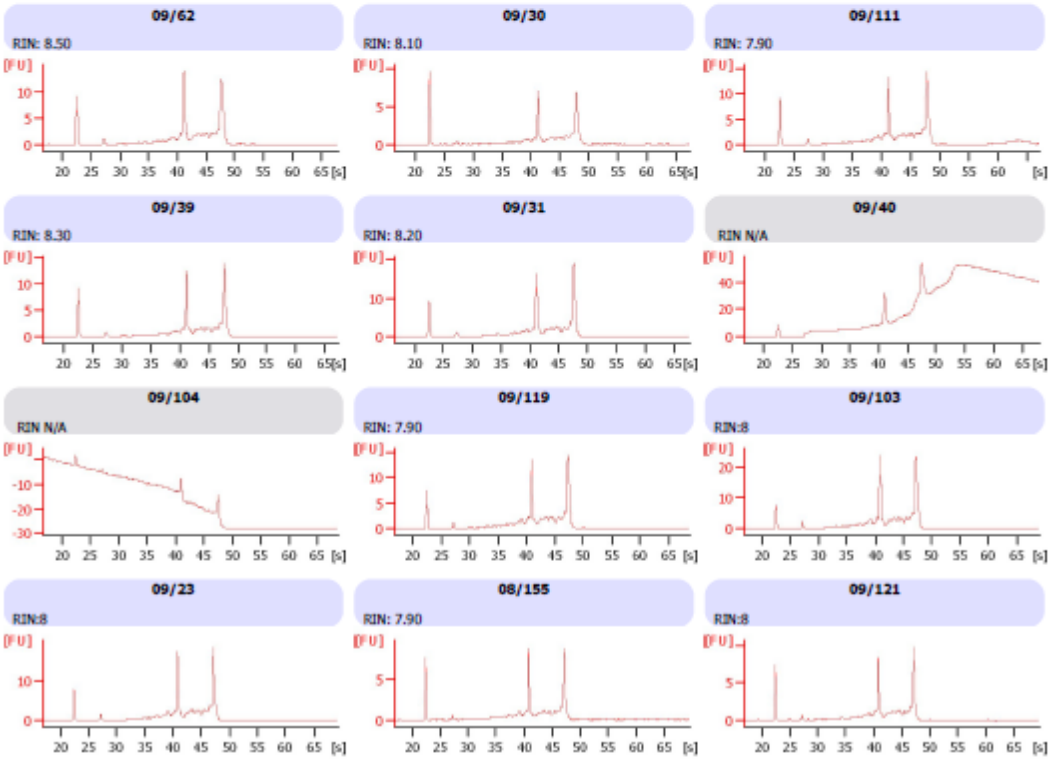
Instrument Name:	DE24802481	Firmware:	C.01.055
Serial#:	DE24802481	Type:	G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path:	C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Assay Class:	Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version:	2.5
Assay Comments:	Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #:	
Reagent Kit Lot #:	
Chip Comments:	

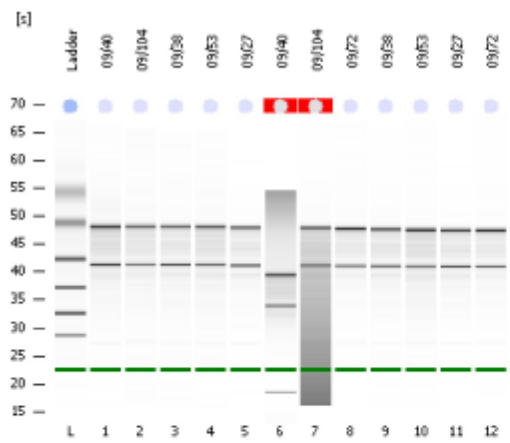


© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2009-04-08_03-20-05.xad

Created: 4/8/2009 1:20:05 AM
Modified: 4/8/2009 1:44:03 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

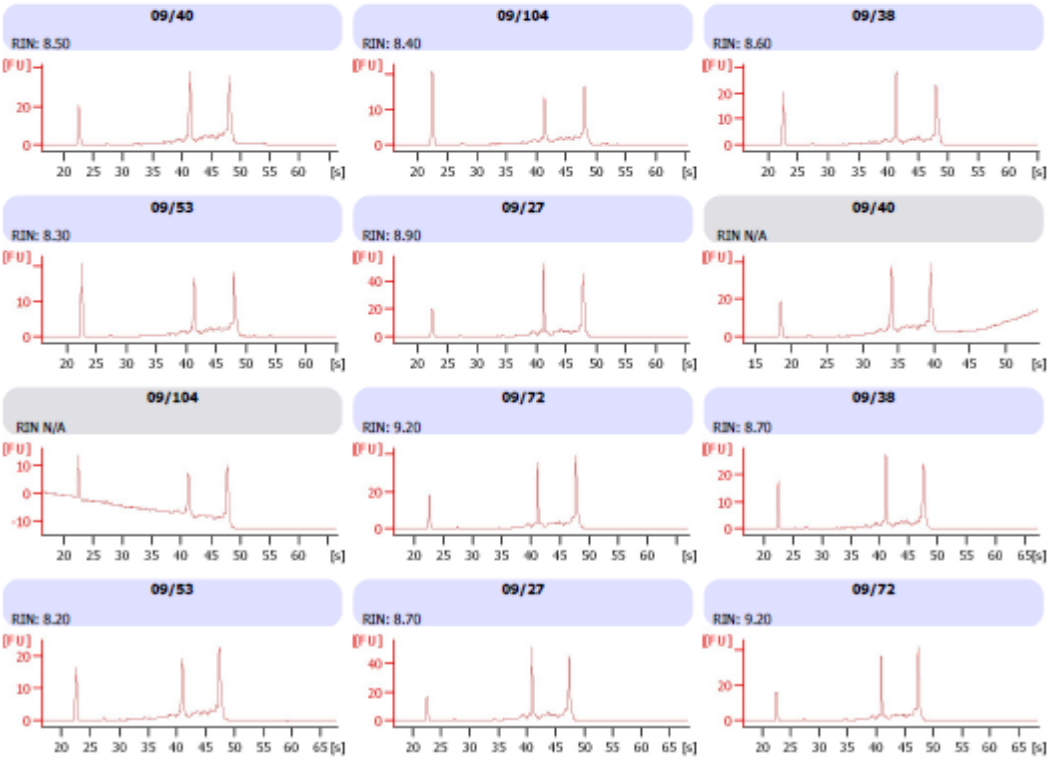
Instrument Name: DE24802481 Firmware: C.01.055
Serial#: DE24802481 Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot #:
Reagent Kit Lot #:
Chip Comments:

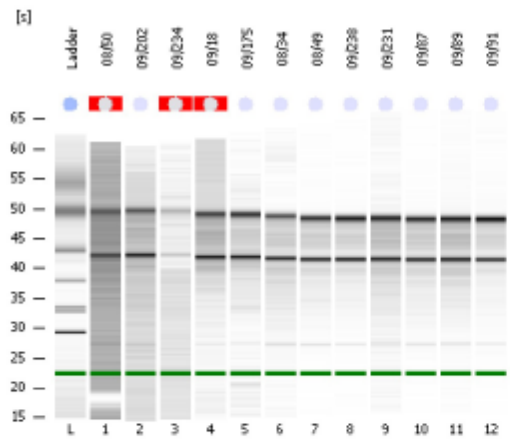


© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: EukaryoteTotal RNA Nano
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2009-08-18_14-41-26.xad

Created: 8/18/2009 2:41:26 PM
Modified: 8/18/2009 3:05:26 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

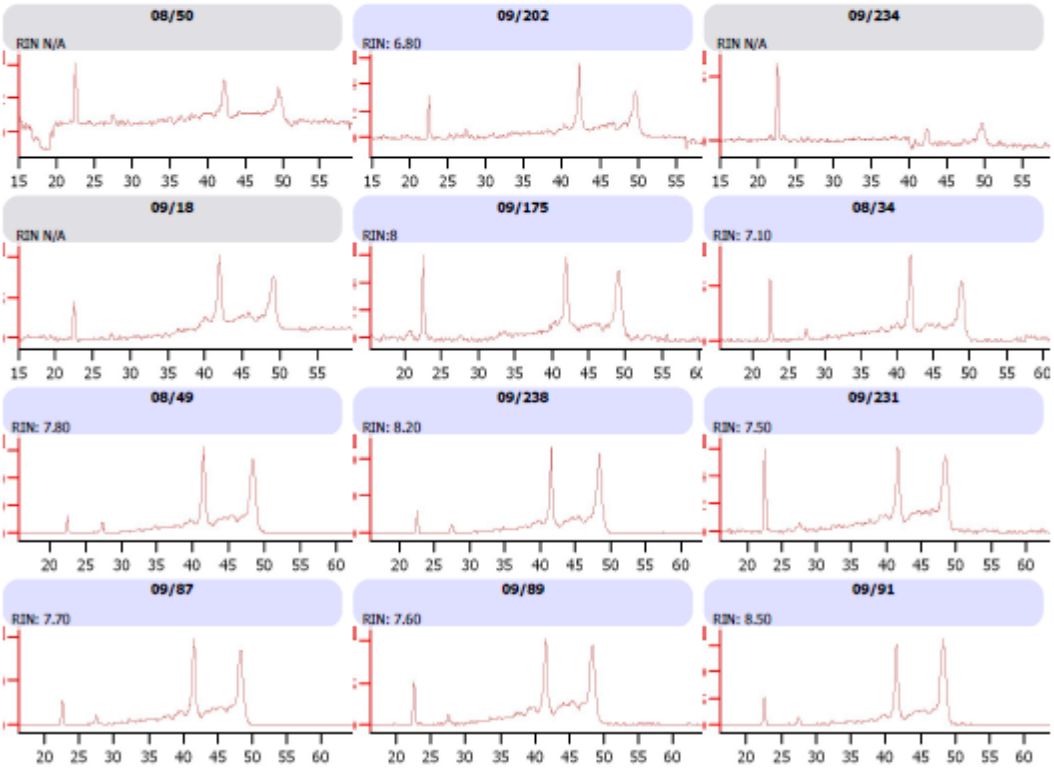
Instrument Name: DE24802481
Serial#: DE24802481
Firmware: C.01.055
Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Title: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot:
Reagent Kit Lot:
Chip Comments:

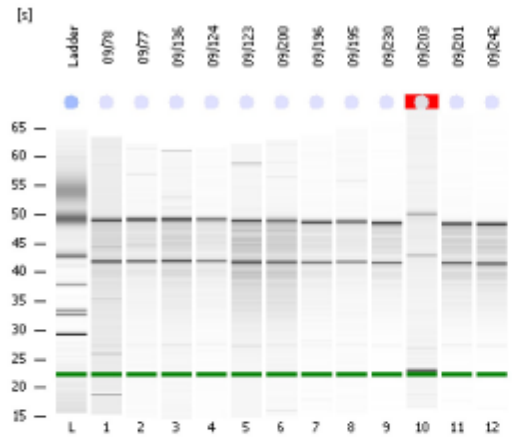


© Copyright 2003-2006 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: EukaryoteTotal RNA Nano
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2009-08-18_15-10-22.xad

Created: 8/18/2009 3:10:22 PM
Modified: 8/18/2009 3:33:33 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

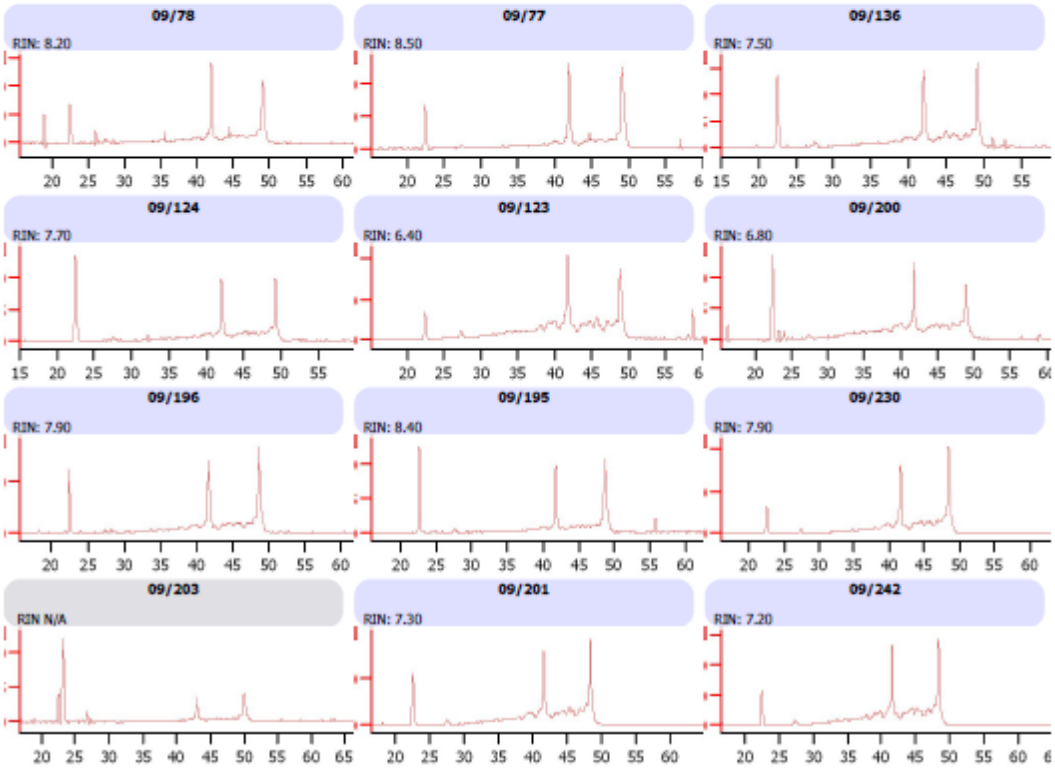
Instrument Name:	DE24802481	Firmware:	C.01.055
Serial#:	DE24802481	Type:	G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path:	C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Title:	Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version:	2.5
Assay Comments:	Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot:	
Reagent Kit Lot:	
Chip Comments:	

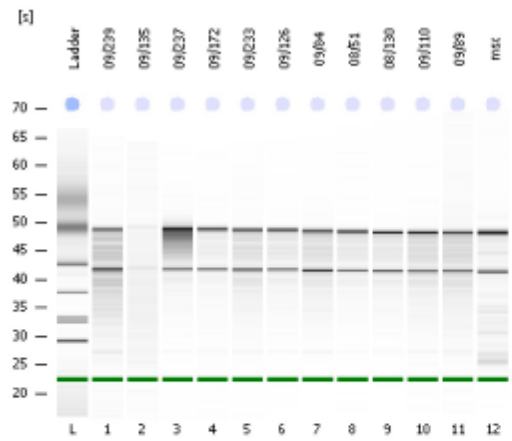


© Copyright 2003-2006 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: EukaryoteTotal RNA Nano
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2009-08-18_15-55-00.xad

Created: 8/18/2009 3:55:00 PM
Modified: 8/18/2009 4:18:12 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

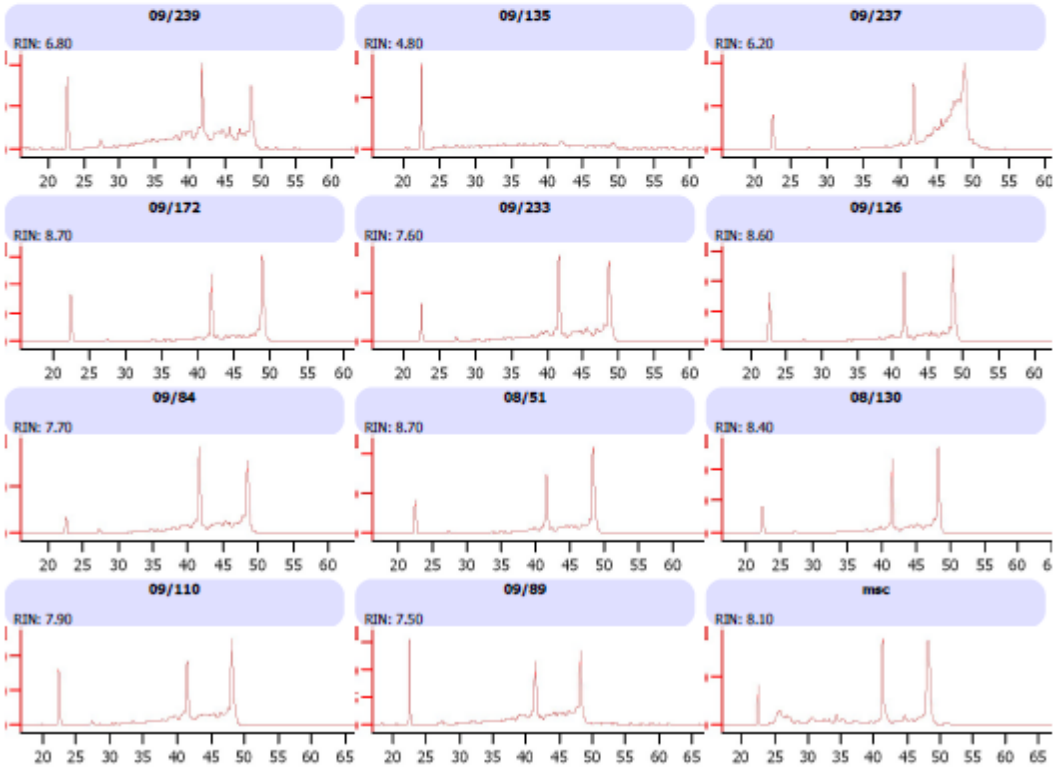
Instrument Name: DE24802481 Firmware: C.01.055
Serial#: DE24802481 Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Title: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot:
Reagent Kit Lot:
Chip Comments:

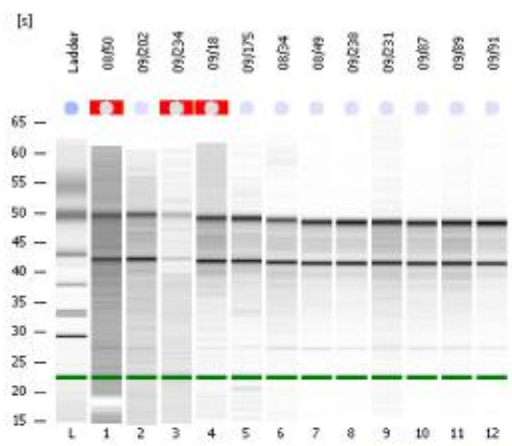


© Copyright 2003-2006 Agilent Technologies, Inc.

Assay Class: EukaryoteTotal RNA Nano
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2009-08-18_14-41-26.xad

Created: 8/18/2009 2:41:26 PM
Modified: 8/18/2009 3:05:26 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

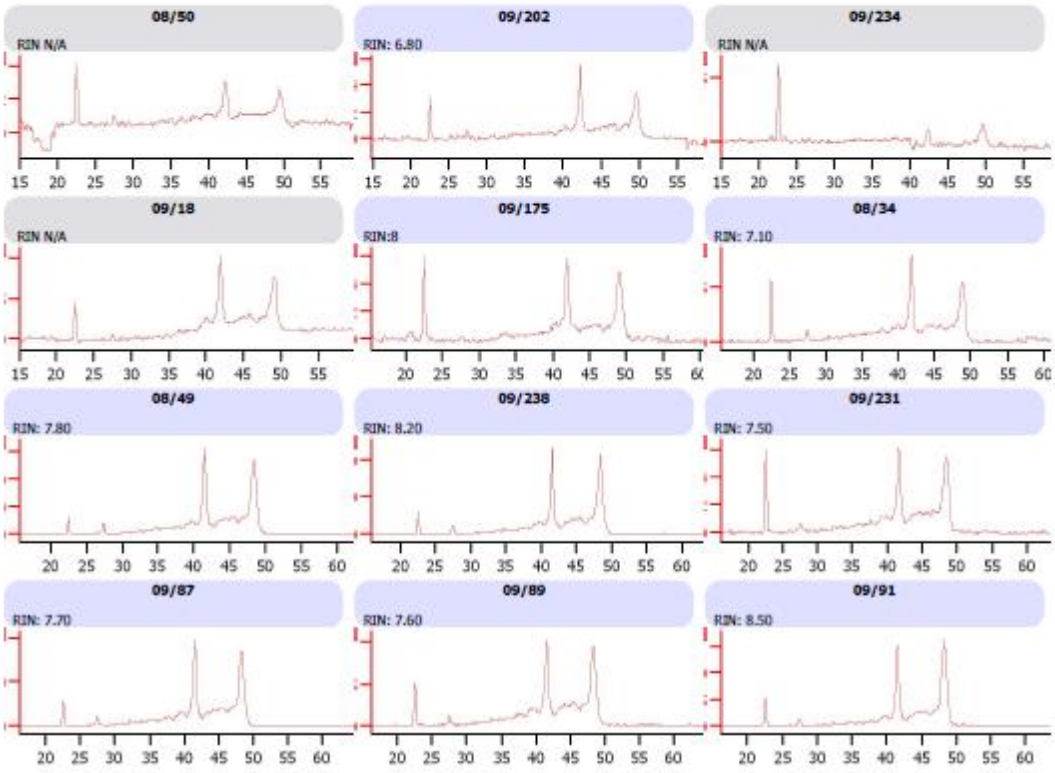
Instrument Name: DE24802481 Firmware: C.01.055
Serial#: DE24802481 Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Title: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot:
Reagent Kit Lot:
Chip Comments:

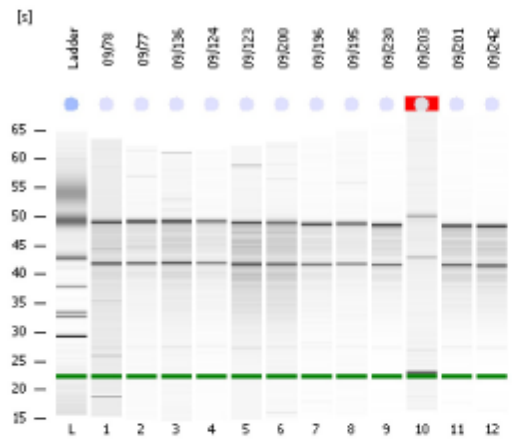


© Copyright 2003-2006 Agilent Technologies, Inc.
Printed: 8/18/2009 4:40:46 PM

Assay Class: EukaryoteTotal RNA Nano
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE24802481_2009-08-18_15-10-22.xad

Created: 8/18/2009 3:10:22 PM
Modified: 8/18/2009 3:33:33 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

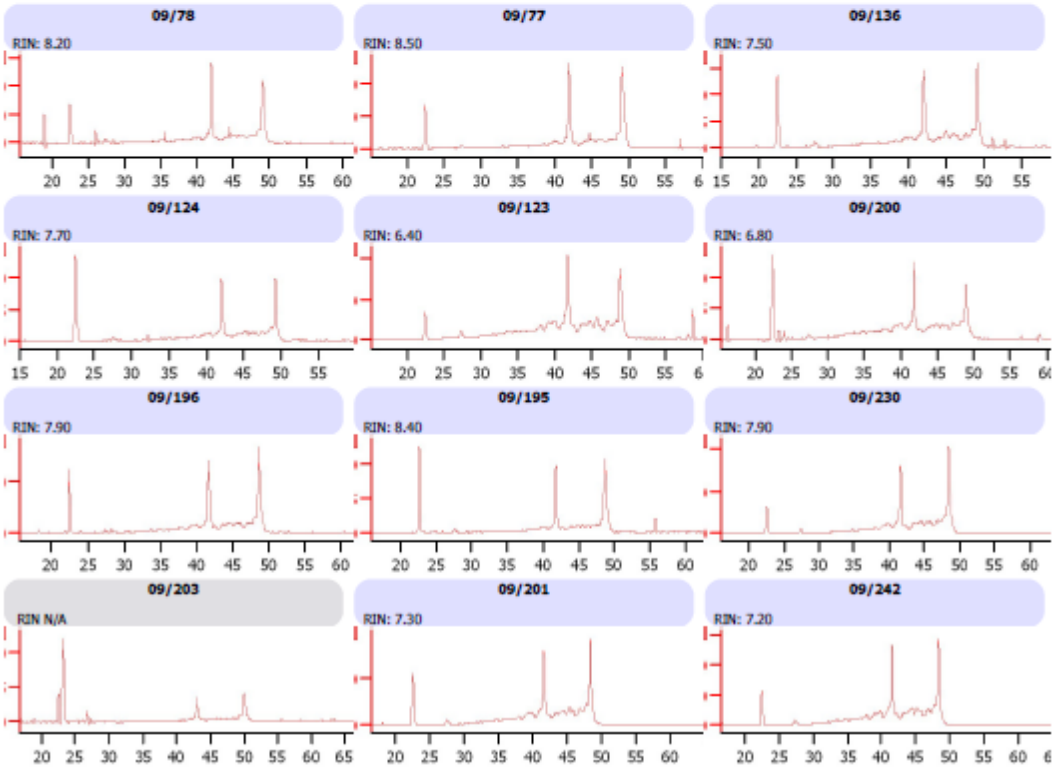
Instrument Name: DE24802481
Serial#: DE24802481
Firmware: C.01.055
Type: G2938B

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Title: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot:
Reagent Kit Lot:
Chip Comments:



© Copyright 2003-2006 Agilent Technologies, Inc.

Ek-3: Her bir gruptaki örnekler için elde edilen % NP değerleri.

Kanser grubundaki örneklerin % NP değerleri.

	ÖRNEK KODU	% NP*
1	08-07	29.80%
2	08-08	33.80%
3	08-09	29.90%
4	08-15	40.5 %
5	08-17	40.1 %
6	08-22	39.9 %
7	08-26	47.6 %
8	08-27	42.1 %
9	08-29	44.5 %
10	08-31	43.5 %
11	08-32	44.1 %
12	08-46	45.8 %
13	08-134	37.6 %
14	08-135	37.0 %
15	09-77	33.90%
16	09-78	35.5 %
17	09-79	35.5 %
18	09-80	38.20%
19	09-122	37.8 %
20	09-123	35.40%
21	09-125	29.2 %
22	09-134	40.1 %
23	09-136	35.2 %
24	09-195	38.8 %
25	09-196	37.8 %
26	09-200	34.9 %
27	09-201	35.7 %
28	09-203	35.3 %
29	09-230	39.2 %
30	09-242	38.5 %
31	09-287	41.4 %
32	09-124	36.1 %

***NP Number of presence: %Call Rate oranları**

Kanser + Tromboz grubundaki örneklerin % NP değerleri.

	ÖRNEK KODU	% NP*
1	08-13	22.20%
2	08-20	39.50%
3	08-21	35.90%
4	08-24	41.9 %
5	08-33	39.7 %
6	08-48	31.8 %
7	08-49	31.80%
8	08-50	28.9 %
9	08-52	34.6 %
10	08-126	24.5 %
11	08-127	33.2 %
12	08-128	30.5 %
13	08-129	33.8 %
14	08-130	34.1 %
15	09-82	33.70%
16	09-83	30.10%
17	09-84	27.60%
18	09-85	35.40%
19	09-86	30.00%
20	09-87	27.90%
21	09-88	21.3 %
22	09-90	35.30%
23	09-91	34.0 %
24	09-126	34.8 %
25	09-189	31.3 %
26	09-202	28.4 %
27	09-231	36.6 %
28	09-238	34.8 %
29	09-239	22.9 %
30	09-286	31.6 %

***NP Number of presence: %Call Rate oranları**

Tromboz grubundaki örneklerin % NP değerleri.

	ÖRNEK KODU	**% NP***
1	09-17	31.10%
2	09-61	32.60%
3	09-89	31.80%
4	09-102	35.0 %
5	09-110	37.7 %
6	09-169	40.8 %
7	09-172	40.70%
8	09-175	35.6 %
9	09-182	35.8 %
10	09-186	33.5 %
11	09-233	32.1 %
12	09-234	30.6 %
13	09-237	34.8 %
14	09-277	33.0 %
15	09-278	32.80%
16	09-285	31.80%
17	09-294	36.30%
18	09-295	27.90%
19	09-298	28.80%
20	09-299	37.90%
21	10-01	35.50%
22	10-16	38.4 %
23	10-17	28.2 %
24	10-18	38.6 %
25	10-19	34.6 %
26	10-23	37.4 %
27	10-24	37.0 %
28	10-26	32.4 %
29	10-27	35.2 %
30	10-28	35.50%
31	10-29	33.60%
32	09-303	36.70%

***NP Number of presence: %Call Rate oranları**

Kontrol grubundaki örneklerin % NP değerleri.

	ÖRNEK KODU	% NP*
1	08-143	35.90%
2	08-146	38.80%
3	08-149	33.70%
4	08-151	31.6 %
5	08-152	36.4 %
6	08-156	35.6 %
7	08-157	37.70%
8	09-01	35.7 %
9	09-02	36.8 %
10	09-03	36.0 %
11	09-05	38.2 %
12	09-06	38.0 %
13	09-13	32.6 %
14	09-22	36.7 %
15	09-23	37.50%
16	09-25	44.80%
17	09-27	35.90%
18	09-40	34.60%
19	09-44	31.00%
20	09-46	36.70%
21	09-51	34.70%
22	09-53	33.5 %
23	09-58	38.4 %
24	09-62	33.3 %
25	09-71	37.0 %
26	09-97	36.1 %
27	09-103	39.9 %
28	09-118	34.2 %
29	09-178	34.2 %
30	09-187	33.60%

***NP Number of presence: %Call Rate oranları**

Ek.4. Seçilen aday genlerin listesi.

Gen ID	*Gen Sembol*	*Kat değişimi*
210461_s_at	*ABLIM1*	*-2.09*
1558015_s_at, 200727_s_at	*ACTR2*	*-2.31*
214895_s_at	*ADAM10*	*-1.82*
208325_s_at	*AKAP13*	*-2.64*
238439_at	*ANKRD22*	*2.25*
216933_x_at	*APC*	*1.56*
211672_s_at	*ARPC4*	*1.59*
1555797_a_at	*ARPC5*	*1.87*
208859_s_at	*ATRX*	*-2.33*
219528_s_at	*BCL11B*	*-1.64*
201101_s_at, 201083_s_at	*BCLAF1*	*-2.79*
202095_s_at	*BIRC5*	*1.85*
205557_at	*BPI*	*2.58*
205950_s_at	*CA1*	*3.71*
214316_x_at	*CALR*	*2.14*
211140_s_at	*CASPS2*	*1.68*
207686_s_at	*CASPS8*	*-1.6*
207686_s_at	*CASPS8*	*1.48*
229010_at	*CBL*	*-2.29*
200951_s_at	*CCND2*	*-1.92*
203547_at	*CD4*	*-1.93*
217878_s_at	*CDC27*	*2,06*
211192_s_at	*CD84*	*1,79*
1556931_at	*CDC42*	*-2.06*
210564_x_at	*CFLAR*	*1.5*
206676_at	*CEACAM8*	*2,25*

(devam)

Gen ID	*Gen Sembol*	*Kat değişimi*
207802_at	*CRISP3*	*2.25*
202226_s_at	*CRK*	*-1.62*
211919_s_at	*CXCR4*	*-2.17*
209201_x_at	*CXCR4*	*-1.96*
230180_at	*DDX17*	*-2.28*
213998_s_at	*DDX17*	*-2.9*
205000_at	*DDX3Y*	*-2.86*
220668_s_at	*DNMT3B*	*-2.28*
239027_at	*DOCK8*	*-2.24*
217234_s_at	*EZR*	*-2.92*
216252_x_at	*FAS*	*-1.72*
232364_at	*FBXO11*	*-2.12*
204006_s_at	*FCQR3A*	*1.97*
203115_at	*FECH*	*2.18*
211485_s_at	*FGF18*	*1.67*
1560859_at	*FGFR2*	*-2.39*
210607_at	*FLT3*	*-1.57*
209189_at	*FOS*	*-1.71*
210655_s_at	*FOXO3*	*1.64*
208057_s_at	*GLI2*	*-1.91*
242975_s_at	*GNAS*	*-2.32*
207166_at	*GNGT1*	*2.11*
206655_s_at	*GP1BB*	*2.02*
207001_x_at	*GRAMD4*	*-2.78*
210312_at	*GZMH*	*1,95*
211968_s_at	*HSP90AA2*	*-2.17*
211968_s_at	*HSP90AA2*	*-2.66*

(devam)

Gen ID	*Gen Sembol*	*Kat değişimi*
1557910_at	*HSP90AB1*	*-2.22*
1557910_at	*HSP90AB1*	*-2.98*
1557910_at	*HSP90AB1*	*1.98*
200598_s_at	*HSP90B1*	*-2.13*
216449_x_at, 200598_s_at	*HSP90B1*	*-2.04*
200806_s_at	*HSPD1*	*-3.28*
208744_x_at	*HSPH1*	*-2.22*
241955_at	*HUWE1*	*-2.2*
208965_s_at	*IFI16*	*-1.87*
211027_s_at	*IKBKB*	*2.17*
226218_at	*IL7R*	*-1.71*
213446_s_at	*IQGAP1*	*-2.17*
1568830_at	*IRAK3*	*2.27*
221425_s_at, 209273_s_at	*ISCA1*	*2.61-2.86*
206494_s_at, 216956_s_at, 206493_at	*ITGA2B*	*2.95-2.52*
1552610_a_at	*JAK1*	*-1.87*
1552610_a_at	*JAK1*	*-2.2*
1562031_at	*JAK2*	*1.63*
243828_at	*KATNAL1*	*2.55*
228269_x_at	*KCNIP3*	*2.07*
228429_x_at	*KIF9*	*-2.39*
210504_at	*KLF1*	*2.04*
214352_s_at	*KRAS*	*-2.61*
214352_s_at	*KRAS*	*-2.05*
210948_s_at	*LEF1*	*-1.87*
204854_at	*LEPREL2*	*2.25*

(devam)

Gen ID	*Gen Sembol*	*Kat değişimi*
202018_s_at	*LTF*	*2.1*
210943_s_at	*LYST*	*-2.72*
211499_s_at	*MAPK11*	*2.31*
1558111_at	*MBNL1*	*-2.07*
1558111_at, 235811_at, 201151_s_at	*MBNL1*	*-3.89*
225408_at	*MBP*	*-1.68*
231827_at	*MCM8*	*2.64*
212079_s_at	*MLL*	*-1.79*
212076_at	*MLL*	*-2.11*
231688_at	*MMP8*	*3.76*
225518_x_at	*MTHFD1L*	*2.06*
201058_s_at	*MYL9*	*2.31*
211104_s_at	*MYO7A*	*2.49*
208605_s_at	*NTRK1*	*1.84*
206302_s_at, 206303_s_at	*NUDT4*	*2.42*
202221_s_at	*P300*	*-1.58*
1562044_at	*P4HA3*	*-2.15*
201746_at	*P53*	*-1.62*
212720_at	*PAPOLA*	*-2.17*
214401_at	*PAX1*	*2.16*
232144_at	*PBX1*	*1.58*
208983_s_at	*PECAM1*	*1.54*
233985_x_at	*PPP1R9A*	*-3*
202742_s_at	*PRKACB*	*-1.95*
207782_s_at	*PSEN1*	*-1.69*
242240_at	*PTK2*	*1.6*
200637_s_at	*PTPRF*	*2.1*

(devam)

Gen ID	*Gen Sembol*	*Kat değişimi*
1552274_at	*PXK*	*-2.14*
207419_s_at	*RAC2*	*-1.73*
1554834_a_at	*RASSF5*	*-1.99*
212027_at	*RBM25*	*-2.01*
1555814_a_at	*RHOA*	*-2.71*
1555814_a_at	*RHOA*	*1.59*
1555814_a_at	*RHOA*	*-2.04*
213194_at	*ROBO1*	*-1.77*
213194_at	*ROBO1*	*-2.09*
216625_at	*ROCK1*	*2.29*
225151_at	*RTKN*	*2.03*
243031_at	*RTN4*	*-2.3*
208129_x_at	*RUNX1*	*2.03*
215114_at	*SENP3*	*2.1*
237875_at	*STK10*	*2.11*
209339_at	*seven in absentia homolog 2 (Drosophila)*	*2.25*
210172_at	*SF1*	*-2.48*
214305_s_at	*SF3B1*	*-1.96*
1569073_x_at	*SMARCA4*	*1.56*
209257_s_at, 209258_s_at	*SMC3*	*-1.84*
209257_s_at	*SMC3*	*-2.58*
241620_at, 1558747_at	*SMCHD1*	*-2.47*
241620_at, 1558747_at	*SMCHD1*	*-2.46*
1558747_at	*SMCHD1*	*3.86*
215078_at	*SOD2*	*2.09*
214925_s_at	*SPTAN1*	*-3.19*

(devam)

Gen ID	*Gen Sembol*	*Kat değişimi*
213742_at	*SRSF11*	*-2.14*
239512_at	*SRSF4*	*-2.25*
244679_at	*STK38*	*-2.23*
211085_s_at	*STK4*	*-1.7*
221428_s_at	*TBL1XR1*	*-2.12*
1569385_s_at	*TET2*	*-2.3*
242163_at	*THRAP3*	*-2.03*
208900_s_at	*TOP1*	*-2.92*
208900_s_at	*TOP1*	*-2.74*
208900_s_at	*TOP1*	*2.6*
1555659_a_at	*TREML1*	*2.19*
204732_s_at	*TRIM23*	*-2.15*
233303_at	*UBE2D3*	*-2.08*
217826_s_at	*UBE2J1*	*-2.14*
217826_s_at	*UBE2J1*	*2.02*
218521_s_at	*UBE2W*	*-2.1*
235376_at	*USP4*	*-2.07*
223701_s_at	*USP47*	*-2.75*
211993_at	*WNK1*	*-2.33*
227309_at	*YOD1*	*2.1*
200641_s_at	*YWHAZ*	*-2.41*

Ek.5. qRT-PCR için tasarlanan primerler.

PRIMER ADI	PRIMER DİZİSİ	TM	AMP. BOYU	PRIMER UZUNLUĞU
CASPASE 8 F	**5' TGCTCTTCCGAATTAATAGACTGG 3'**	Tm: 60.73°C	154 bases (219 - 373)	Length: 24 bases
CASPASE 8 R	**5' TTCTGATCTGCTCACTTCTTCTG 3'**	Tm: 60.57°C	154 bases (219 - 373)	Length: 23 bases
CXCR4 F	**5' GAAATCATCAAGCAAGGGTG 3'**	Tm: 57.51°C	178 bases (37 - 215)	Length: 20 bases
CXCR4 R	**5' GAAGACTCAGACTCAGTGGA 3'**	Tm: 58.56°C	178 bases (37 - 215)	Length: 20 bases
DDX17 F	**5' GTACCGCCTATACCTTCTTCACC 3'**	Tm: 62.63°C	155 bases (99 - 254)	Length: 23 bases
DDX17 R	**5' GAGAACGACCACCCTTACCC 3'**	Tm: 62.39°C	155 bases (99 - 254)	Length: 20 bases
HSPD1 F	**5' TACTGGCTCCTCATCTCACTC 3'**	Tm: 60.91°C	148 bases (51 - 199)	Length: 21 bases
HSPD1 R	**5' CTGCTCAATAATCACTGTTCTTCC 3'**	Tm: 60.18°C	148 bases (51 - 199)	Length: 24 bases
HSP90AA1 F	**5' CCACCACTCTACTCTGTCTCTG 3'**	Tm: 61.71°C	169 bases (68 - 237)	Length: 22 bases
HSP90AA1 R	**5' GTCTTGGGTCTGGGTTTCCTC 3'**	Tm: 62.85°C	169 bases (68 - 237)	Length: 21 bases
HSP90AB1 F	**5' AGATAAGAAGGTTGAGAAGGTGAC 3'**	Tm: 60.30°C	179 bases (250 - 429)	Length: 24 bases
HSP90AB1 R	**5' TCAGGGTTGATCTCCAGGTG 3'**	Tm: 61.41°C	179 bases (250 - 429)	Length: 20 bases
HSP90B1 F	**5' AAACACAACAACGATACCCAG 3'**	Tm: 59.26°C	144 bases (228 - 372)	Length: 21 bases
HSP90B1 R	**5' CCAATTCAAGGTAATCAGATGC 3'**	Tm: 57.91°C	144 bases (228 - 372)	Length: 22 bases
HSPH1 F	**5' GATGCTCAACAAACCTCACAG 3'**	Tm: 59.95°C	187 bases (54 - 241)	Length: 21 bases
HSPH1 R	**5' TCTTTCCCTAACTGCCAGAC 3'**	Tm: 59.50°C	187 bases (54 - 241)	Length: 20 bases
KRAS F	**5' ACACAGCAGGTCAAGAGGAG 3'**	Tm: 61.97°C	164 bases (58 - 222)	Length: 20 bases
KRAS R	**5' CCATAGGTACATCTTCAGAGTCC 3'**	Tm: 59.94°C	164 bases (58 - 222)	Length: 23 bases
RHOA F	**5' AAGTCAAGCATTTCTGTCCC 3'**	Tm: 58.56°C	148 bases (27 - 175)	Length: 20 bases
RHOA R	**5' AATCCTGTTTGCCATATCTCTG 3'**	Tm: 58.67°C	148 bases (27 - 175)	Length: 22 bases
ROBO1 F	**5' AAGGAGTCTATGTCTGTGTAGC 3'**	Tm: 59.48°C	98 bases (252 - 350)	Length: 22 bases
ROBO1 R	**5' TTTGTCTGAAGTCATCCCGA 3'**	Tm: 59.14°C	98 bases (252 - 350)	Length: 20 bases
SMCHD1 F	**5' GCATCAAATTTATTCCAGGTCC 3'**	Tm: 58.17°C	177 bases (28 - 205)	Length: 22 bases
SMCHD1 R	**5' GGGTTCTGTAAATCTCTTCCA 3'**	Tm: 57.49°C	177 bases (28 - 205)	Length: 21 bases
STK4 F	**5' CCCTTATGCTGATATCCATCCA 3'**	Tm: 59.67°C	95 bases (140 - 235)	Length: 22 bases
STK4 R	**5' AAGTTATCTGACCATAGCTCTG 3'**	Tm: 57.55°C	95 bases (140 - 235)	Length: 22 bases
STK38 F	**5' TGTTCAGAAGAAAGATACGGG 3'**	Tm: 57.88°C	118 bases (8 - 126)	Length: 21 bases
STK38 R	**5' CTGCCTCCACTAGAATGTCAC 3'**	Tm: 60.63°C	118 bases (8 - 126)	Length: 21 bases
UBE2D3 F	**5' CTGCTATGTGATCCAAACCC 3'**	Tm: 58.79°C	107 bases (20 - 127)	Length: 20 bases
UBE2D3 R	**5' CTTCTGAGTCCATTCCCGAG 3'**	Tm: 60.02°C	107 bases (20 - 127)	Length: 20 bases
UBE2J1 F	**5' GATGGAGGAGTTTATCACGGG 3'**	Tm: 60.42°C	99 bases (54 - 153)	Length: 21 bases
UBE2J1 R	**5' CCACTTCAAATCGACCATTAGC 3'**	Tm: 60.14°C	99 bases (54 - 153)	Length: 22 bases
UBE2W F	**5' TGCGAACATGTAACAAGAATCC 3'**	Tm: 59.75°C	161 bases (28 - 189)	Length: 22 bases
UBE2W R	**5' GGTCACTTCCAGTCAAAGGT 3'**	Tm: 60.01°C	161 bases (28 - 189)	Length: 20 bases
USP4 F	**5' CTACCAGCAACAAGATTCTCAG 3'**	Tm: 59.23°C	174 bases (35 - 209)	Length: 22 bases
USP4 R	**5' CACAGAATCATTCCTCAACCTG 3'**	Tm: 59.48°C	174 bases (35 - 209)	Length: 22 bases
USP47 F	**5' CAGATGAGCAACGATTTCTCC 3'**	Tm: 59.54°C	168 bases (66 - 234)	Length: 21 bases
USP47 R	**5' AATAATGACCACCAGCAGCG 3'**	Tm: 61.23°C	168 bases (66 - 234)	Length: 20 bases
JAK1 F	**5' CCTCTTTGCCCTGTATGACGA 3'**	Tm: 62.35°C	161 bases (22 - 183)	Length: 21 bases
JAK1 R	**5' GAATGACGCCACACTGACTG 3'**	Tm: 61.77°C	161 bases (22 - 183)	Length: 20 bases
DECR1 F	**5' ACAACTCTTCTGTCCAGCCT 3'**	Tm: 61.26°C	126 bases (156 - 282)	Length: 20 bases
DECR1 R	**5' CATCACACTGAATTGCATGAACCT 3'**	Tm: 62.41°C	126 bases (156 - 282)	Length: 24 bases
TRAP1 F	**5' CAGACCAATGCCGAGAAAGG 3'**	Tm: 61.51°C	183 bases (105 - 288)	Length: 20 bases
TRAP1 R	**5' AGTAGAAACCCACTCCAAACTG 3'**	Tm: 60.40°C	183 bases (105 - 288)	Length: 22 bases
PPIB F	**5' AAACAGCAAATTCCATCGTG 3'**	Tm: 57.74°C	93 bases (17 - 110)	Length: 20 bases
PPIB R	**5' ACCGTAGATGCTCTTTCCTC 3'**	Tm: 59.36°C	93 bases (17 - 110)	Length: 20 bases

Ek.6. qRT-PCR için tasarlanan primerler.

Primer Adı	Primer Sekansı	Amplicon Size	Tm
CD84F	Forward: 5' TACAATCTGGTCATTAGCGA 3'	164 bp	56
CD84R	Reverse: 5' GTTCACAGATGCCATTAAACTC 3'		58
CDC27F	Forward: 5' ACTAAACCACTATGCTTACCGA 3'	123 bp	59
CDC27R	Reverse: 5' TTTATATGCCTTTCCTGAGCG 3'		58
CEACAM8F	Forward: 5' CCCAACATCACTACAAAGAACAG 3'	116 bp	60
CEACAM8R	Reverse: 5' TCCTTGTACTAAAGCATCAGAGAC 3'		60
FOXO3F	Forward: 5' TAACTTTGATTCCCTCATCTCC 3'	168 bp	57
FOXO3R	Reverse: 5' TTCTCTGTAGGTCTTGTGTC 3'		57
GZMHF	Forward: 5' ATCCAAAGAAGACACAGACC 3'	127 bp	57
GZMHR	Reverse: 5' GACCTTGATGTAGACTCCTG 3'		57
IKBKBF	Forward: 5' CACCATCCACACCTACCCTG 3'	177 bp	62
IKBKBR	Reverse: 5' GCCCTCATTTAACTTGCCGTC 3'		62
IRAK3F	Forward: 5' CTAGATAAGAAAGTGCCTCC 3'	183 bp	55
IRAK3R	Reverse: 5' TGAAGGACTTTAGTGATGTG 3'		55
MDM4F	Forward: 5' TGAGAAGCAACTATACACCT 3'	131 bp	56
MDM4R	Reverse: 5' CTAACTGCTCTGATACTGAC 3'		55
MMP8F	Forward: 5' CTTCCATTTCTGCTCTTACTC 3'	145 bp	56
MMP8R	Reverse: 5' CCATTCTTCCTTGTAGACTG 3'		55
SOD2F	Forward: 5' GGGACACTTACAAATTGCTG 3'	166 bp	57
SOD2R	Reverse: 5' TCTCCCAGTTGATTACATTCCA 3'		59
GP1BBF	Forward: 5' TGCCGTCTTCTCGCCATG	185 bp	62
GP1BBR	Reverse: 5' GTGTCGACAGGGAAGGCG		63

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Semih DALKILIÇ
Doğum Yeri: HATAY
Doğum Tarihi: 27.11.1980
Medeni Hali: Evli
Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise:	**(1994-1997)** İskenderun Barbaros Lisesi
Lisans:	**(1999-2003)** Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans :	**(2003-2006)** Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD

İş Tecrübesi

Kurumu: Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Görevi: Acil Laboratuvar Elemanı **Yılları:** 2006-2007

Yayınlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

1- **Partial trisomy due to a de novo duplication 22q11.1-22q13.1: a cat-eye syndrome variant with brain anomalies.**
Karcaaltincaba D, Ceylaner S, Ceylaner G, **Dalkilic S**, Karli-Oguz K, Kandemir O.
Genet Couns. 2010;21(1):19-24.

2- **Potential neoplastic effects of parathion-methyl on rat liver.**
Coral MN, Ucman S, Yildiz H, Oztas H, **Dalkilic S.**
J Environ Sci (China). 2009;21(5):696-9.

3- **Methyl Parathion-Induced Changes in Free and Protein-Bound SH Levels in Rat Tissues.**
Yildiz D, **Dalkilic S**, Yildiz H, Oztas H.
Toxicol Mech Methods. 2006;16(7):347-52. doi: 10.1080/15376520600616800.

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1- ***Dalkılıç S***., Özkeserli Z., İlk Ö., Oğuzülgen K., Akar N., Özdağ H. High Resolution Transcriptomic Analysis of Trousseau Syndrome, *XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 29 – July 4,* ***2013****, Netherlands.* (Sözlü Sunum).

2- ***Dalkılıç S***., Yıldız H., Yıldız D., Öztaş H. Investigation of –SH levels in liver, brain and kidney tissues of rats exposed to parathione methyl. (Poster Presentation) *4th Asian Pasific International Congress of Anatomists, page: 137-138,* ***2005****.*

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler: