ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

SPORADİK KOLOREKTAL KANSER İLE İLİŞKİLENDİRİLMİŞ ADAY GENLERİN İNCELENMESİ

Özge CUMAOĞULLARI

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

Nisan

2017

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.

Özge CUMAOĞULLARI

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ danışmanlığında Özge CUMAOĞULLARI tarafından hazırlanan bu çalışma 19.04.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Nurten AKARSU İmza:

Üye: Prof. Dr Hilal ÖZDAĞ (Danışman) İmza:

Üye: Prof. Dr. Hatice MERGEN İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU İmza

Üye: Doç. Dr. Özlem İLK DAĞ İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Sporadik Kolorektal Kanser İle ilişkilendirilmiş Aday Genlerin İncelenmesi

Özge Cumaoğulları

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Hilal Özdağ

Kanser, sanayileşmenin artması ile dünya çapında önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Kolorektal kanser (KRK) Dünya ve Türkiye genelinde kanserler arasında 3. sırada bulunmaktadır. Sporadik kolorektal kanser, KRK vakalarının %75'ini oluşturmaktadır. Sporadik vakaların ortaya çıkışı her ne kadar kalıtım bağımsız bir süreç de olsa, bu vakaların genetik yapılarında onları KRK'e yatkın hale getiren ve muhtemelen birden çok sayıda genetik bileşen bulunmaktadır. Kompleks hastalıklara yatkınlığa neden olan genlerin ortaya çıkarılması genetik ilişkilendirme (asosiyasyon) çalışmaları ile mümkün olmaktadır. Bu çalışmalar geniş hasta-kontrol popülasyonlarda ve tüm genomun genomik belirteçlerle taranması yolu ile gerçekleştirilmekte ve genom boyu asosiyasyon çalışması (GWAS) adını almaktadır.

Bu tez çalışması ile bilebildiğimiz kadarı ile Türk popülasyonunda bugüne dek yürütülmüş ***ilk ve tek aile temelli GWAS***'ın, 1016 sporadik KRK ve 948 kolonoskopi muayenesi yapılmış sağlıklı kontrol bireyden oluşan geniş bir popülasyondaki validasyonu, kompetitiv allel spesifik amplifikasyon (KASP) ile gerçekleştirilmiştir. Bu çerçevede 250K TNP arrayler ile 51 trioda yapılan aile temelli GWAS sonucunda belirlenen 75 aday tekli nükleotit polimorfizmi (TNP) ile Avrupa popülasyonunda gerçekleştirilen GWAS'larda kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş 7 TNP geniş örneklem grubumuzda çalışılmıştır. Ayrıca kurucu etkisi olduğu düşünülen 3p22.3 lokalize olmuş (35565537-35941124_ GRCh37) 1 Mb'lık bölge 4 bireyde yeni nesil DNA dizi analizi ile araştırılmıştır.

75 TNP genotipleme verisi üzerinden hesaplanan Fiksasyon (Fst) indeksi rs688551, rs4792074 numaralı TNP'lerin bölgesel stratifikasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle bu iki TNP asosiyasyon analizlerinden çıkarılmıştır. Cochran-Armitage'in Ki kareli eğilim testi ile 75 TNP arasından $p<0.05$ 1p32.2, 1q43, 4p15.2, 5q11.2, 3q25.32 lokalize olan sırasıyla rs635833,

rs3007737, rs6826441, rs10067633, rs16829831 isimli 5 TNP'nin Türk toplumunda hastalık yatkınlığına neden olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca Avrupa toplumları ile ilişkilendirilmiş 7 TNP arasından 8q24'e lokalize olan rs6983267 değişim noktası hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Yeni nesil DNA dizi analizi yapılan kurucu etkisi belirlendiği düşünülen 1Mb'lık bölgede hastalık ile ilişkili değişime rastlanmamıştır.

Geniş hasta-kontrol grubumuzda asosiyasyon analizi sonrasında Türk toplumunda $p<0.05$ bulunmuş toplamda 6 TNP'nin işaret ettiği genler literatür eşliğinde kanser veya KRK ile ilişkilendirilmiştir. ***Sonuç olarak bu tez çalışması ile Türk toplumunda KRK'e yatkınlık genlerinin ortaya çıkarılması amacı ile yürütülmüş olan ilk GWAS'ın birinci aşamasında belirlenen 75 aday TNP'nin validasyonu yapılmıştır. Bunun sonucunda 5 TNP'nin popülasyonumuz için KRK ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Bu TNP'ler daha önce başka bir GWAS ile gösterilmemiştir. Toplumumuzun KRK'e olan yatkınlığının bütünüyle ortaya çıkarılması amacıyla Avrupa toplumlarında yürütülmüş olan GWAS'lardan seçilen 7 TNP'den ise yalnızca 1 tanesinin toplumumuzda KRK ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.*** Bu önemli veri her toplumda olduğu gibi popülasyonumuzda kanser ve diğer kompleks hastalıkların yatkınlık profillerinin geniş GWAS ve validasyon aşamaları ile belirlenmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

2017, 165 sayfa

Anahtar kelimeler: Sporadik Kolorektal Kanser, Genom boyu asosiyasyon çalışması, TNP, GWAS

ABSTRACT

PhD Thesis

Investigation of Candidate Sporadic Colorectal Cancer Related Genes

Özge Cumaoğulları

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Hilal Ozdag

Due to the increasing industrialization, cancer has become a major global health issue. Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer both in the world and in Turkey. Sporadic CRC constitutes 75% of all CRC cases. Although development of CRC in sporadic cases is independent of heredity, there are possibly multiple genetic components in their genetic make up that predispose them to CRC. Identification of the genes that create tendency towards complex diseases is possible with genetic association studies. These studies, namely the genome-wide association studies (GWAS), are conducted on large case-control populations by scanning the whole genome for presence of genomic markers.

To our knowledge, this dissertation study is ***the first and only family-based GWAS in Turkish population***, in which a large study sample comprised of 1016 cases with sporadic CRC and 948 healthy controls with normal colonoscopic findings were examined with kompetitive allele-specific PCR (KASP) amplification. In this regard, our large study sample was scanned for 75 candidate single nucleotide polymorphisms (SNPs) that were identified by family-based GWASs conducted on 51 trio using 250K SNP arrays and for 7 SNPs that were associated with CRC by GWASs conducted on European population. Additionally, a 1 Mb region localized to 3p22.3 (35565537-35941124_ GRCh37), which is though to have a founder effect, was analyzed in 4 individuals via next generation DNA sequencing.

Fixation (Fst) index calculated using 75 SNP genotyping data revealed that the SNPs rs688551 and rs4792074 displayed regional stratification. Therefore, these two SNPs were excluded from association analyses. Based on the results of Cochran-Armitage Chi-square test for trend, among the 75 SNPs examined in our study, 5 SNPs, namely rs635833, rs3007737, rs6826441, rs10067633 and rs16829831 that are localized to 1p32.2, 1q43, 4p15.2, 5q11.2 and 3q25.32,

respectively, were found to create predisposition towards disease in the Turkish population ($p<0.05$). Additionally, among the 7 SNPs that have been previously associated with CRC in the European population, one SNP namely rs6983267 localized to 8q24 was found to be associated with disease in the studied population. We did not show any disease-related variation in the putative founder effect with 1 Mb region by next-generation DNA sequencing investigation.

According to the results of association analysis in our large Turkish case-control group, genes indicated by totally 6 SNP's were found to be associated with cancer or CRC. ***In conclusion, this dissertation study aimed to validate the 75 candidate SNPs that were determined in the first stage of the first GWAS that was conducted with the purpose of identification of the genes that predispose to CRC in the Turkish population. As a result, 5 of these SNPs were found to be associated with CRC in our population. These SNPs have not been demonstrated by any previous GWAS. Among the 7 SNPs selected from GWASs conducted on European populations, only 1 was found to be associated with CRC in our population.*** Our results indicate that large-scale GWAS and validation studies are necessary to determine the tendency profiles towards cancer and other complex diseases in different populations.

2017, 165 pages

Keywords: Sporadic colorectal cancer, Genomewide Association Study, SNP, GWAS

Önsöz

Bu tez çalışması metnini yazarken hocamın da dediği gibi karşımızdakini hiç bilmiyormuş gibi düşünerek yazmaya çalıştım. Umut ediyorum ki bir cümle de olsa okuyucunun aklında bir fikir oluşturabilmişimdir.

Tezin başlangıcında her şeyden önce bir hatırlatma yapmak istedim. Bunu da Can Yücel benim için zaten yazmış. Sanat ve bilimle kalmamız umuduyla,

Yerin seni çektiği kadar ağırsın
Kanatların çırpındığı kadar hafif..
Kalbinin attığı kadar canlısın
Gözlerinin uzağı gördüğü kadar genç…
Sevdiklerin kadar iyisin
Nefret ettiklerin kadar kötü..
Ne renk olursa olsun kaşın gözün
Karşındakinin gördüğüdür rengin..
Yaşadıklarını kar sayma:
Yaşadığın kadar yakınsın sonuna;

Ne kadar yaşarsan yaşa,
Sevdiğin kadardır ömrün..
Gülebildiğin kadar mutlusun
Üzülme bil ki ağladığın kadar güleceksin
Sakın bitti sanma her şeyi,

Sevdiğin kadar sevileceksin.
Güneşin doğuşundadır doğanın sana verdiği değer
Ve karşındakine değer verdiğin kadar insansın
Bir gün yalan söyleyeceksen eğer
Bırak karşındaki sana güvendiği kadar inansın.
Ay ışığındadır sevgiliye duyulan hasret
Ve sevgiline hasret kaldığın kadar ona yakınsın
Unutma yağmurun yağdığı kadar ıslaksın
Güneşin seni ısıttığı kadar sıcak.
Kendini yalnız hissetiğin kadar yalnızsın
Ve güçlü hissettiğin kadar güçlü.
Kendini güzel hissettiğin kadar güzelsin..

İşte budur hayat!
İşte budur yaşamak bunu hatırladığın kadar yaşarsın
Bunu unuttuğunda aldığın her nefes kadar üşürsün
Ve karşındakini unuttuğun kadar çabuk unutulursun
Çiçek sulandığı kadar güzeldir
Kuşlar ötebildiği kadar sevimli
Bebek ağladığı kadar bebektir
Ve her şeyi öğrendiğin kadar bilirsin bunu da öğren,
Sevdiğin kadar sevilirsin…

TEŞEKKÜR

Bir tez savunmasına gelene kadar özellikle de bu doktora tezi ise çok meşakkatli bir yol izlenmesi gerektiğini duymuştum. Ancak 8 yıl sonunda değişen projeler, değişen tez konusu, toplamda 3 proje ve en sonunda hala gerçek olmayacak kadar gerçek "tez"imin metinini somutlaştırabildim. "Tez"in sözlük anlamı ileri sürülerek çeşitli kanıtlar eşliğinde savunulan düşüncedir. Ama bir doktora öğrencisi için tezi, emek, gözyaşı, kan, ter, sonuç ve başarıdır. Bana göre tez savunmama ulaşmak maddi ve manevi yükler ile baş ederek kendim ile savaşımı kazanmamı ve biyoloji bölümüne girdiğim ilk günden itibaren hedeflediğimi gerçekleştirmeyi simgeliyor. Sınırları "naçizane" genişletmeyi simgeliyor. Bu genişletmenin enstitü, üniversite, Ankara, Türkiye veya Dünya çapında etkiye sahip olmasına gerek yok. Ama bilinmesi gereken şu ki, bu tez çalışmasındaki her bir PCR, her bir izolasyon veya her bir cümle kan-ter ile yapıldı veya yazıldı.

Bu tez çalışmasının KASP analizlerini içeren 82 TNP'nin incelendiği büyük bir kısmı Tübitak 112S634 numaralı proje tarafından desteklenmiştir. Ayrıca geriye kalan kısımları Ankara Üniversitesi BAP birimi 14L0415003 ve 16H0415001 nolu projeler tarafından desteklenmiştir. Bu konuda öncelikle Tübitak ve Ankara Üniversitesi'ne teşekkür etmek isterim. Bugünlere ulaşmamda en büyük payı olan tez danışmanım Prof. Dr. Hilal Özdağ'a bilimsel ve manevi destekleri için teşekkür ederim. Biyoteknoloji enstitüsüne adımımı atmamı sağlayan bilimsel desteklerini esirgemeyen yüksek lisans danışmanım Prof. Dr. Nejat Akar'a, manevi desteğini her zaman hissettiğim Ece Akar'a teşekkürleri bir borç bilirim. Tez izleme komitemde yer alan Prof. Dr. Hatice Mergen, Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na teşekkür ederim.

Örneklerin toplanmasında katkısı bulunan başta Prof. Dr. M. Ayhan Kuzu'ya, projede yer alan merkezlerdeki tıp doktorlarına, Yeşim Doğan ve Selda Demir'e teşekkür ederim. İstatistiksel analizlerin yapılmasını sağlayan Doç. Dr. Özlem İlk Dağ, Dr Farid Rajablı'ya teşekkür ederim.

Deneylerin gerçekleşmesi ve analizlerin yapılması aşamasında hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, sorularımı her zaman yanıtlayan Lütfiye Mesci ve Atilla Göknur'a sabırları

için teşekkür ederim. Deneylerin yapılmasında beni asiste eden dönemsel olarak gelen, öğrenmeye açık stajyer öğrencilerime de teşekkür ederim.

Deneylerin planlanması ve uygulanmasında çok fazla yardımda bulunan, manevi desteğini her zaman hissettiğim Nilgün Tekin'e teşekkür ederim. Manevi desteklerini esirgemeyen Yasemin Öztemur, Gözde Yalçın, Alp Aydos, Senem Noyan, Pelin Aksoy, Aynur Karadağ, Funda Demirsoy'a teşekkür ederim. Daha adını sayamadığım ama her zaman kalbimde yer alacak öğrencisinden çalışanına tüm Genom Bilim ve Biyoteknoloji Enstitüsü ailesine teşekkürü borç bilirim. İlk laboratuvarım olan tüm üyeleri ile benim için örnek teşkil eden başta Duygu Duman, Yonca Eğin olmak üzere Çocuk Genetik ailesine bana öğrettikleri için çok teşekkür ederim.

Laboratuvar dışında bana sürekli destek olan Deniz Yertut, Çiğdem Özkan, Dilan Çelik'e teşekkürleri borç bilirim. Tüm öğrenim hayatımda bana her zaman destek olan, bana olan güvenlerini her zaman hissettiğim, beni madden, manen destekleyen "ne zaman bitecek" gibi sakınılacak soruları minimumda tutan ve bu tezi adamak istediğim onlarsız yapamayacağım canım ailem Öztürk Cumaoğulları, Hayriye Cumaoğulları, Hande Tuğcan, Mustafa Tuğcan ve canım eşim Tevfik Eker'e sabırları için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN ..... **İ**

ÖZET ..... **İİİ**

ABSTRACT ..... **V**

ÖNSÖZ ..... **Vİİ**

TEŞEKKÜR ..... **Vİİİ**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **XİX**

SİMGELER DİZİNİ ..... **XXİİ**

1. GİRİŞ **1**

2. KURAMSAL TEMELLER_KANSER VE KOLOREKTAL KANSER **4**

2.1. KOMPLEKS BİR HASTALIK OLARAK KANSER **4**

2.2. KÖKENLERİNE GÖRE KANSER ÇEŞİTLERİ **4**

2.2.1. EPİTEL KÖKENLİ KANSERLER (KARSİNOMA) 4

2.2.2. EPİTEL KÖKENLİ OLMAYAN KANSERLER 5

2.3. KOLOREKTAL KANSER **6**

2.3.1. VOGELSTEİN MODELİ 8

2.3.1.1. Erken Adenoma (ACF-Aberrant kriptik lokus) 8

2.3.1.2. İntermediyer Adenoma 9

2.3.1.3. Geç Adenoma 9

2.3.1.4. Kolorektal Karsinoma 9

2.4. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER SINIFLANDIRMASI **10**

2.4.1. KROMOZOM İNSTABİLİTE (CIN) 11

2.4.2. MİKROSATELLİT İNSTABİLİTESİ (MSI) 12

2.4.3. CPG ADACIK METİLASYON FENOTİPİ (CIMP) 12

2.4.4. MOLEKÜLER SINIFLANDIRMALARDA FARKLI YAKLAŞIMLAR 13

2.5. KOLOREKTAL KANSERİN KALITIMSAL VEYA SPORADİK FORMU 15

2.5.1. KALITIMSAL KOLOREKTAL KANSER 16

2.5.1.1. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) 17

2.5.1.2. Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC-Lynch Sendromu) 18

2.5.2. SPORADİK KOLOREKTAL KANSER 19

3. KURAMSAL TEMELLER_GENETİK İNCELEME YÖNTEMLERİ 23

3.1. TEKLİ NÜKLEOTİT POLİMORFİZMLERİ (TNP) 23

3.2. BAĞLANTI ANALİZİ 24

3.3. GENOM BOYU ASOSİYASYON ÇALIŞMALARI 26

3.3.1. GENOM BOYU ASOSİYASYON ÇALIŞMALARI VE KOLOREKTAL KANSER 27

3.3.2. POPÜLASYON STRATİFİKASYONU (POPÜLASYON KAYMASI) VE ASOSİYASYON ÇALIŞMALARI 32

3.3.2.1. Atasal Bilgi Veren (Ancestry Informative) Belirteçlerin (AIB) Belirlenmesi (Fiksasyon İndeksi -Fst) 33

3.4. YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİ 34

3.4.1. ILLUMİNA GENOM ANALİZ SİSTEMİ 35

3.4.2. HEDEFE YÖNELİK DNA DİZİ ANALİZİ 36

4. KURAMSAL TEMELLER_KURUCU ETKİSİ (FOUNDER EFFECT) BELİRLENDİĞİ DÜŞÜNÜLEN GEN BÖLGESİNİN İNCELENMESİ 37

4.1. KURUCU ETKİSİ (FOUNDER EFFECT) 37

4.2. EPİGENETİK VE MİRNA 38

4.3. MİKRORNALAR VE KANSER 39

4.4. MİR-128-2 (MİR-128-2-201, MİR-128B, HSA-MİR-128B) 40

4.5. ARPP-21 (CAMP-REGULATED PHOSPHOPROTEİN) 41

4.6. *ARPP-21* GENİ VE MİR-128-2 ETKİLEŞİMİ 43

4.7. PSEUDOGENLER VE KANSER 44

4.8. İNTRONİK MUTASYONLAR VE KURUCU ETKİSİ 45

5. GEREKÇE VE AMAÇ 46

6. MATERYAL VE YÖNTEM 49

6.1. MATERYAL 49

6.2. YÖNTEM 52

6.2.1. KANDAN DNA İZOLASYONU 52

6.2.1.1. Fenol Kloroform DNA İzolasyonu 52

6.2.1.2. Promega DNA İzolasyon Kiti ile İzolasyon 53

6.2.2. DNA NİCELİK VE NİTELİK TAYİNİ 55

6.2.2.1. Spektrofotometrik Analiz 55

6.2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi 55

6.2.3. REKABETÇİ ALLEL SPESİFİK PCR_KASP 56

6.2.3.1. Veri Analizi ... 58
6.2.3.2. KASP verisinin İstatistik Analizi ... 58
6.2.3.3. "Ancestry Informative Belirteçlerin" Belirlenmesi ... 59
6.2.3.4. GWAS Sonuçlarının Fonksiyonel Anlamlandırılması ve HaploReg v4.1 Aracı ... 60
6.2.4. YENİ NESİL DNA DİZİ ANALİZİ ... 61
6.2.4.1. Yeni Nesil DNA Dizi Verisi İstatistiksel Analiz ... 62
6.2.4.2. Yeni Nesil DNA Dizi Verisi Biyoinformatik Analiz ... 63
7. ARAŞTIRMA BULGULARI ... 64
7.1. KASP ARAŞTIRMA BULGULARI ... 64
7.1.1. HASTA-KONTROL GRUBUNUN OLUŞTURULMASI ... 64
7.1.2. DNA İZOLASYONU ... 65
7.1.2.1. Nanodrop Sonuçları ... 65
7.1.2.2. Elektroforez ... 67
7.1.3. KASP DENEYLERİ VE ANALİZİ ... 67
7.1.3.1. Genotipleme Deneyleri ... 67
7.1.3.2. Ham Veri Analizi ... 71
7.1.3.3. İstatistiksel Analiz ... 73
7.1.3.4. Asosiyasyon Değerlendirmeleri ... 73
7.1.3.5. Fiksasyon İndeksi (Fst) ... 78
7.1.3.6. HaploReg v4.1 Analizi Sonuçları ... 79
7.2. YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ ARAŞTIRMA BULGULARI ... 82

7.2.1. NANODROP SONUÇLARI 82

7.2.2. ELEKTROFOREZ 82

7.2.3. YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ 83

7.2.4. BİYOİNFORMATİK ANALİZ 84

7.2.5. YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ 84

8. TARTIŞMA VE SONUÇ 86

EK 1: 112S634 PROJE DAHİLİNDE ÖRNEK AKIŞINI SAĞLANDIĞI MERKEZLER 127

EK 2: 112S634-KASP ÇALIŞMA PLAKA DÜZENİ 129

EK 3: KASP DENEYLERİNDE KULLANILMIŞ TNP İSİMLENDİRME, RS NUMARASI VE ALLEL BİLGİLERİ 130

EK 4. GENOTİP ANALİZİ SONRASINDA ELDE EDİLEN VERİLERİN Kİ KARE TESTİ SONRASINDA İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI BÜYÜK VERİ İÇERDİĞİ İÇİN AYRICA VERİLMİŞTİR. 133

EK 5. AİLE TEMELLİ GWAS İLE BELİRLENEN 75 TNP İÇİNDEN ANLAMLI BULUNAN 5 TNP VE AVRUPA POPÜLASYONLARINDA İLİŞKİLENDİRİLMİŞ 7 TNP İÇİNDEN ANLAMLI BULUNAN 1 TNP HAPLOREG V4.1 ARACI SONUÇ VERİSİ 134

KAYNAKLAR 135

ÖZGEÇMİŞ 159

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tez kapsamına dahil edilmiş tüm projelerin genel görünümü 2

Şekil 2.1. Kolorektal kanserin heterojenitesi (17,18) 7

Şekil 2.2. Kolon anatomik yapısı (19) 7

Şekil 2.3. Adenomadan karsinomaya dönüşüm (27) 10

Şekil 2.4. KRK sınıflandırması sırasında TCGA sonuçları ile meta analiz sonuçları bir arada kıyaslanarak verilmiştir (50,51). 14

Şekil 2.5. KRK sınıflandırması Guinney ve arkadaşları sonuçları temel alınarak, Dienstmann ve arkadaşları çizimi modifiye edilmiştir (51). 15

Şekil 2.6. Kolorektal kanser gelişimi (2) 16

Şekil 2.7. Sporadik kolorektal kanserde sıklıkla mutasyon gözlenen genler (71) 21

Şekil 2.8 . Sporadik kolorektal kanser gelişimi ve alt tipleri (71) 22

Şekil 3.1. TNP allel frekansı ve etki düzeyleri karşılaştırılması (80) 25

Şekil 3.2. Düşük frekanslı alleller ve hastalığa yatkınlık genleri(93) 28

Şekil 3.3. Fst indeksi hesaplanacak 3 farklı popülasyon (107) 33

Şekil 3.4. Yeni Nesil DNA Dizi Analiz Sistemi genel şeması 35

Şekil 4.1. Kurucu Etkisi şekilsel anlatımı 37

Şekil 4.2. Epigenetik mekanizmalar 38

Şekil 4.3. miRNA biyogenezi (118) 39

Şekil 4.4. miR-128-2 promotor bölgesi (130) 40

Şekil 4.5. Gen içi miR-128-2'nın *ARPP-21* geni 19. ıntronunda yer alan promotor bölgesi (131) 41

Şekil 4.6. ARPP-21 promotor bölgesi (Swich Gear Genomics) ARPP-21 promotor bölgesi (Swich Gear Genomics)..... 42

Şekil 4.7. Kurucu etkisi belirlendiği düşünülen tüm bölgenin promotor analiz programında analizi (Genomatix software kullanılmıştır)..... 43

Şekil 4.8. Kanser hücresinde miRNA-128-2'nin yer aldığı gösterilmiş moleküler mekanizması..... 43

Şekil 5.1. Tez kapsamında yapılmış tüm çalışmaların genel görünümü 47

Şekil 6.1. Projeye dâhil edilen merkezlerin genel görünümü..... 49

Şekil 6.2. 107S348 numaralı proje sonucunda ileri araştırma gerektiren analizler..... 52

Şekil 6.3. A. KASP teknolojisi FRET kaseti şematik görüntüsü, B. KASP teknolojisi sonuç penceresi..... 56

Şekil 6.4.A. 384lük derin kuyulu stok örnek plakasından siyah-beyaz zebra çalışma plakasına örneklerin dağıtılması B. Örnek dağıtılmış çalışma plakalarına "repeater dispenser" pipet ile reaksiyon karışımının dağıtılması..... 57

Şekil 6.5. KASP deneylerinde plaka üzerini kapatmak için kullanılan K-seal Cihazı..... 57

Şekil 6.6. KASP deneylerinde kullanılan su banyosu temelli PCR Hydrocycler cihazı..... 57

Şekil 6.7. KASP deneylerinde PCR sonrası analizlerde kullanılan Omega cihazı..... 58

Şekil 6.8. HaploReg v4.1 analiz parametre ayarları..... 61

Şekil 6.9. Yeni Nesil DNA Dizi Analizi genel şeması..... 62

Şekil 6.10. Yeni nesil DNA dizi analizi istatistiksel analiz iş akış şeması..... 63

Şekil 7.1. Temsili %1'lik agaroz jel görüntüsü 67

Şekil 7.2. KlusterCaller analiz penceresi analiz edilecek örnek genel görünümü..... 72

Şekil 7.3. 384 örneklik bir plakanın normalizasyon ve gruplama analizi aşamaları 72

Şekil 7.4 rs17082506 isimli TNP için yapılan analiz sonunda örnek sonuçlarının yer aldığı csv.dosyası..... 73

Şekil 7.5. Promega ile gDNA izolasyon 1'lik agaroz jel görüntüsü 82

Şekil 7.6. Klasik Fenol-Kloroform yöntemi ile gDNA izolasyon 1'lik agaroz jel görüntüsü 83

Şekil 7.7. Yeni nesil DNA dizi analizi yapılan genomik bölgenin şematize görüntüsü (143) 83

Şekil 7.8. Yeni nesil DNA dizi analizi biyoinformatik analiz sonrası temsili 1 örneğin tablo görüntüsü 84

Şekil 7.9. Yeni nesil DNA dizi analizi yapılan bölge ayrıntılı görüntüsü 85

Şekil 7.10. Yeni nesil analizine göre ARPP21 rs6783546A>C değişim noktası 85

Şekil 8.1. rs6826441 A>G değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (150) 89

Şekil 8.2. rs6826441 A>G değişimini içeren dizi korunmuşluk analizi sonucu 90

Şekil 8.3. rs635833 A>G değişimi değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (150) 95

Şekil 8.4. rs3007737 A>G değişimi değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (150) 99

Şekil 8.5. Triptofan metabolizması genel görünümü, KMO ve bağışıklık sistemine etkisi (187,188) 99

Şekil 8.6. rs10067633 C>T değişimi değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (150) 105

Şekil 8.7. rs16829831 C>G değişimi değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (150) 111

Şekil 8.8. Alkan ve arkadaşlarının ilk kez Türk toplumunda yaptığı yeni nesil analiz PCA sonuçları (287) 117

Şekil 8.9. rs6983267 G>T değişimi değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (150) 119

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Epitel kökenli kanserler (10) 5

Çizelge 2.2. Bağ dokusu kanserleri ve hematopoetik kanserler (10) 5

Çizelge 2.3. Kalıtımsal kolorektal kanser sendomları (2)(88)..... 17

Çizelge 3.1. Bağlantı ve asosiyasyon analizi karşılaştırılması (80) 25

Çizelge 3.2. Kolorektal kanserde yapılan GWASlar ve tanımlanan tüm lokuslar 29

Çizelge 3.3 Yeni nesil dizi analizi cihaz ve teknikleri karşılaştırması (108) 34

Çizelge 6.1. 29.02.2016 tarihine kadar toplanan hasta ve kontrol sayısının ikamet yerine göre örnek dağılımı..... 50

Çizelge 6.2. 29.02.2016 tarihine kadar toplanan hasta ve kontrol sayısının kişi doğum yerine göre dağılımı..... 50

Çizelge 6.3. Çalışma Grubundan toplanan parametreler gösterilmektedir..... 50

Çizelge 6.4. Çalışmaya dâhil edilen bireylerin seçimi, gerekçeleri ve kullanılan yaklaşım 51

Çizelge 6.5. Kurucu etkisi belirlendiği düşünülen tüm örneklerin memleket bilgileri. 51

Çizelge 6.6. Göreceli Olasılıklar Oranı (OR) hesabı için oluşturulan 2x2'lik çizelge..... 58

Çizelge 7.1. Çalışmaya dâhil edilen örneklem bilgisi 64

Çizelge 7.2. Çalışmaya dâhil edilen Hasta-Kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılım ve ortalamaları..... 65

Çizelge 7.3. DNA Örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri (Temsilen seçilen 22 örnek gösterilmiştir.) 66

Çizelge 7.4. 15.06.16 tarihine kadar izole edilen örneklerin minimum/maksimum Nanodrop sonuçları 67

Çizelge 7.5. 82 TNP, 1967 hasta-kontrol için yapılan genotipleme deneylerinin görünümü 68

Çizelge 7.7. Avrupa GWAS çalışmaları ile KRK ilişkili bulunan çalışmaya ek olarak çalışılan TNP'ler 71

Çizelge 7.8. İkamet adresi temel alınarak, Türkiye coğrafik bölgelerine göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilen TNP'ler 75

Çizelge 7.9. Doğum yeri temel alınarak, Türkiye coğrafik bölgelerine göre istatistiksel ol arak anlamlı olduğu gösterilen TNP'ler 76

Çizelge 7.10 Türkiye geneline göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilen TNP'ler 77

Çizelge 7.11. Türkiye geneli Hasta-Kontrol Grubunda farklı gözlenen TNP'ler için Göreceli Olasılıklar Oranı (OR) ve Güven Aralığı (CI) değerleri 78

Çizelge 7.12. Bölgesel farklılık gösteren 2 TNP bilgileri 79

Çizelge 7.13. HaploReg v4.1 aracı gen-haplotip sonuçları 79

Çizelge 7.14. Çalışmaya dâhil edilen örneklerin kalitatif ve kantitatif analizi 82

Çizelge 7.15. Yeni nesil DNA dizi analizi yapılan 4 örnek kalite kontrol skorları 84

Çizelge 7.16. ARPP21 geni rs6783546A>C değişimi gösterilmiş hastalar yeni nesil DNA dizi analizi bilgisi 85

Çizelge 8.1. Tez çalışması sonunda Türkiye geneline göre sporadik KRK ilişkili Ki kare testi $p<0.05$ TNP'ler 88

Çizelge 8.2. rs6826441 A>G değişimi yakın çevresinde yer alan genler 89

Çizelge 8.3. rs635833 A>G değişimi yakın çevresinde yer alan genler 94

Çizelge 8.4. rs3007737 A>G değişimi yakın çevresinde yer alan genler 98

Çizelge 8.5. rs10067633 C>T değişimi yakın çevresinde yer alan genler 105

Çizelge 8.6. rs16829831 C>G değişimi yakın çevresinde yer alan genler 110

Çizelge 8.7. 75 TNP arasından geniş popülasyonda valide edilen genler ve ilişkili yolaklar 116

Çizelge 8.8.Avrupa toplumlarında KRK ile ilişkilendirilmiş bu tez çalışmasına dâhil edilmiş TNP'ler 118

Çizelge 8.9. rs6983267 G>T değişimi yakın çevresinde yer alan genler 118

Çizelge 8.10. Yeni nesil dizi analizi Kalite kontrol analiz değerleri 124

SİMGELER DİZİNİ

A°	Angstrom
ACF	Abberant kriptik lokus
AHR	Aril hidrokarbon reseptör
AIB	Atasal Bilgi verici belirteçler
AKT	v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
ARPP21	CAMP Regulated Phosphoprotein 21
ARPP21-AS	CAMP Regulated Phosphoprotein 21-Antisens
ATP	Adenozintrifosfat
ATR	Ataksi Telenjiyektazi
BAP	Bilimsel Araştırmalar Projeler birimi
BF	Büyüme faktörleri
BRAF	B-Raf proto-onkogen
CaM	Kalmodulin
Ca^{+2}	Kalsiyum
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CD8+	"Cluster of differentiation 8"
CI	Güven aralığı
CIMP	CpG adacık metilasyon fenotipi
CIMP-L	CpG adacık metilasyon fenotipi-düşük
CIMP-H	CpG adacık metilasyon fenotipi-yüksek
CIN	Kromozomal instabil
C3	Kompleman faktör 3
C5	Kompleman faktör 5
C8	Kompleman faktör 8

C9	Kopmleman faktör 9
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
ER	Endoplazmik retikulum
eQTL	"Expression quantitatif trait locus"
FAP	"Familial adenomatous polyposis"
FH	Fumarat hidrataz
Fret	Floresans resonant enerji transferi
Fst	Fiksasyon indeksi
g	yerçekimi kuvveti (xg)
GAC	Glutaminaz C
GATK	"The genome analysis toolkit"
GF	Büyüme Faktörü
GOF	İşlev kazanımı"gain of function"
gr	Gram
GRASP	"Genome-Wide Repository of Associations Between SNPs and Phenotypes"
GTEx	"Genotype-Tissue Expression Projesi"
GTP	Guanozin trifosfat
GTPaz	Guanozin trifosfataz
GWAS	Genom boyu asosiyasyon çalışması
HAPMAP	Uluslararası Haplotip Haritalama Projesi

HSPB3	Isı şok protein B ailesi 3
HIF	Hipoksi indüklenmiş faktörler
Hippo yolağı	Salvador/Warts/Hippo (SWH) yolağı
HNPCC	Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser
IDO	2,3-dioxygenaz enzimi
IL	İnterlökin
InsP3	İnositol 3 fosfat
IQCJ	IQ domaini içeren protein
KASP	Kompetitiv allel spesifik amplifikasyon
Kb	Kilobaz
Kg	Kilogram
KGA	Böbrek tipi glutaminaz C
KMO	Kynurenin 3-monooksigenaz
KRK	Kolorektal kanser
KRAS	"V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog"
Kyn	Kinürenin/Kynurenin
LD	Bağlantı eşitsizliği "linkage disequilibrium"
LE	Bağlantı eşitliği "linkage equilibrium"
LincRNA	Uzun genler arası kodlanmayan RNAlar
LncRNA	Uzun kodlanmayan RNAlar
LOF	İşlev kaybı "loss of function"
MAC	Majör hücum kompleksi
Mb	Milyon baz
MEK	MAP/ERK kinaz
MHC	Majör hücum kompleksi
MiRNA	mikroRNA

mRNA	Mesajcı RNA
ml	Mililitre
MSI	Mikrosatellit instabil
MSI-H	Mikrosatellit stabil-yüksek
MSI-L	Mikrosatellit stabil-düşük
MMR	Yanlış anlam tamir mekanizması
MSS	Mikrosatellit stabil
MLH	mutL homolog
Mtor	"Mammalian target of rapamycin"
µl	Mikrolitre
NAD+	Nikotinamid adenin dinükleotit
nm	Nanometre
NF	Nörofibromatozis
Ng	Nanogram
NHGRI	"National Human Genome Research Institute"
OPN3	Opsin 3
OR	Tahmini Rölatif Risk
ORAI	"Calcium release-activated calcium channel protein 1" CRACM1
PCA	Temel bileşen analizi "Principle companent analysis"
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PIK3CA	Fosfotidil inositol-3 kinaz
PI3K	Fosfotidil inositol-3 kinaz
PKB	Protein Kinaz-B
POU5F1B	POU sınıf 5 homebox 1B
PQ	Kalite skoru
PF	Ortalama kalite skoru

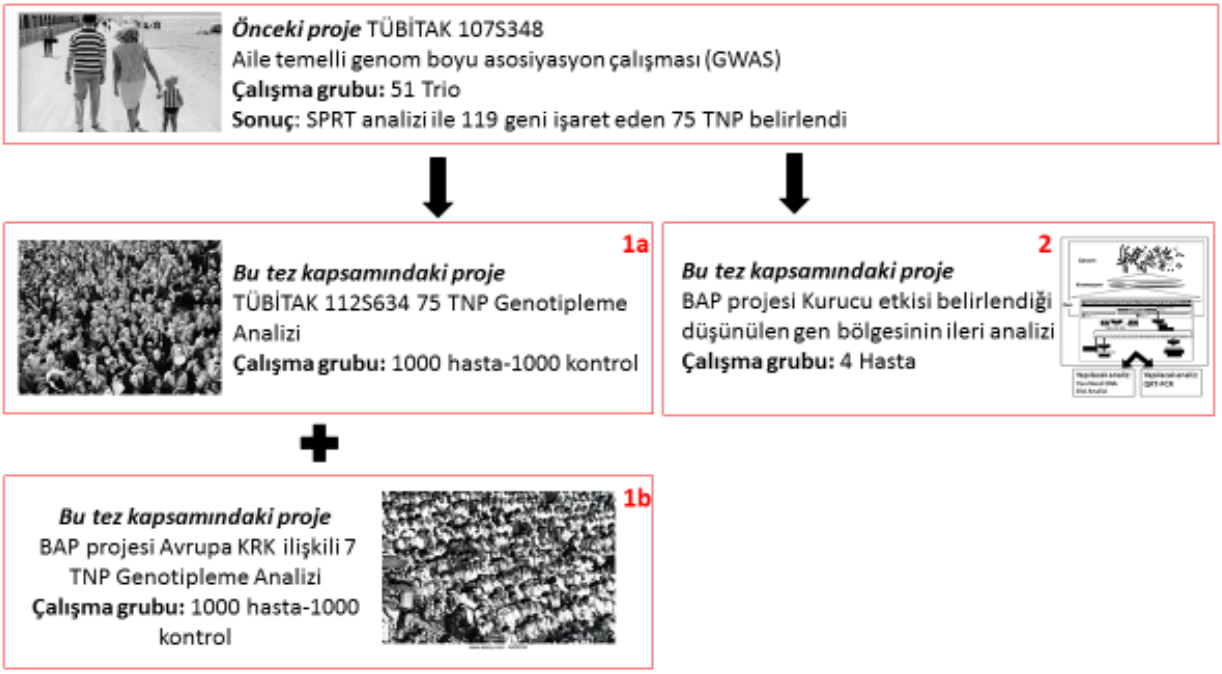
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	Relatif santrifüj hızı
Rcf	Relatif santrifüj kuvveti
RAS	K-Ras
RAF	V-Raf-1 Murine Leukemia Viral Oncogene-Like Protein
RB	Retinoblastoma
SCHIP 1	Şvannomin etkileşim proteini 1
Sn	Saniye
STIM	Stromal interaksiyon molekülü 2
SOC	"Store-operated channels"
SOCE	"Store-operated Ca+2 entry"
TCF4	Transkripsiyon faktör 4
TF	Transkripsiyon faktörü
TNP	Tekli nükleotit polimorfizm
TRPC1	"Transient" Reseptor Protein 1
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
TGF	Transforming büyüme faktrörü β
TDO	Triptofan 2,3-dioksigenaz
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEFGR	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
WHO	Dünya sağlık örgütü
WNT	Wnt/β-catenin yolağı
X2	Ki kare

1. GİRİŞ

Günümüzde kanser sık gözlenmesi ve mortalitesinin yüksek olması nedeni ile dünyanın önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, kolorektal kanser, akciğer, meme kanserinden sonra yeni gözlenen vaka sıklığında üçüncü sırada yer almaktadır (1). Türk toplumunda da KRK, kanserler arasında üçüncü sırada bulunmaktadır. Sporadik KRK vakaları ise, KRK vakaları içinde %75 gibi önemli bir kısmı kapsamaktadır (2).

Bu tez çalışmasında ilk kez çok geniş örneklem grubunda asosiyasyon çalışması validasyonu yapılmıştır. 1016 hasta, 948 kontrol Türk örneklem grubunda sporadik KRK yatkınlıkla ilişkili olduğu düşünülen 82 TNP incelenmiştir. Yapılan analizler sonunda coğrafik olarak stratifikasyon gözlenen 2 TNP çalışmadan dışlanarak hastalık ile ilişkili 6 TNP'nin yatkınlığa neden olduğu $p<0.05$ anlamlılık değeri ile bulunmuştur. Bu TNP'lerin yakın çevresinde bulunan genler literatür bilgisi ile kanser veya kolorektal kanser ile ilişkili olduğu tezin tartışma kısmında anlatılmıştır. Sonuç olarak Türk popülasyonununda hastalık ilişkili 6 TNP ilk kez belirlenmiştir. Ayrıca kurucu etkisi belirlendiği düşünülen gen bölgesi hedefe yönelik yeni nesil DNA dizi analizi ile incelenmiş ancak hastalık ile ilişkili bir değişime rastlanmamıştır.

Yöntemsel olarak iki aşamadan oluşan bu tez çalışmasının amacı temelde Türk toplumuna özgü sporadik kolorektal kansere yatkınlık genlerinin belirlenmesidir. Bu tez çalışması 3 farklı proje desteği ile gerçekleştirilmiştir (TÜBİTAK 112S634, BAP-14L0415003, BAP-16H0415001). Aşağıda tez kapsamı bir akış şeması ile açıklanmıştır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Tez kapsamına dahil edilmiş tüm projelerin genel görünümü

1. Bölüm

Popülasyona özgü genom boyu asosiyasyon çalışmaları (GWAS) insan genomundaki çeşitliliğin boyutları ortaya çıktıkça önem kazanmıştır (3). Bu nedenle ülkemiz için önemli bir sağlık sorunu olan kolorektal kansere yatkınlığa neden olan genlerin belirlenmesi bu sağlık sorununun deşifre edilmesi için önemli bir adımdır.

Araştırma ekibimiz sporadik kolorektal kanseri araştıran ve TÜBİTAK tarafından desteklenen bir dizi araştırma projesi başlatmıştır. 2011 yılında tamamlanan bu proje serisinin ilk aşamasında, aile temelli GWAS ile 51 trioda (sağlıklı anne, baba ile hasta çocuk üçlüsü) (TÜBİTAK 107S348) kolorektal kansere yatkınlığa neden olan 119 geni işaret eden 75 TNP belirlenmiştir.

Tez çalışmasının ilk kısmında aile temelli GWAS ile tespit etmiş olduğumuz 75 TNP'nin (119 gen) GWAS çalışmaları için elzem olan bağımsız geniş bir sporadik kolorektal kanser-kontrol doğrulanmasını hedeflemiştir. Bu değişimlere ek olarak literatürde GWAS sonuçlarında belirlenmiş 7 TNP de tez çalışmasına dahil edilmiştir. Toplamda 82 TNP çalışılmıştır. Çalışma sonunda Türkiye genelinde 45 merkezden tesadüfi örnekleme ile örneklem boyutunun %95'ine ulaşılmıştır.

Bu kapsamda TÜBİTAK 112S634 ve BAP-16H0415001 projeleri dahilinde 82 TNP kolonoskopi muayenesi yapılmış 1016 sporadik kolorektal kanser ve 948 sağlıklı kontrolde değerlendirilmiş ve 6 TNP hastalık ile ilişkili bulunmuştur. Bu değişimler tezin tartışma ve sonuç kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

2. Bölüm

2011 yılında tamamlanan TÜBİTAK 107S348 numaralı proje sonunda, elde edilen olası yatkınlık genleri listesi yanında beklenmedik bir sonuç daha elde edilmiştir. Buna göre, 6 hastada birbirlerinden bağımsız olarak genom üzerinde birlikte kalıtılan bir bölge belirlenmiştir.

Literatürde kurucu etkisi (Founder Effect) olarak isimlendirilen bu durum inceleme gerektirmektedir (4). "Kurucu etkisi" belirlendiği düşünülen gen bölgesinde yer alan 2 gen "ARPP21 ve miR-128-2 " Sanger DNA dizi analizi tekniği ile incelenmiş ancak herhangi bir değişim bulunamamıştır. Bu genlerin intronları ve 5', 3' regülatör bölgeleri incelenmemiştir. Bu nedenle kurucu etkisi olduğu düşünülen, kolorektal kanser ile ilişkilendirilecek olası değişimlerin belirlenmesi için bahsi geçen 1 Mb'lık bölgenin tamamının aydınlatılması için ileri analiz gerekmektedir.

Tezin bu kısmında, 3 geni (ARPP21, ARPP21-AS, miR-128-2) içeren 1 Mb'lık alanda 4 hastada yeni nesil DNA dizi analizi yapılması ve sonuçların validasyonu için sağlıklı ve kanserli dokuda ifade profilinin gösterilmesi hedeflenmişti. Ancak BAP-14L0415003 proje bütçesi dahilinde tez çalışmasına sadece hedefe yönelik yeni nesil DNA dizi analizi yapılmıştır. Sonuçta hastalık ile ilişkili herhangi bir değişime rastlanmamıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER_KANSER VE KOLOREKTAL KANSER

2.1. KOMPLEKS BİR HASTALIK OLARAK KANSER

Kanser çok basamaklı, multifaktöryel ve birden fazla genin kalıtımı ile gelişen hücre döngüsünün bozulması ile gözlenen bir hastalıktır. Kanser gelişiminin karmaşık bir süreç olduğu, diyet, yaşam tarzı gibi çevresel faktörler tarafından etkilendiği, kalıtılan mutasyonlar, somatik mutasyonlar ve epigenetik mekanizmalar ile ortaya çıktığı bilinmektedir (5,6)

Temel olarak normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesi proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen nokta mutasyonu veya yeniden düzenlenme sonucu gerçekleşmektedir (6). Normal hücrelerde proto-onkogenlerde "işlev kazanımı" (Gain of function, GOF), tümör baskılayıcı genlerde ise "işlev kaybı" (Loss of function, LOF) ile hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve daha birçok atipik özellik kazanması ile ilerleyen süreçte kanser hücresine dönüşüm ve bu hücrelerin birikimi ile neoplastik oluşumlar gözlenir (7-9).

2.2. KÖKENLERİNE GÖRE KANSER ÇEŞİTLERİ

Kanserler kökenlerine göre epitel kökenli olan ve olmayan şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Bu konu hakkında ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir.

2.2.1. EPİTEL KÖKENLİ KANSERLER (KARSİNOMA)

Epitel kökenli dokularda meydana gelen kanserler karsinoma olarak isimlendirilmektedir. Literatürde solid tümör olarak da isimlendirilmektedir. Aşağıdaki çizelgede karsinoma tipleri verilmiştir.

Çizelge 2.1. Epitel kökenli kanserler (10)

Karsinomalar		
Adenomanın sık gözlendiği doku tipi	**Yumuşak doku karsinomasının sık gözlendiği doku tipi**	**Diğer tip karsinomalar**
Akciğer	Deri	Küçük hücreli akciğer karsinoma
Kolon	Burun boşluğu	Büyük hücreli akciğer karsinoma
Meme	Orofarinks	Hepatoselüler karsinoma
Pankreas	Larinks	Renal hücre karsinoma
Mide	Akciğer	Geçişli hücre karsinoma (mesane)
Özofagus	Özofagus	
Prostat	Serviks	
Endometriyum		
Yumurtalık		

2.2.2. EPİTEL KÖKENLİ OLMAYAN KANSERLER

Epitel kökenli olamayan kanserler bağ dokusu kanserleri ve kan kanserleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Bağ dokusu kökenli kanserlere sarkoma, kan dokusu kanserlerine ise lenfoma, lösemi denilmektedir. Aşağıdaki çizelgede sarkoma ve lenfoma/lösemi tipleri verilmiştir.

Çizelge 2.2. Bağ dokusu kanserleri ve hematopoetik kanserler (10)

Sıklıkla Gözlenen Sarkomalar	
Tümör tipi	**Öncü Hücre**
Osteosarkoma	Osteoblast (kemik hücresi)
Liposarkoma	Adiposit (yağ hücresi)
Leiomyosarkoma	Düz kas hücresi (bağırsak gibi)
Rabdomyosarkoma	Çizgili kas hücresi
Maling Fibroz histiyositoma	Adiposit/kas hücresi
Fibrosarkoma	Fibroblast (bağ doku hücresi)
Anjiyosarkoma	Endotel hücre (kan damarı yüzeyi)
Kondrosarkoma	Kondrosit (kıkırdak oluşum hücresi)

Hematopoetik Malignansiler
Akut lenfoblastik lösemi (ALL)
Akut myelogenoz lösemi (AML)
Kronik myelogenoz lösemi (KML)
Kronik lenfositik lösemi (KLL)
Multiple myeloma (MM)
Non-Hodgkin’s lenfoma (NHL)
Hodgkin’s lenfoma (HL)

2.3. KOLOREKTAL KANSER

Kolorektal kanser, sanayileşmiş ülkelerde hem erkek hem de kadınlarda malignite nedenli ölümlerde en sık görülen kanserlerden biridir (11). Bu kanser tipinin yıllık insidansı yaklaşık olarak 100.000'de 50 yeni olgudur. Kolorektal kanserde ölüm oranı gelişmiş tedavi, etkili görüntüleme ve izlemeye bağlı olarak azalmasına rağmen prevelansı sabit bir biçimde giderek artmaktadır (12).

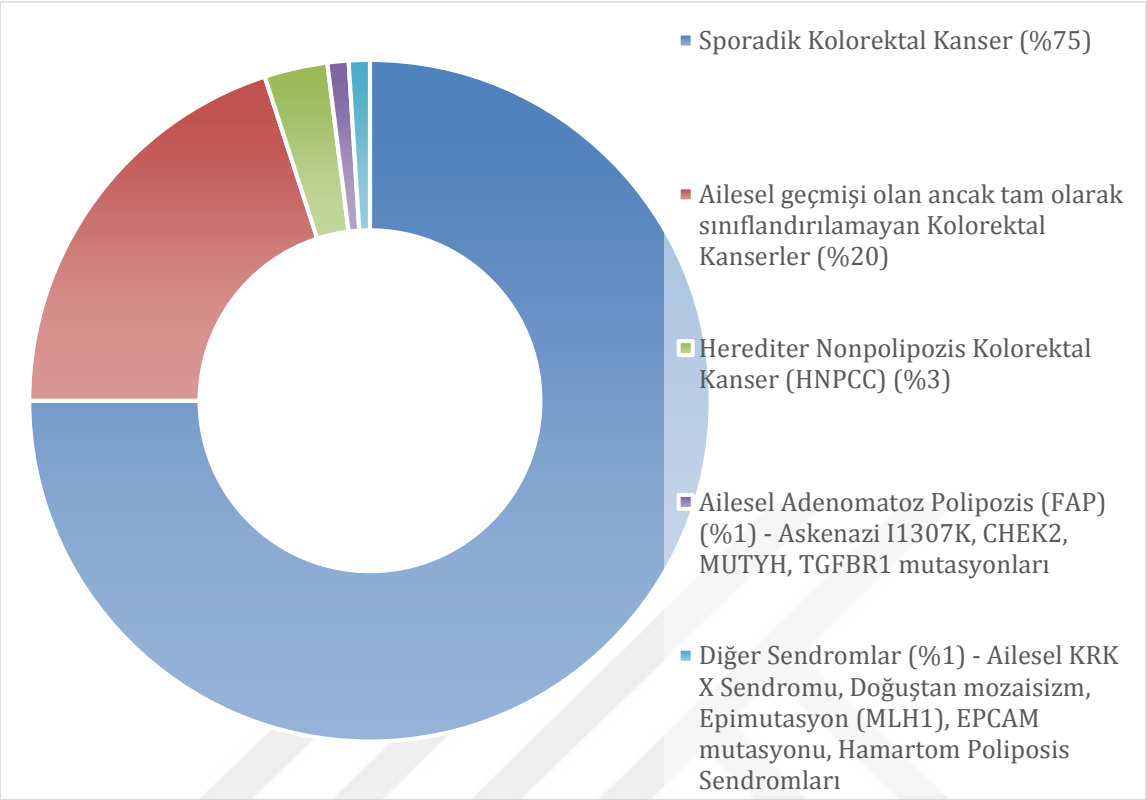
Son 30 yıldır, sporadik ve kalıtımsal kolorektal kanser patolojisinde etkili mutasyonlar araştırılmaktadır. Sınırlı sayıda onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin – en çok bilinenleri *APC, KRAS, p53*- birçok kolorektal kanserde mutant olduğu belirlenmiştir (2). Bunun yanında kromozomal anomalilerin (anöploidi) artması yolu ile oluşan kromozomal dengesizlik (chromosomal instability, CIN) ve DNA yanlış eşleşme (mismatch) tamirindeki bozuklukların neden olduğu mikrosatellit dengesizliği (MSI) önemli etkenler içindedir (13,14).

Kolorektal kanser tümörlerinin % 40'ında etkili olan diğer etken DNA metilasyonundaki değişimler nedeni ile işlev kaybı/kazancı, ilgili genlerin ifadelenmesinde etkileyecek kodlanmayan RNAlar -miRNA – ile karakterizedir (14,15).

Mendeliyen kalıtım gösteren kalıtımsal nonpolipoz kolorektal kanser (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HPNCC) ve ailesel adenomatöz poliposiz (APC) yanında sık gözlenen ve tam olarak açıklanmamış multifaktöriyel kalıtılan bir diğer kolorektal kanser türü sporadik kolorektal kanseridir.

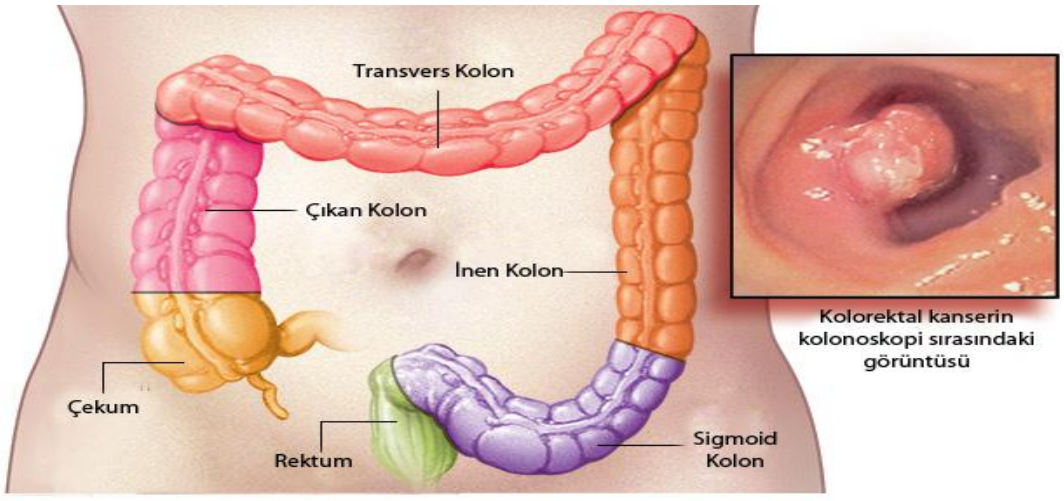
Kolorektal kanserin somatik ve germline mutasyonlar nedeni geliştiği literatürde bilinen bir gerçek olmakla beraber literatürde kalıtımsal/ailesel KRK olgularının sınıflandırılması kesin çizgiler ile oluşturulmamıştır. Farklı gruplar, farklı çalışmalara göre sınıflandırma değişebilmektedir. Kolorektal kanser kabaca sporadik (%75), ailesel ama sınıflandırılamamış KRK (%20), Herediter nonpolipozis KRK (Lynch Sendrom) (%3), Ailesel Adenomatöz polipozis (%1) ve diğer nadir gözlenen sendromlar (%1) olarak sınıflandırılmaktadır (16) (Şekil 2.1). Kalıtımsal/Ailesel kolorektal kanser Herediter non polipozis KRK, ailesel adenomatöz polipozis, *MUTYH* ilişkili polipozis, polimeraz proof reading polipozis, herediter miks polipozis, hamartomatöz polipozis, ailesel KRK X sendromu, kalıtımsal meme ve kolorektal kanseri, sendromik kolorektal kanser şeklinde

sınıflandırılabilir. Bölüm 2.5.1'de sık gözlenen seçilmiş sendromlar ayrıntılı olarak anlatılmıştır (17).



Şekil 2.1. Kolorektal kanserin heterojenitesi (17,18)

Kolorektal kanser (KRK), epitel doku kökenli bir kanser türüdür. Kolon ve rektum dokusunda meydana gelmekte ve kolorektal karsinoma olarak isimlendirilmektedir. Bağırsak sistemi aşağıdaki şekilde verildiği gibi kısımlara ayrılmaktadır (Şekil 2.2). Bu kısımlara göre kolorektal kanserin histolojik, moleküler, patolojik sınıflandırması değişebilmektedir.



Şekil 2.2. Kolon anatomik yapısı (Mayo Klinik yayınlarından modifiye edilmiştir.)(19)

KRK'in anatomik lokasyona göre genotipik ve fenotipik patolojisi de değişmektedir. TCGA entegrasyon sonuçlarına göre kolon ve rektum adenoma karsinomaları arasında moleküler bir fark gösterilmemiş olmasına rağmen kolon bölümlerine göre klinik ve mutasyonlar değişmektedir (20). Kanser gelişiminde model olarak kullanılan kolorektal kanser gelişimi, temelini ilk başta Vogelstein modeli oluşturmuştur. Aşağıda bu model hakkında bilgi verilmiştir.

2.3.1. VOGELSTEİN MODELİ

Vogelstein modeli, 1988 yılında 172 kolorektal neoplastisitesini içeren örnek grubu ile oluşturulmuş kanser gelişiminde model olarak gösterilmiştir. Sonuçta ana fikir olarak kanserin tek bir mutasyon ile gelişmediği ve üst üste biriken "driver" mutasyonların normal hücreyi neoplastik duruma soktuğu ve nihayetinde karsinogenez gözlendiği gösterilmiştir. Özellikle germline mutasyon taşımayan kolorektal kanserin gelişiminde rastgele meydana gelen de-novo mutasyonlar kanserin ileri yaşlarda oraya çıkmasına neden olmaktadır.

Bu model özellikle epitelyal kanserlerde model olarak gösterilmiştir. Kolorektal kanserde en sık gözlenen kromozom bütünlüğünün bozulması (Kromozom İnstabilite-Chromosomal Instability, CIN) temel alınarak bu model oluşturulmuştur. CIN kolorektal kanserler arasında %80'lik bir kısımda gözlenmektedir (21).

Kolorektal kanser gelişiminde adenomadan karsinomaya yani bağımsız metastatik invaziv doku yığınına dönüşüm temel olarak belli yolaklar üzerinden olmaktadır. Aşağıda Vogelstein modeline göre sıklıkla mutasyona uğrayan "driver" mutasyon gözlenen genler örnek olarak verilerek kanser gelişimi açıklanmıştır. Bu yolaklarda açma-kapama noktalarında bulunan diğer protein, genler veya moleküller de örnek verilen genler kadar önem arz edebilmektedir. Kolorektal kanserin 4 aşamalı gelişimi bir sonraki kısımda anlatılmıştır.

2.3.1.1. Erken Adenoma (ACF-Aberrant kriptik lokus)

Hücre bölünmesinde en önemli yolaklardan olan WNT/Beta katenin yolağında tümör baskılayıcı gen olan *Adenomatöz Polipozis Lokus* (*APC*) geninde LOF veya 5p21 delesyonu gerçekleşir. Bu nedenle açık kalan WNT/Beta katenin yolağı sürekli bölünmeyi uyaran mitojenlerin sentezlenmesine neden olur. *APC* geni WNT sinyal yolağında beta katenin baskılanmasında yer alan önemli tümör baskılayıcı gendir. *APC* fonksiyon kaybı, mitoz

bölünme düzeninin kaybolmasına neden olarak CIN gelişiminde etkili olmaktadır. Bazı çalışmalarda daha düşük olmakla beraber erken adenomada %80 oranında bu anomali belirlenmiştir (22).

Ancak bu aşamada henüz kanserleşme diğer koruyucu mekanizmalar aktif olduğundan gerçekleşmez. Sadece kolorektal dokusunda normalde olmaması gereken küçük hücre yığını oluşmaya başlar. Bu hücreler metastatik veya invaziv özellikte değildirler.

2.3.1.2. İntermediyer Adenoma

WNT/Beta katenin yolağında anomali olan bu hücrelerde MAPK yolağında da genelde protoonkogen olan *RAS* geninde GOF mutasyonu veya 12p12 duplikasyonu sonrasında işlem kazanımı gözlenir. *KRAS* (12p12) CIN yolağında yer alan önemli bir gendir. GTP bağımlı proteini kodlayan bu gen, mutasyona uğradığında RAS-RAF-MEK-ERK yolağının sürekli açık kalmasına neden olmaktadır (23). Bu durumda sürekli baskılanmayan GTPase olan *RAS* geni yolağın sürekli aktif kalmasına neden olarak hücre bölünmesini uyaran moleküller sentezlenmesi sağlanır. Bu aşamada da henüz karsinogenez olarak sınıflandırılabilecek doku parçası oluşmamıştır.

2.3.1.3. Geç Adenoma

DCC, SMAD2 ve *SMAD4* 18q21'de lokalizedir. Bu bölgenin allelik kaybı adenomaların %60'ında gözlenmektedir (24). *SMAD2* ve *SMAD4* TGF beta sinyal yolağında yer alan önemli aktivatör genlerdendir (25). Hem WNT/Beta katenin yolağı hem de MAPK yolağında gerçekleşen mutasyonlar ile hücrede birikim gerçekleşir. TGF beta yolağında özellikle tümör baskılayıcı gen olan *SMAD4*'de veya *NETRIN 1* aracılığı ile ve apoptozu uyarma görevi olan "*Deleted in Colorectal Cancer* (*DCC*)" geninde LOF gözlenmesi veya 18q21 delesyonu ile geç adenom oluşmuş olur. 18q delesyonu CIN göstergesidir. Ancak bu bölgede bulunan gen değişimleri MSI'de de bulunmaktadır.

2.3.1.4. Kolorektal Karsinoma

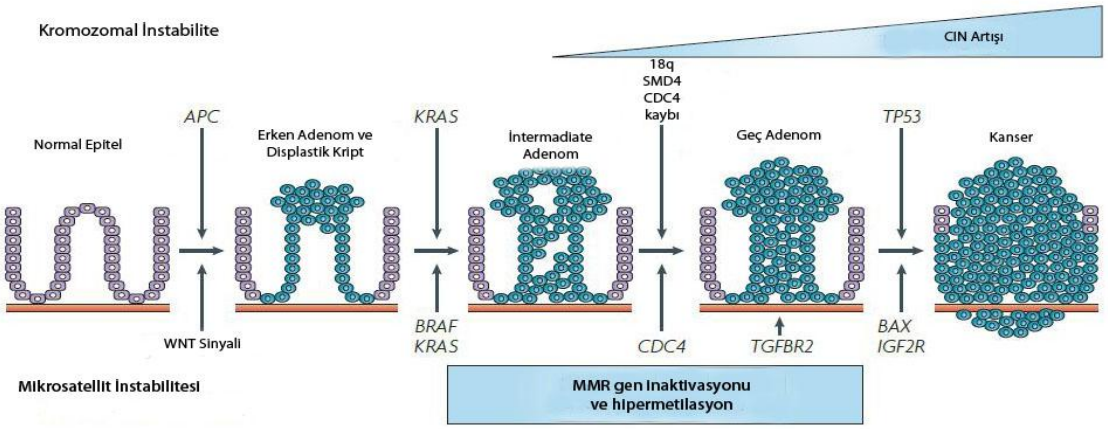
Son olarak *TP53* geni ve DNA tamir mekanizması LOF mutasyonu veya 17p53 delesyonu ile DNA tamir mekanizması ve hücre döngüsünde kontrol ortadan kalktığı için karsinoma gelişimi gerçekleşir.

TP53 (17p13) geninde mutasyon veya 17p kaybı, adenomadan karsinomaya dönüşümde geleneksel yol olarak bilinmektedir. *TP53* LOF veya mutasyon gözlenmesi ile DNA kontrol mekanizması ve hücre döngüsünün kontrolü sağlanamadığından neoplastik değişimin karsinomaya dönüşümü, histolojik sınıflandırmasını hızlı bir şekilde etkileyerek değiştirmektedir. *P53* kaybı ile hücre, DNA hasarı olmasına rağmen hücre döngüsüne devam eder ve hücre bölünmesi gerçekleşir. Hasarlı DNA'da meydana gelen değişimler tamir edilmeden bölünme devam eder. DNA tamiri veya apoptoza yönelim olmadığından bu aşamadan sonra genomik bütünlük ivmeli bir şekilde artarak bozulur ve karsinogenez gözlenir (26).

2.4. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER SINIFLANDIRMASI

Kolorektal kanser kalıtımsal ve sporadik olmak üzere sınıflandırılabilse de moleküler düzeyde genomik bütünlüğüne göre de sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.3). Kolorektal kanser gelişimi, moleküler düzeyde genomik bütünlüğün bozulması ile gerçekleşmektedir. Bu durum kromozomal düzeyde bozukluk, mikrosatellit dizilerinin bozulması veya promotor bölgelerdeki metilasyon bölgelerinin metillenmesinde değişimler nedeniyle gerçekleşmektedir. Ayrıca genomik bozukluğa ek olarak neoplastik oluşumun bulunduğu anatomik lokasyona, bireyin taşıdığı mutant tümör baskılayıcı genlere, onkogenlere göre de etkilenmekte ve tüm bu bileşenler eşliğinde KRK hastaları sınıflandırılmaktadır. Bu bölümde kolorektal kanser sınıflandırılmasında kullanılan 3 moleküler sınıflandırma anlatılmıştır.

1. Kromozom kararsızlığı (CIN)
2. Mikrosatellit kararsızlığı (MSI)
3. CpG adacık metilasyon fenotipi (CIMP)



Şekil 2.3. Adenomadan karsinomaya dönüşüm (Walther ve arkadaşlarının çiziminden modifiye edilmiştir) (27)

Yaklaşık olarak KRK hastalarının %17'si MSI (28,29), %60-80'ı CIN ve %20'si ise CIMP (29-32) göstermektedir. MSI gösterilmiş KRK'lerin üçte birinde CIN de gösterilmiştir (50). Sadece bir çalışmada her üç instabilite gösterilmiştir (33). KRK hastalarının %12'sinde sporadik MSI gösterilmiş bireylerde CIN bulunmamaktadır (30). CIN pozitif, MSI-H olan hastalarda CIMP pozitif gösterilmiş olsa da şu andaki bilgilere göre CIN ve CIMP gelişiminin moleküler olarak ilişkisi olmadığı düşünülmektedir (27,33).

2.4.1. KROMOZOM İNSTABİLİTE (CIN)

Geleneksel KRK gelişim yolağı olan Vogelstein yolağı CIN yolağıdır. CIN yolağında, moleküler anomaliler kromozom yapısı veya sayısında meydana gelmektedir (anöploidi) (34). Bu yolakta başlangıçta ilk teşhis edilebilen lezyon polip öncüsü mikroskobik mukozal lezyon aberant kriptik lokus (ACF) gözlenir (35,36). CIN yolağı **1**. *APC* geninde mutasyon veya *APC* geninin içeren 5q kaybı, **2**. *KRAS* onkogeninde mutasyon veya 18q kaybı ve **3**.en önemli tümör baskılayıcı gen olan *TP53* geni içeren 17p delesyon ile ilişkilidir (21). CIN olarak sınıflandırılmış KRK hastalarının çok küçük bir kısmında bu mutasyon veya delesyonların tümünü içermektedir (37). Neoplastik oluşumun gelişimi için, klonal evrim sırasında diğer genetik ve epigenetik değişimler etken olabilmektedir. İnsan genomunun dizilenmesi tümöre özgü mutasyonların, potansiyel genetik değişikliklerin ortaya konulmasına fırsat sağlayabilmektedir. Adenomadan karsinomaya dönüşüm bugün bilinen mekanizmalara, genlere ek olarak alternatif veya tamamlayıcı aşamalar ile sağlanmaktadır.

Erken adenomada %80 oranında *APC* geni mutasyon veya LOF belirlenmiştir (22). *KRAS* (12p12), CIN yolağında yer alan önemli bir gendir (23). *BRAF* da bu yolakta yer alan bir diğer önemli gendir. Bu gendeki mutasyon CIMP yolağı ile ilişkilendirilmiştir. *KRAS* mutasyonu gelişmiş adenomaların %35-42'sinde gözlenmektedir (23,38). *KRAS* CIN yolağında ek olarak CIMP yolağında da önemli etkileri vardır (39). *DCC*, *SMAD2* ve *SMAD4* 18q21'de bulunmaktadır. Bu bölgenin delesyonu adenomaların %60'ında gözlenmektedir (24). *SMAD4*'ün germline mutasyonu jüvenil polip sendromunda gözlenmektedir (25). *TP53* (17p13) geninde mutasyon veya 17p kaybı, adenomadan karsinomaya dönüşümde mihenk noktasıdır. DNA tamiri veya apoptoza yönlenim olmadığından bu aşamadan sonra genomik bütünlük ivmeli bir şekilde artarak karsinogenez gözlenir (26).

Günümüzde karsinoma oluşumunda etkili olduğu bilinen CIN yolağında yer alan genlerin ayrıntılı bilgisi tezin 2.3.1 kısmında anlatılmıştır.

2.4.2. MİKROSATELLİT İNSTABİLİTESİ (MSI)

Bir diğer genomik instabilite yolağı MSI yolağıdır. Mikrosatellitler, genom boyunca yer alan nükleotit tekrarı dizisinden oluşan bölgelerdir. MSI ise normalde devam eden bu tekrarların sayısında değişimlerin olması anlamına gelmektedir. Bir başka deyişle germline mikrosatellit tekrar dizilerinin sayısal olarak tümör DNA'sından farklı olması anlamındadır. "Caretaker" bakıcı genleri içeren DNA tamir mekanizmalarından yanlış anlam mutasyon tamir mekanizmasında (MMR) fonksiyon bozukluğu nedeni ile MSI gözlenmektedir. MMR sistemi özellikle 7 protein –MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1, PMS2- tarafından kontrol edilmektedir (40). Bu proteinlerin 5 farklı heterodimer oluşturması "MSH2-MSH3, MSH2-MSH6, MLH1-PMS1, MLH1-PMS2, MLH1-MLH3 ve MLH1, MSH2" tamir mekanizmasının devam ettirilmesinde önemlidir. *MLH1, MSH2, MSH6* ve *PMS2* mutasyonları HNPCC'de gösterilmiştir.

MSI belirlenebilmesi için standardize belirteç paneller hazırlanmıştır. Doğrulama için mononükleotit (BAT25, BAT26) ve 3 dinükleotit mikrosatellit (D5S346, D2S123 ve D17S250) paneli bulunaktadır. 5 bölge içinde 2≥ mikrosatellit instabilitesi belirlendiğinde MSI veya MSI-H olarak isimlendirilmektedir. Mikrosatellit düşük (MSI-L) veya mikrosatellit stabil (MSS) 1≤ olduğunda isimlendirilmektedir. MSI DNA hatasının dramatik bir şekilde artmasına ve KRK gelişimine neden olmaktadır. Bu gelişimde etkili olan özellikle KRK gelişiminde etkin "*MSH3, TGFBR2, BAX, CASP5,MSH6, CTNNB1, APC, IGF2* ve *E2F4*" genleri içinde mikrosatellit bölgeleri yer almaktadır (41). MSI-H kanserler genelde diploittir ve MMR bozukluğu CIN olmaksızın genomik instabiliteye neden olmaktadır. HNPCC özellikle MSI gözlenen KRK formu olsa da sporadik formlarda da %15 oranında MSI gözlenmektedir. *MLH1* promotor metilasyonu ile MLH1 susturulması sonucu sporadik olarak MSI gözlenmektedir. Kalıtımsal veya sporadik olsa da her iki durumda da aynı mekanizmayı paylaşmaktadırlar.

2.4.3. CpG ADACIK METİLASYON FENOTİPİ (CIMP)

CIMP yolağı Sporadik KRK'de ikinci sıklıkta gözlenen yolaktır. Sporadik KRK'lerin %15'inde (30,42-45) gözlenmektedir. CIMP yolağı sporadik KRK'lerde promotor bölgenin metilasyonu ve ifadeyi epigenetik yoldan durdurarak epigenetik

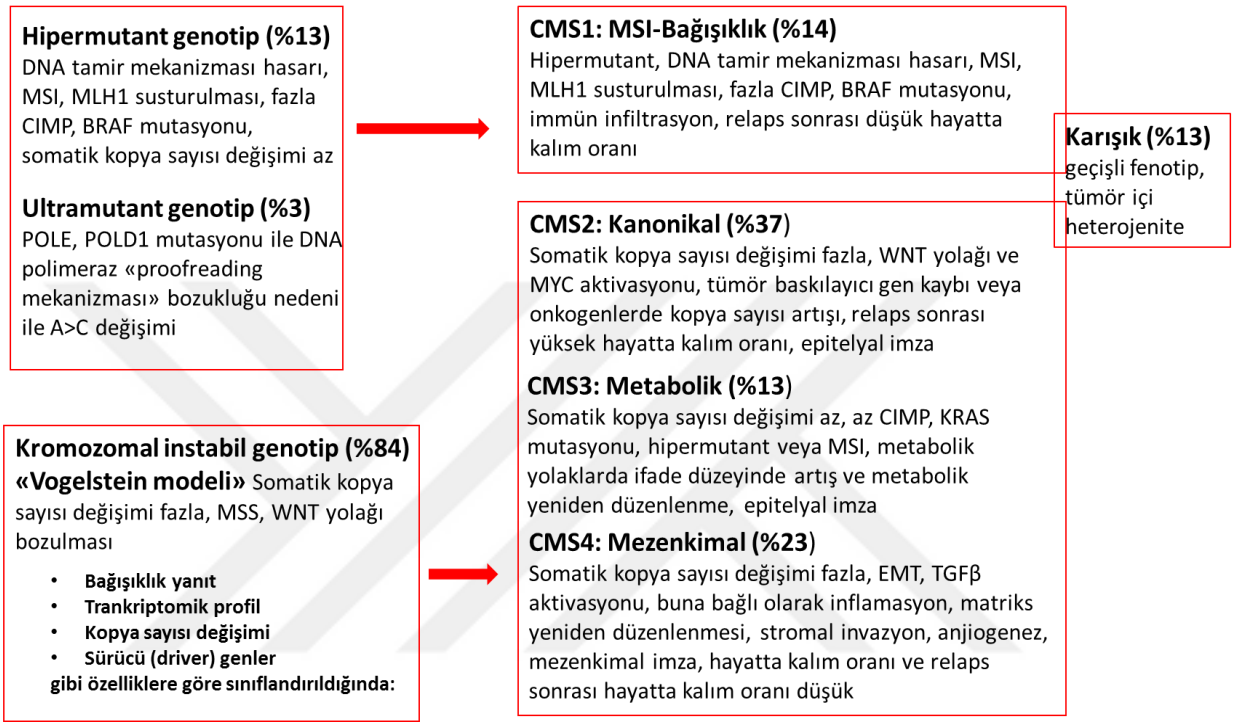
instabiliteye yol açmaktadır. Daha önceki bölümde de bahsedildiği üzere, DNA tamir mekanizmasında yer alan *MLH1* epigenetik susturulması, önemli tümör baskılayıcı genin susturulmasına neden olmaktadır (46). Günümüzde CIMP pozitif kanserler metilasyon belirteçleri ile gösterilmektedir ancak henüz standardize bir panel oluşturulmamıştır. ”*CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3* ve *SOCS*” genleri bir paneli oluşturabilmektedir. Bu panelde %10 oranında 3≥ promotor metile olmuş ise CIMP pozitif olarak sınıflandırılmaktadır. CIMP pozitif grup ise yüksek veya düşük CIMP olarak sınıflandırılabilmektedir (39). *BRAF* mutasyonu da CIMP pozitif hastalarda daha sık gözlendiğinden incelenmektedir (30). Bir diğer çalışmaya göre, düşük CIMP KRK'lerin *BRAF* yerine *KRAS* mutasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir ve tübülovillöz adenoma gelişiminin bu genotip ile paralel olduğu öne sürülmüştür (39). Bu tip genotipik-fenotipik gözlemler heterojen bir hastalık olan kolorektal kanserin gruplandırılmasında kullanılmaktadır. Günümüzde bu sınıflandırma farklı genotipik ve fenotipik değişkenler ile çalışma grupları arasında değişiklik göstermektedir. Yine de bu durum tartışmalı bir konudur.

CIMP pozitif KRK'lerin klinik patolojik olarak iyi sınıflandırılmış, genelde kolonun proksimal lokasyonunda, ileri yaş kadınlarda daha sık gözlenmektedir (43-45). Bu fenotip MSI pozitif veya negatif şekilde gözlenebilir. MSI pozitif bireylerde *MLH1* promotor metilasyonu sıklıkla MSI'ne yol açmaktadır. CIMP-H, MSI pozitif olarak sınıflandırılmış bireylerin iyi prognoz gösterdiği, CIMP-H MSS olduğunda ise daha kötü prognoz, lenfositik infiltrasyon ile ilişkilendirilmiştir (30,41,43-45,47). CIMP pozitif yolağın öncü lezyonlara bakıldığında diğer yolaklardan farklı bir yolak olduğu düşünülmektedir. HNPCC ve CIN yolağında adenomatöz polip gözlenirken CIMP yolağında ise genelde "sesil serrated polip" gözlenmektedir (46,48,49).

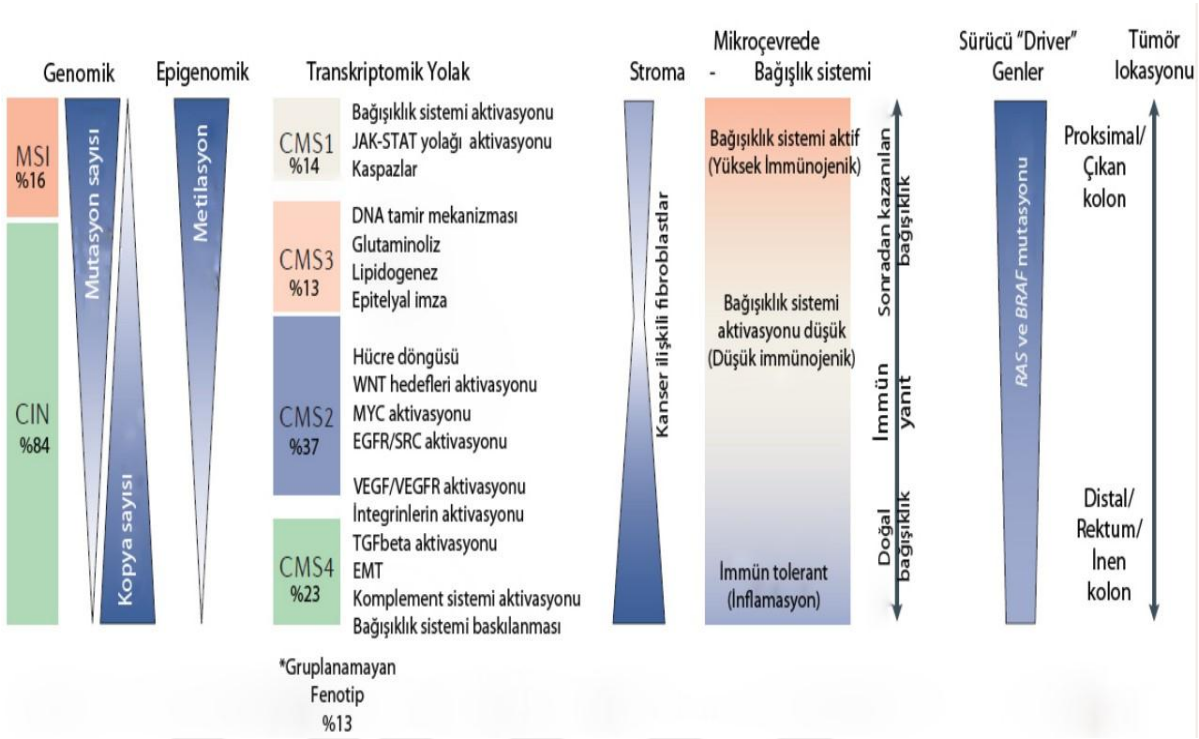
2.4.4. MOLEKÜLER SINIFLANDIRMALARDA FARKLI YAKLAŞIMLAR

Teknoloji ve bilimsel birikim arttıkça farklı bakış açıları ile KRK vakaları sınıflandırılmaktadır. Aşağıda iki farklı gruba göre yapılmış sınıflandırma örnek olarak verilmiştir (Şekil 2.4, Şekil 2.5). Birbirinin devamı niteliğindeki 2015 ve 2017 yıllarında yayınlanan KRK sınıflandırması bağımsız çalışmaların meta analizi sonunda oluşturulmuş gruplandırmalardan temel almaktadır (50,51). Bu sınıflandırmalardan şekil 2.13'de alt tipler tümör ifade düzeyi, histolojik sınıflandırılma gibi moleküler veya fenotipik özelliklere göre ayrım yapılmaya çalışılmıştır. Şekil 2.14'de ise ilk kısımda TCGA (hipermutant, ultramutant, kromozoma instabil) verilerine göre sınıflandırma yapılmış, ikinci kısmında Dienstmann ve

arkadaşlarının, Guinney ve arkadaşlarının art arda yapmış olduğu çalışmada TCGA'ya göre ayrılmış sınıflar alt başlıklara ayrılmıştır. Bu sınıflandırma, özellikle MSI, *KRAS/BRAF* mutasyonları, WNT sinyalizasyonu, EMT geçişi, tümörigenik bölgenin immün özellikleri gibi ana karakteristik değişkenlere göre yapılmıştır. Şekil 2.15'te daha güncel ve sistematik bir yaklaşım ile sınıflandırma yapılmıştır. Bu iki örnek sınıflandırma bir kez daha KRK sınıflandırmasının ne kadar kompleks olduğunu göz önüne sermiştir.



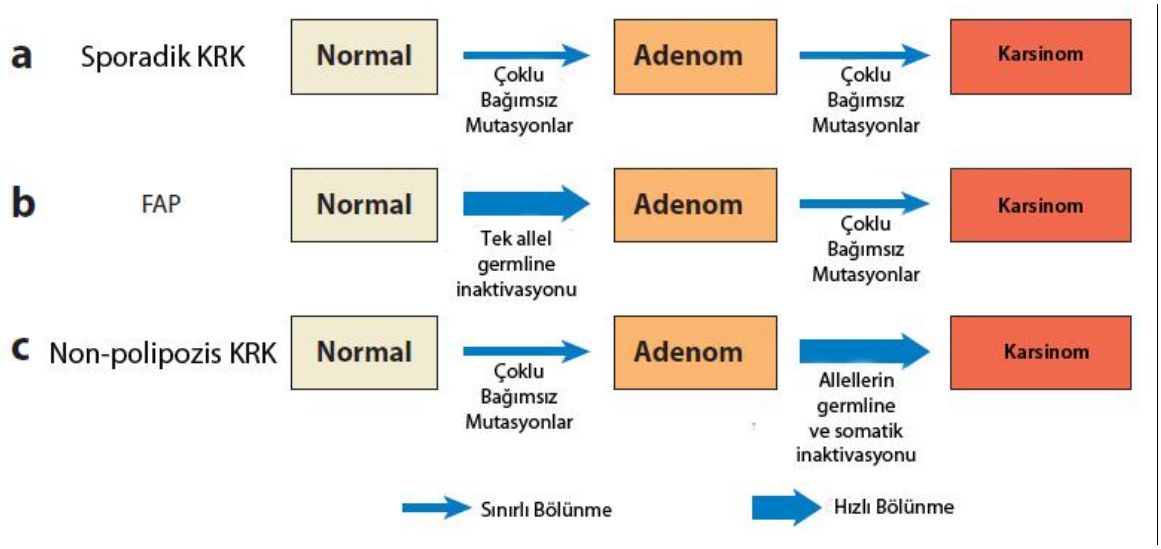
Şekil 2.4. KRK sınıflandırması sırasında TCGA sonuçları ile meta analiz sonuçları bir arada kıyaslanarak verilmiştir (50,51).



Şekil 2.5. KRK sınıflandırması Guinney ve arkadaşları sonuçları temel alınarak, Dienstmann ve arkadaşları çizimi modifiye edilmiştir (51).

2.5. KOLOREKTAL KANSERİN KALITIMSAL VEYA SPORADİK FORMU

Kolorektal kanserin daha önce de bahsedildiği üzere, kalıtımsal veya sporadik formu bulunmaktadır. Sporadik form, %75 oran ile kolorektal kanserlerin büyük bir kısmını oluşturmakta ve penetrans eksikliği nedeni ile çevresel faktörlerin etkisi ile tam olarak ilişkili genler bilinmemektedir. HNPCC, FAP sendromlarında doğuştan gelen MMR gen ve *APC* eşey hücre (germline) mutasyonları, sporadik olgulara kıyasla daha hızlı kanser gelişmesine yol açmaktadır. Ancak HNPCC sendromunda FAP sendromuna göre ilk başta kanser gelişimi daha yavaştır. Bunun esas nedeni, germline mutasyonların MMR genlerinde bulunması nedeni ile *APC* gibi kritik genlerdeki mutasyon gelişiminin rasgele gerçekleşebilmesinden ileri gelmektedir. Sporadik KRK'de ise adenomadan karsinomaya dönüşüm bağımsız somatik mutasyonlara bağlı olduğundan, sıklıkla 50 yaşından sonra gözlenmektedir. Aşağıdaki kalıtımsal ve sporadik KRK karşılaştırması yapılmıştır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kolorektal kanser gelişimi (Fearon ve arkadaşlarının çiziminden modifiye edilmiştir) (2)

2.5.1. KALITIMSAL KOLOREKTAL KANSER

Sık gözlenen kalıtımsal kolorektal kanserler aşağıda çizelgede sıralanmıştır. Kalıtımsal kanserlerden en sık gözlenen Ailesel ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC-Lynch Sendromu) aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmıştır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Kalıtımsal kolorektal kanser sendomları (2)(88)

Genetik olarak kalıtılan Kolorektal Kanserler			
Sendrom	**Genel özellikleri**	**Gen defekt(leri)**	**CRC gelişme riski**
FAP	Çoklu adenomatoz polip (>100) ve kolon ve rektumda karsinoma, duedonal polip ve karsinoma, midede fundal bezi polipi, retinadaki pigment tabakasında konjenital hipertofi	APC (>90%)	99%
Gardner Sendromu	FAP'a benzemektedir, ayrıca desmoid tümörler ve mandibular osteoma	APC	-
Turkot Sendromu	Beyin tümörü (medullablastoma) ile birlikte kolorektal kanser ve polipozis	APC, MLH1, PMS2	%20-75*
Artmış adenomatoz polipozis koli	100'den daha az polip, mutasyon taşıyan tek bir ailede farklı bir durum gözlenmiştir (5 ile 1000 arasında polip)	APC (özellikle 5 mutasyon)	99%
Herediter Nonpolipozis Kolorektal kanser (HPNCC)	Yaygın olmayan polip ile seyreden kolorektal kanser, diğer kanserler endometrial, over, mide kanseri ve nadiren üretra, hepatobiliyer, ve beyin tümörü	MSH2 MLH1 PMS2 GTBP, MSH6	%20-75*
Peutz-Jeghers Sendromu	Gastrointestinal(GI) yolda hamartom polipleri, mukakutaneus pigmentasyoni GI ve non-GI sistemde kanser riski artışı	LKB1, STK11 (30–70%)	39%
Cowden Hastalığı	Meme, tiroit, deri, merkezi sinir sistemi, gastrointestinal sistemi kapsayan çoklu hamartomlar; meme, uterus, tiroit kanser riski artışı	PTEN (85%)	yok
Juvenile poliposis Sendromu	Ağırlıklı olarak kolon ve midede çoklu hamartom/jüvenil polip, kolon ve mide kanserinde değişken kanser riski, yüz yapısında değişiklik	DPC4 (15%), BMPR1a (25%), PTEN (5%)	39%
MYH-bağımlı poliposis	Çoklu adenomatoz GI polip, otozomal resesif temel, kolon poliplerinde somatik KRAS mutasyonu	MYH	80%
POLE/POLD1-associated syndrome	Adenomatozpolipozis %17, artmış adenomatöz polipozis %47.7, non adenomatöz %15.9	POLE, POLD	-
Ailesel kolorektal kanser tip X	HNPCC sendromu ile benzer klinik tablo gösterse de DNA yanlış anlam mutasyon tamir mekanizması (MMR) genleri tüm hastalarda belirlenmemiştir	MSI olsa da tam olarak bilinmemektedir	-
***hangi gende mutasyon olduğuna göre değişebilir.**			

2.5.1.1. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP)

Ailesel adenomatöz polipozis (FAP), otozomal dominant kolorektal kanserlerde (KRK) ender rastlanan bir hastalıktır ve KRK hastaları içinde %1'den daha azını oluşturmaktadır (52). Malign transformasyon potansiyeline sahip olmaları nedeniyle kolorektal kanserlerin moleküler temellerinin ortaya koyulmasında anahtar görevi görmüştür.

Klasik FAP sendromunda olgularda erken dönemde 100-1000 arasında tüm mukoza yüzeyini halı gibi kaplayan adenomatöz polip gelişimi gözlenmektedir. FAP tanısının konabilmesi için, en az 100 polip teşhisi gereklidir. Çoklu adenomlar, sindirim yolunun

herhangi bir yerinde yerleşebilir. Polipler genelde adenom yapısındadır ve ergenlik çağı ya da erken yetişkinlik döneminde belirgin hale gelirler (53). Ortalama olarak hastalık gelişimi 35 yaşında %95 oranında FAP kaynaklı polipler şeklinde gözlenir ve KRK gelişme riski %95'dir (54). Bu nedenle koruyucu kolonoskopi takibi önerilmektedir.

FAP sendromunda germline *APC* mutasyonu esas neden olarak gösterilse de %12-20 FAP hastasında *APC* mutasyonu belirlenmemiştir. Bu hastalarda, polip oluşmasına neden olabilecek *MUTYH* mutasyonları da belirlenmemiştir (55,56). Ayrıca %25'den fazla FAP olgusunda de novo germline mutasyon gerçekleştiği ve karakteristik otozomal dominant kalıtıldığı, yapılan analizler ile belirlenmiştir (57). FAP'ın diğer özellikleri ince barsak adenoması, gastrik polipozis, doğuştan gelen retinal epitelde pigment hipertofisi(CHRPE), desmoid tümör gözlenmesi olarak sayılabilir (58). FAP gelişimi, malign olmayan kliniğine rağmen desmoid gelişimi ile ölümcül olabilmektedir. Artmış FAP daha az polip gelişimi ve geç dönem hastalık gelişimi ile FAP sendromunun hafif formudur. Turkot sendromu ve Gardner sendromu diğer FAP varyantlarıdır. Turkot sendromu, FAP gelişimi ve merkezi sinir sistemi tümörleri, primer medullablastoma ile karakterize iken Gardner sendromu sarkoma, osteoma ve dental anomaliler ile karakterizedir (59).

2.5.1.2. Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC-Lynch Sendromu)

HNPCC tıp literatürüne 1913 yılında 3 nesilden oluşan ailede tanımlanmış ilk kalıtımsal kanser sendromu olarak geçmiştir (60). Sonrasında Lynch ve arkadaşları olguda yaygın polip gelişimi gözlenen otozomal dominant bir hastalık olduğunu yeniden tanımlamışlardır (61).

DNA tamir mekanizması (MMR) genlerinin kanser gelişiminde dramatik bir şekilde etkili olduğu bu sendromda gösterilmiştir. Özellikle çekum ve proksimalde, ailesel kolon karsinomaları ile karakterizedir. DNA tamir mekanizması genleri olan *MSH2, MSH6, MLH1, PMS1, PMS2* genlerinden birinde meydana gelen mutasyon bu hastalığa neden olmaktadır. Ancak MLH1 mutasyonu, sporadik kolorektal kanser vakalarında da gösterilmiştir. HNPCC olarak sınıflandırılmış KRK hastalarında ise MMR gen mutasyonu belirlenmemiştir (53). MMR genlerinde meydana gelen mutasyonlar DNA tamirini sağlayamadığı için özellikle mikrosatellit denen DNA kısa tekrar dizilerinde, tekrar sayısı hatalarına neden olmaktadır. Bunun sonucunda genler içinde mikrosatellit instabilitesi (MSI) gözlenmektedir.

Erken dönem proksimal kolon kanseri gelişimi, lenfatik infiltrasyon, Crohn hastalığı benzeri lenfatik farklılaşma, müsinöz farklılaşma, medullanın büyümesi (62,63), gastrik,

endometrial, over, renal veya hepatobiliyer kanserler eşlik etmektedir. HNPCC sendromu tanısı için en az 2 ardışık nesilde 3 olgu (2'si 1. derece akraba) gözlenmesi ve tümör gelişiminin 1 olguda 50 yaştan önce olması gerekmektedir. Kromozom 3p veya 2p mutasyon veya delesyonu HNPCC ile bağlantılı bulunmuştur. Ancak genetik olarak heterojen bir hastalık olduğu, fenotipik olarak bu sendrom tanısı almış hastaların, genotipik olarak gösterilememesinden anlaşılmaktadır. Yapılan araştırmalarda yanlış anlam mutasyon tamir mekanizması (MMR) genlerinde meydana gelen germline mutasyon nedeniyle ortaya çıkmaktadır.(64,65).

MMR gen mutasyonları mikrosatellit tekrar dizilerinde instabiliteye (MSI-H) neden olmaktadır. Ancak MSI-H sporadik KRK'lerin %15'inde de gözlenmektedir (66,67). HNPCC sendromunda MMR genlerinde meydana gelen bozukluklar mutasyon oluşumunu 100 kat artırmaktadır. HNPCC sendromunda sıklıkla eşey hücre mutasyon gözlenen ve MSI-H genotipine neden olan kromozom 2p'de lokalize olan *MSH2, MSH6, PMS1* genleri, kromozom 3p'de lokalize olan *MLH1* genleridir. Mutasyon belirlenmiş hastaların %70'inde *MSH2* ve *MLH1* değişimi belirlenmiştir. Ancak %60 HNPCC sendromu gözlenen hastalarda MMR gen mutasyonu belirlenmemiştir.

Artmış KRK riski olan MMR gen bozukluğu bulunan olgularda HNPCC alt tipi olarak düşünülse de ailesel "Kolorektal kanser sendromu X" olarak isimlendirilmektedir (68,69). Normalde sporadik KRK'de adenomadan karsinogeneze dönüşüm 20-40 yıl sürerken, heterozigot germline MMR gen mutasyonu taşıyan HNPCC hastalarında, adenomadan kanser gelişimi 3-5 yıl sürmektedir (70). Bu duruma MSI-H fenotipinin etkisi büyüktür. Buna ek olarak şüphesiz ki MMR genlerinin eksikliği dolayısıyla MSI-H gözlenmesi somatik olarak protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin kanser gelişimine ek etki yapmasına neden olmaktadır (2).

2.5.2. SPORADİK KOLOREKTAL KANSER

Kolorektal kanserlerinin %75'ini sporadik KRK oluşturmaktadır. Sporadik kolorektal kanser, somatik mutasyonların oluşturduğu bir genetik hastalık olarak sınıflandırılsa da kanser oluşumu ve gelişimi, lokal kolonik çevre, hastanın genetik altyapısı ve çevresel faktörler tarafından etkilenmektedir. Sporadik olguların belirli bir kalıtım paterni olmaması nedeni ile genetik yatkınlığa neden olan genlerin tanımlanmasında farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, genetik ve epigenetik değişimlerin

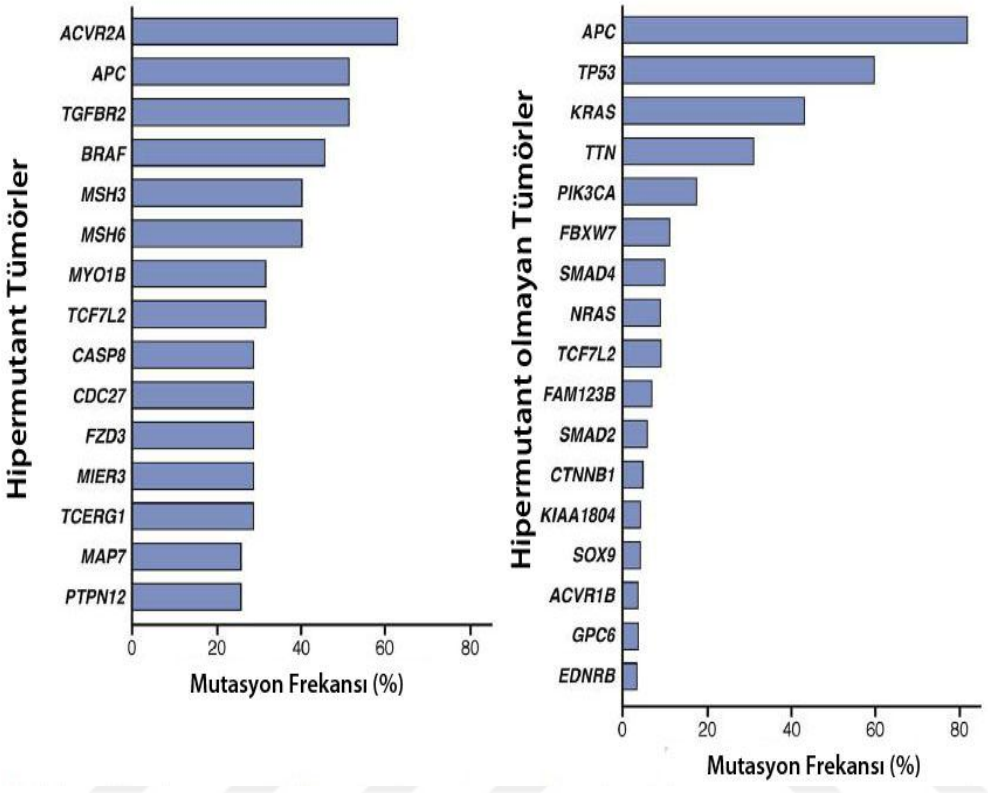
kanser başlangıcı, gelişimi ve metastazında etkili olduğu düşünülen bazı biyobelirteçler belirlenmiştir. Buna rağmen hem kalıtımsal hem da çevresel faktörlerin etkileşiminden oluşan multifaktöriyel bir hastalık olan sporadik KRK gelişiminde etkili yatkınlık genleri, erken tanı için kullanılabilecek biyobelirteçler diğer multifaktöriyel hastalıklarda olduğu tüm toplumu kapsayabilecek şekilde tam olarak belirlenememiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda daha önce de bahsedildiği üzere KRK gelişimi için 2-8 driver gen mutasyonun birikimi gerekmektedir. Bu gen mutasyonları sporadik KRK'de neoplastik lezyonların gelişimi ve adenomadan karsinomaya dönüşümü, bağımsız somatik mutasyonlara bağlıdır. Bu nedenle 20-40 yıl gibi uzun sürede, çevresel faktörler ve yatkınlık genlerinin etkisi ile de novo mutasyonların birikimi ile gerçekleşmektedir. Adenomadan karsinomaya geçiş tamir olmayan ve genetik bütünlüğü bozulan DNA'ları olan hücreler ile gerçekleşmektedir (2).

Sporadik KRK'in yaklaşık %85'lik kısmını oluşturan CIN yolağı kopya sayısı değişimi, anöploidi gözlendiğinden hipermutant olmayan KRK (non-hipermutated) olarak da sınıflandırılmaktadır. Bu yolakta *KRAS* ve *PIK3CA* mutasyonu, *APC* ve *P53* gibi tümör baskılayıcı genlerin LOH, çoklu kopya sayısı değişimi ve anöploidi ile karakterizedir (71).Geriye kalan %15'lik grup ise MSI, CIMP nedeni ile DNA tamir mekanizması düzgün çalışmadığından, hipermutant KRK olarak isimlendirilmektedir.

Hipermutant olmayan grupta CIN yolağında yer alan bekçi –gatekeeper- genlerde özellikle WNT sinyal yolağı başta olmak üzere 4:1 oranından sırasıyla tümör baskılayıcı genler ve onkogenler etkilenmektedir. Hipermutant olmayan grupta somatik kopya sayısı değişimleri, kromozomal değişimler gözlenmektedir. CIN KRK'de driver mutasyonların sıklıkla gözlendiği mekanizmalar arasında baz kesip çıkarma tamir mekanizması, mitotik iğ ipliği kontrol mekanizması, sentrozom düzenlenmesi, DNA kontrol mekanizması, hücre döngüsü kontrol noktaları sayılabilir. *TP53* ve *APC* LOF büyük oranda anöplodiye neden olur. Yapılan çalışmalarda CIN sporadik KRK'de %81 *APC* mutasyonu veya %93 WNT sinyal yolağında yer alan proteinlerin de-regülasyonu gözlenmiştir. *KRAS* mutasyonu hipermutant olmayan kanser içinde %41 oranında bulunmakla beraber MAPK sinyal yolağında yer alan diğer proteinlerde –ERBB, BRAF, NRAS- de hücre bölünmesini uyaracak mutasyonlar gözlenmektedir. PI3K/AKT/mTOR yolağında yer alan PTEN LOF hipermutant olmayan kanser içinde %18 oranında olduğu belirlenmiştir. TGFβ sinyal yolağında yer alan genlerden *TGFβR1, TGFβR2, ACVR2A, ACVR1B, SMAD2, SMAD3* ve *SMAD4* mutasyonları %27

oranında bu kanserlerde gözlenmektedir. İleri dönem KRK'lerde *SMAD2* ve *SMAD4* genlerini içeren 18q21 LOH %80 oranında gözlenmektedir. *TP53* mutasyonu ise, %60 oranında hipermutant olmayan KRK'lerde gözlenmektedir (Şekil 2.7).



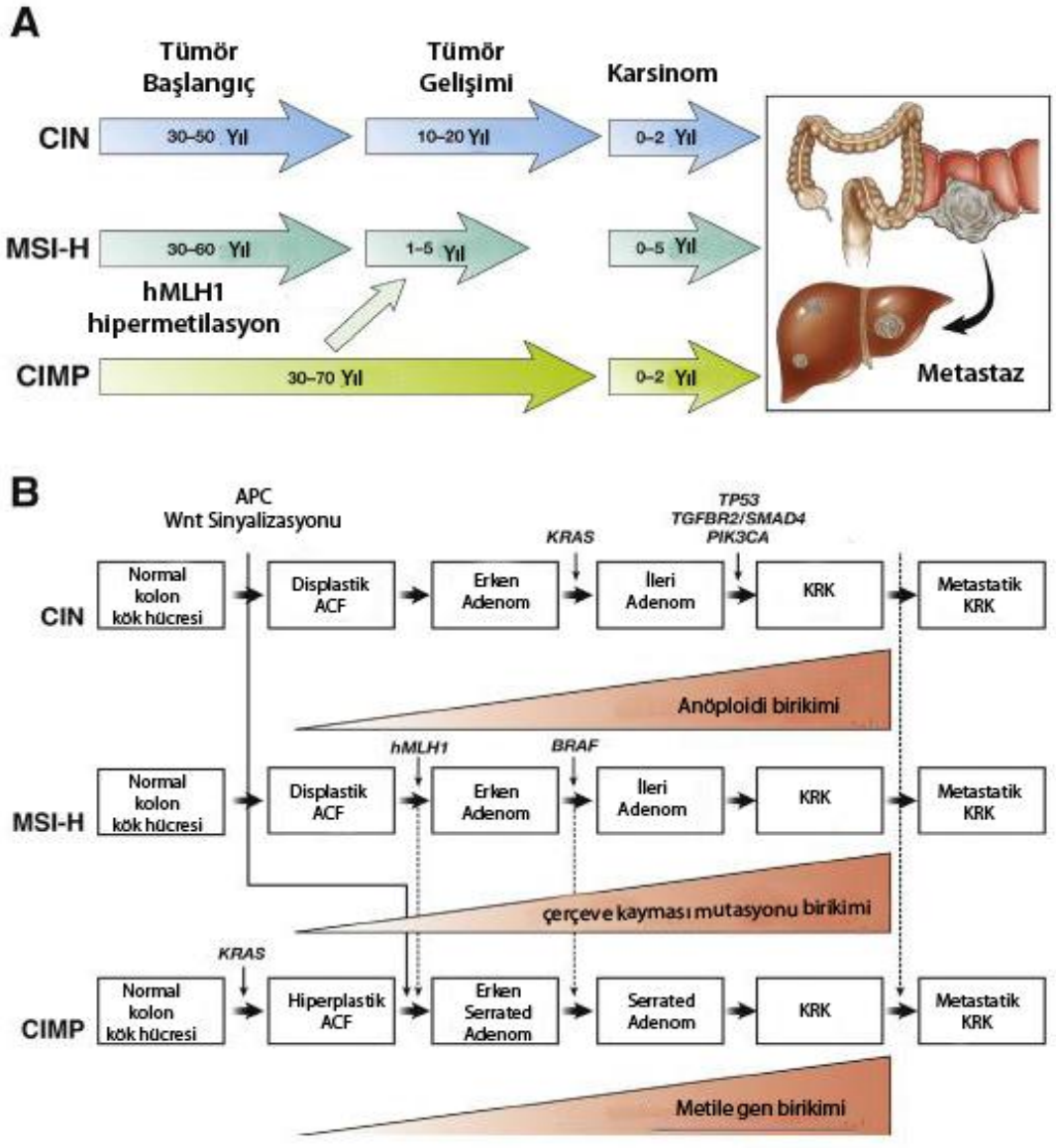
Şekil 2.7. Sporadik kolorektal kanserde sıklıkla mutasyon gözlenen genler (71)

Hipermutant KRK, bakıcı -caretaker- olarak isimlendirilen DNA tamir mekanizması genleri *hMSH6, hMSH2, hMSH3,* ve *hMLH3* ve *DNA polymerase* ε (*POLE*) mutasyonu gözlenmesine ek olarak *MLH1* promotor bölge metilasyonu nedeniyle LOF gözlenmektedir. Bu grupta gen içi mikrosatellitlerde mutasyon gözlenmektedir (72). CIMP tümörlerde MLH1 metilasyonu DNA tamir mekanizması düzgün çalışamadığından bu tümörlerde MSI-H de gözlenebilmektedir. Ayrıca, MSI-H sporadik KRK'lerde *ACVR2*, *TGFBR2*, *hMSH3* ve *hMSH6* genleri içinde yer alan mikrosatellitler içinde mutasyonlar gösterilmiştir. *BRAF* gen içinde mikrosatellit mutasyonu gözlenmese de MSI-H KRK'lerin %40'ında BRAFV600E onkogenik mutasyonun gözlenmektedir. CIN yolağına kıyasla *TP53* (%20), *APC* (%51) mutasyonu gözlenmekle beraber WNT yolağı bozuklukları %93 oranında gözlenmektedir.

CIMP yolağı CIN ve MSI ile bulunabilmektedir ve bu duruma göre anöploidi veya mikrosatellit instabilitesi gözlenmektedir. Seçilmiş 5 CpG adası içinden 3'ünde metilasyon gözlenen CIMP-H, MSI-H KRKler *KRAS* yerine *BRAF* mutasyonu gözlenme sıklığı daha fazla olduğu belirlenmiştir. *P53* mutasyonu sık gözlenmezken, proksimal lokalizasyon ile

ilişkilendirilmiştir (73). Seçilmiş 5 CpG adası içinden 2 veya daha azında metilasyon gözlenen CIMP-L ve MSI-H KRKlerde ise *KRAS* mutasyonu, proksimal kolon ve kötü farklılaşma göstermektedir. Sadece CIMP-H KRK'lerde kötü prognoz, sol kolon ile ilişkilendirilmiştir (73). Bu sınıflandırma çalışmalar arasında farklılık gösterebilmektedir.

Şekil 2.8'de CIN, MSI, CIMP yolaklarının sporadik KRK gelişimindeki etkileri gösterilmiştir. Buna göre, yukarda da anlatıldığı gibi farklı yolaklarda kromozomal boyutlarda, DNA tamir mekanizmasında veya metilasyon sırasında bozukluklar gözlenerek neoplastik durum ortaya çıkmaktadır. Bu durum germline mutasyon olmaksızın somatik mutasyonlar birikiminden olmaktadır.



Şekil 2.8 . Sporadik kolorektal kanser gelişimi ve alt tipleri (Carethes ve arkadaşlarının çiziminden modifiye edilmiştir) (71)

3. KURAMSAL TEMELLER_GENETİK İNCELEME YÖNTEMLERİ

Bu bölümde tez kapsamında kullanılan genetik inceleme yöntemleri özetlenmiştir. Günümüzde, teknolojinin de gelişmesi ile özellikle kompleks hastalıklarda mikrodizin teknolojisi, yeni nesil dizi analizi gibi yöntemler ile tüm genom taranarak GWAS, eQTL gibi farklı bakış açıları kullanılarak hastalık ile ilişkili aday genler belirlenmektedir. Ardından valide edilerek "bench to bed side" olarak hastalık teşhis, tedavi veya önlenmesinde kullanılmaktadır.

3.1. TEKLİ NÜKLEOTİT POLİMORFİZMLERİ (TNP)

Tekli nükleotit polimorfizmleri (TNP) popülasyon içinde bireyler arasındaki farkı yaratan herhangi bir hastalık ile ilişkisi olmayan ortalama 300 nükleotitte bir bulunan genom üzerindeki tekli nükleotit değişimleridir. Sağlıklı bir insanda 3 milyar nükleotit içinde toplamda 1000 genom projesi sonuçlarına göre 38 milyon TNP belirlenmiştir (74). TNP'ler çeşitli fenotip/hastalıklar için biyolojik belirteç olarak kullanılmaktadır. Genelde TNP'ler fenotip gelişimi ile direkt ilişkili olmasa da genin düzenleyici bölgesi ve gen içinde yer aldıklarında katkıda bulunabilmektedirler. İnsan genetiğinde TNP'lerin hastalıkların gelişimi ile ilişkili olmadığı gösterilse de örneğin ilaç direnci, çevresel faktörler ile alınan toksinlerin uzaklaştırılması, hastalık ilişkili genlerin ortaya çıkarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet gibi multifaktöriyel, multigenik hastalıkların genetik ve moleküler düzeyde incelenmesinde kilometre taşı olarak görev yapmaktadırlar (75). TNP'lerin kullanım alanları aşağıda özetlenmiştir.

- Bağlantı analizlerinde hastalık ile TNP ilişkisi sorgulanır. Böylece dolaylı yoldan TNP'nin yakınında bulunan gen veya genlerin hastalık ilişkisi sorgulanmış olur.
- İşaretli TNP'ler (tag TNP'ler) genom üzerinde bir bölge ile bağlantı eşitsizliği gösteren ve o bölgeyi temsil edebilen TNP'lere verilen isimdir. Tag TNP'ler bağlantı analizleri, genom boyu asosiyasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Genom üzerindeki haplotip bloklarının ortaya çıkarılması için yapılmış HapMap projesinde de tag TNP'ler kullanmıştır.
- Kalıtım sırasında birlikte hareket eden TNP'lerin oluşturduğu haplotiplerin genom üzerinde haritalanmasında kullanılır.
- DNA üzerinde belli bir mesafede bulunan ve rekombinasyonun düşük olduğu bu durumlarda bağlantı eşitsizliği (LD) gözlenir. Birlikte kalıtım gösteren 2 noktanın analizinde TNP'ler kullanılır. (76-78).

TNP'lerin tanımlanması ve genomda sık bulunmaları, genomda kararlı bir şekilde dağılım göstermeleri nedenleri ile tercih edilen moleküler belirteçler olmuşlardır. Yüksek işlem hacimli genotipleme yöntemlerinin gelişmesi ile bir defada, bir bireye ait milyonun üzerinde TNP genotiplendirilmekte ve bir anlamda ilgili bireyin genom haritası ortaya koyulabilmektedir. Bu nedenle TNP mikrodizinleri, hem bağlantı hem de asosiyasyon analizi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (79). Bir başka deyişle araştırmacılar kompleks hastalıklarda, hedef genleri aramak için genellikle ilgili genlere yakın olan ve birlikte kalıtılan TNP gruplarını kullanmaktadırlar.

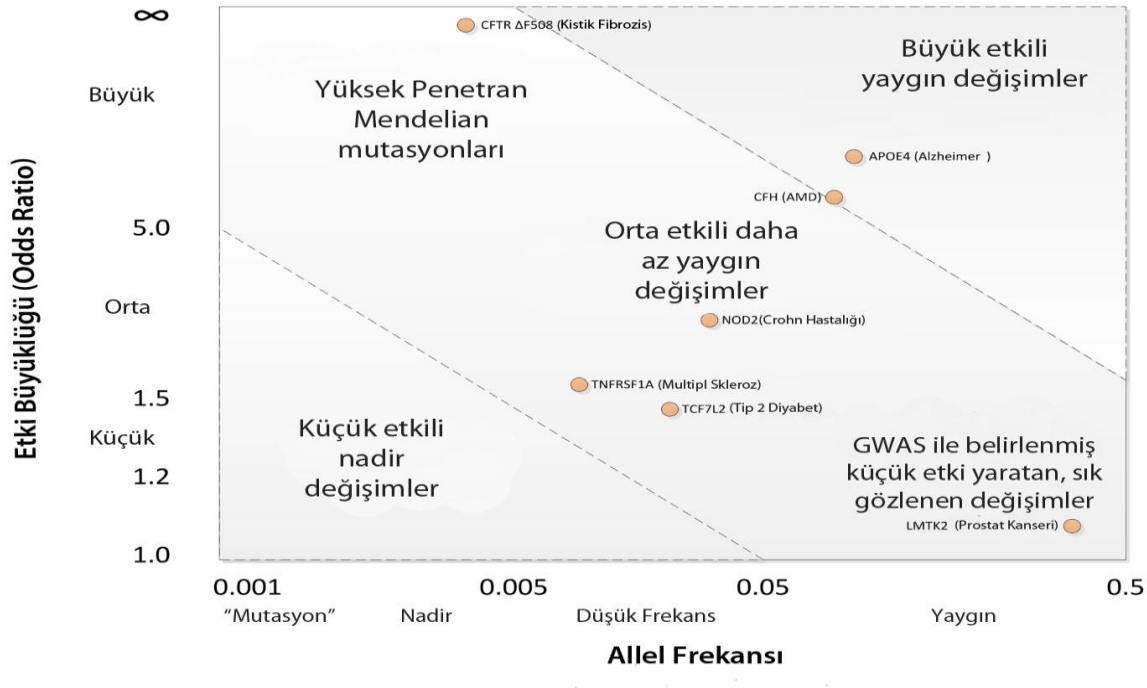
3.2. BAĞLANTI ANALİZİ

Genom üzerinde bulunan iki veya daha fazla noktanın rastgele olmayan birlikteliği bu sebeple oluşan düşük rekombinasyon oranı, bağlantı eşitsizliği (Linkage disequilibrium) ile açıklanmaktadır. Başka bir deyişle, DNA üzerindeki iki veya daha fazla noktanın nesiller arasında rastgele olmayan kalıtımına bağlantı eşitsizliği denir. Bu değişim noktalarının (genelde TNP'ler kullanılmaktadır) oluşturduğu gruba haplotip denir. 1950li yıllardan itibaren genlerin birbirlerine konumlarını ortaya koymak için bağlantı haritaları kullanılmıştır. Bu haritalar fiziksel mesafeleri göstermemekle beraber rekombinasyon miktarı ile beklenen ve gözlenen frekans farkından elde edilen sonuçlar kullanılarak oluşturulmaktadır. Huntington hastalığı, ailesel hiperkolesteromi, kistik fibroz gibi mendeliyen özellik gösteren hastalıkların kalıtım genetiği bağlantı analizi ile ortaya çıkarılmıştır. Dizileme ve genotipleme tekniklerinin gelişmesi ve bilimsel verinin artması ile asosiyasyon çalışmaları yapılmaya başlamıştır (80). 90'lı yılların ortasında mendeliyen olmayan multifaktöriyel hastalıkların aydınlatılmasında asosiyasyon çalışmalarının bağlantı (linkaj) analizinden daha etkili olduğu gösterilmiştir (81). Artık asosiyasyon çalışmaları rutin olarak genom boyutunda yürütülmektedir. Temelde bağlantı analizi ve asosiyasyon çalışmaları rekombinasyonun düşük olduğu noktaların ortaya çıkarılmasına göre yapılsa da iki bakış açısı arasında farklı üstünlükler bulunmaktadır. Şekil 3.1'de genom üzerinde belirlenen TNP sıklıkları ve hastalık üzerine etki düzeyleri gösterilmiştir. GWAS analizlerinde yaygın gözlenen az etkili TNP'ler belirlenmektedir. Bağlantı analizlerinde aile ağaçları kullanılması zorunlu iken asosiyasyon çalışmalarında birbirinden bağımsız topluluklar analiz edilebilmektedir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Bağlantı ve asosiyasyon analizi karşılaştırılması (80)

Haritalama yaklaşımı	**Bağlantı analizi**	**Asosiyasyon analizi**
Veri Tipi	Birbiri ile ilişkili bireyler	Bağımsız veya birbiri ile ilişkili bireyler
Parametre	Rekombinasyon olan bölgeler	Asosiyasyon istatistiği
Tanımlanan bölge	Uzun (<5mb)	Kısa (<100kb)
Genom boyu belirteç sayısı	Orta düzey (500-1000)	Geniş (>100.000)
Kullanılan istatistik	Benzerlik (likelihood) analizi	Klasik istatistik araçları
Yaklaşımın biyolojik temeli	Aile ağacı verisinde rekombinasyon gözlenir	Geçmiş nesillerde gözlenmemiş rekombinasyonu ortaya çıkarır
Allelik heterojenite	Sorun olmaz	Etkiyi düşürür
Genotipleme hatası teşhisi	Mendeliyen uyumsuzluklar teşhis edilir	Sadece Ailesel veride teşhis edilir
En kullanışlı uygulama	Nadir, dominant özellikler	Sık gözlenen özellikler

Yaygın gözlenen hastalıklarda hastalık ile ilişkili değişim noktasının belirlenmesi bağlantı analizleri ve diğer aile temelli yöntemler birlikte kombine edilerek asosiyasyon çalışmaları yapılmaktadır. "Crohn's hastalığı" sorumlu genlerinden *NOD2* geni asosiyasyon çalışmaları ve bu çalışmaların meta analizi ile bulunmuştur. Buna rağmen, yine aynı hastalık sorumlu genlerinden *IL-1* geni bağlantı analizi ile belirlenmiştir. Bugüne kadar yapılmış çalışmalara bakıldığında, asosiyasyon çalışmaları ile bağlantı (linkaj) analizi kombine edilmesi daha doğru sonuçlar vermektedir (82,83).



Şekil 3.1. TNP allel frekansı ve etki düzeyleri karşılaştırılması (Ott ve arkadaşlarının çiziminden modifiye edilmiştir) (80)

Günümüzde aile temelli genom boyu asosiyasyon çalışmalarında (GWAS) işaretli TNP'ler (Tag SNPs) ile bağlantı analizi yapılarak hasta-kontrol bireyler kıyaslanmakta ve hastalık ilişkili TNP'ler ortaya konulmaktadır. Bu işaretli TNP'ler gen içi veya genin düzenleyici bölgesinde ise hastalığa katkıda bulunabilmektedir. Bununla beraber birlikte kalıtılan TNP'ler grubu yani haplotipler hastalık ile ilişkili olabilmektedir. Bir diğer ihtimal ise işaretli TNP'ye yakın olan genlerin hastalık ile ilişkisinin olasılığıdır. (80)

3.3. GENOM BOYU ASOSİYASYON ÇALIŞMALARI

Kompleks hastalıkların araştırılmasında genom boyu asosiyasyon çalışmaları önemli rol oynamaktadır. İnsan genom dizisinin 2003 yılında tam olarak netleştirilmesinden sonra hastalıkların genetik öğelerini inceleyen araştırmalarda patlama olmuştur (84,85). Bunu takiben insan genomik varyasyonlarının tanımlanması amacıyla yapılan projelerden biri olan HapMap projesinde genomun bir bölgesindeki yüksek bağlantı dengesizliğinde (LD) olan tüm TNP'leri temsil eden Tag TNP'lerin gösterildiği genetik varyasyonun tanımlanmasını mümkün kılan haritalar oluşturulmuştur. Bu bilgiler aracılığı ile HapMap projesi, genom boyunca asosiyasyon çalışmalarına yön vermek için gerekli temeli sağlamıştır (74,86)

Genom boyu asosiyasyon çalışması (GWAS) ilk kez 2005 yılında yaşa bağlı makula dejenerasyonu hastalığında ilişkili genlerin ortaya çıkarılmasında kullanılmıştır (87). GWAS analizi TNP'ler kullanılarak klinik durum veya fenotipin moleküler mekanizması ortaya çıkarılmaktadır. Amerikan İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü (NHGRI) GWAS katoloğunda 2586 çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar farklı fenotipler ile istatistiksel anlamlı olarak bulunmuş değişimleri içermektedir (88). Genom boyu asosiyasyon çalışmasının hipotezi hastalık veya varyasyonun ortak genetik etmenler aracılığı ile ortaya çıktığıdır.

Nadir gözlenen hastalıklarda ortak değişimlerin etki düzeyi (penetransı) düşük olabilir. Yani belirlenen ortak değişimler genetik faktör olarak çok nadir ilişkilendirilir. Yaygın gözlenen hastalıklar çoklu allellerin düşük etkileri ile gözlenebilmektedir. Bir başka hipotez ise yaygın gözlenen hastalıklarda hastalık ile ilişkili nadir gözlenen değişimlerin dolaylı olarak sık gözlenen değişimler ile ilişkili olmasıdır. GWAS analizleri dolaylı yoldan nadir gözlenen hastalık ilişkili değişimlerin belirlenmesinde önemli bir bilimsel yaklaşımdır. Bu analizler sık gözlenen işaretli TNP'ler ile haplotip oluşturarak veya tek başına nadir gözlenen değişimlerin ortaya çıkarılmasında kullanılır. Tüm genom dizi analizi teknolojisi öncesinde

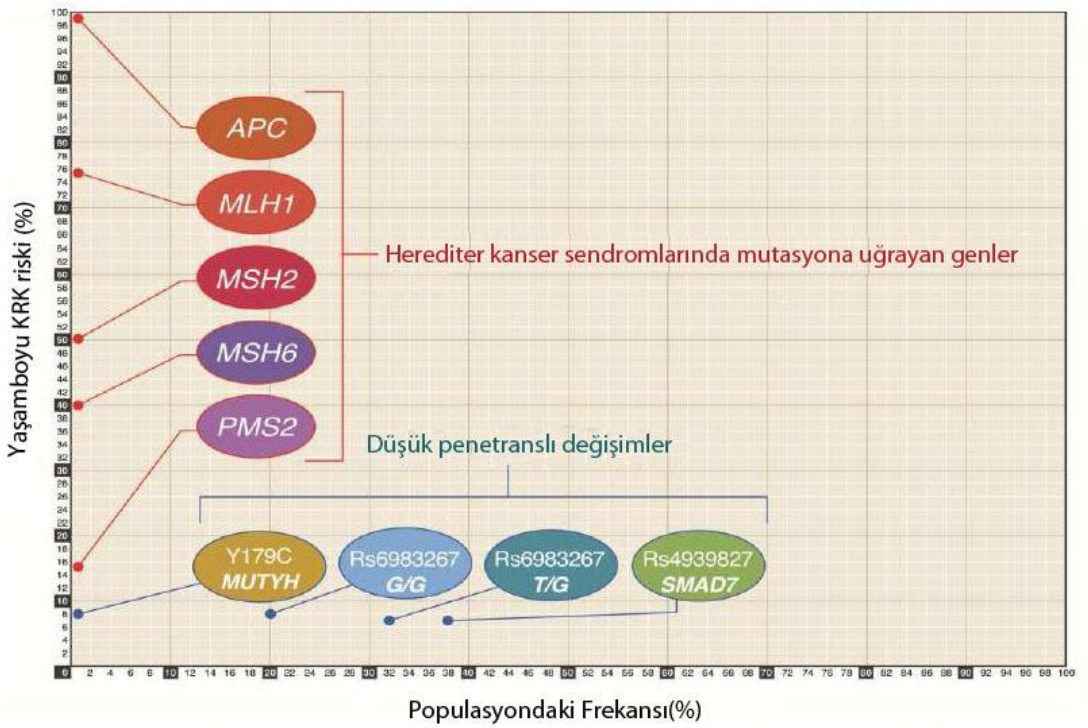
özellikle işaretli TNP'ler ile sınırlandırma ve analizler yapılmaktaydı. Günümüzde her iki teknoloji de kullanılarak GWAS analizleri yapılmaktadır.

Genom boyu asosiyasyon çalışmaları hastalığa yatkınlığın genetik temelinin açığa çıkarılması için güncel strateji olarak kullanılmaktadır (89). Hastalık fenotipi ile hastalığa yatkınlık lokusu arasındaki ilişkinin test edilmesini amaçlayan genom boyu asosiyasyon çalışmalarında, hastalık fenotipi ile asosiyasyon gösteren moleküler belirteç amaca ulaşmada ipucu olarak kullanılmaktadır. Bu sayede hastalık fenotipi ile asosiyasyon gösteren moleküler belirteç ve yüksek LD gösteren lokus hastalığa yatkınlık lokusu olarak tanımlanabilmektedir. TNP'ne çok yakın ikinci bir TNP ile sonraki nesilde birlikte kalıtılır. Bu tesadüfi olmayan birlikteliğe bağlantı dengesizliği (linkage disequilibirum, LD) denmektedir (90).

Kalıtımsal veya ailesel kanserlerde, kanserli bireyin birinci derece akrabasında %50 mutasyon taşıma riskine karşın sporadik kolorektal kanser hastalarında ilgili aday genlerin sayısı ile yüksek frekanslı düşük penetranslı aleller geniş kapsamlıdır (12).

3.3.1. GENOM BOYU ASOSİYASYON ÇALIŞMALARI VE KOLOREKTAL KANSER

Sporadik kolorektal kanser gibi multifaktöryel ve çok basamaklı hastalıklarda düşük penetranslı alleller yatkınlığa katkıda bulunmaktadır. Bu gibi alleller ailelerde seyrek olarak çoklu olgu yaratacağından genetik bağlantı analizleri ile tanımlanamamaktadır. Düşük penetranslı allellerin belirlenmesi hasta ve kontrol gruplarında, allel frekanslarının kıyaslanması ile yapılan asosiyasyon çalışmaları ile mümkün olabilmektedir (91,92) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Düşük frekanslı alleller ve hastalığa yatkınlık genleri (Toland ve arkadaşlarının çiziminden modifiye edilmiştir) (93)

Hardy ve Singleton'ın genom boyu asosiyasyon analizlerini anlattıkları derleme makaleleri genomboyu asosiyasyon çalışmalarının hangi aşamalar dahil edilerek gerçekleştirilmesi gerektiğini çok net bir şekilde açıklamaktadır (3).

Birçok başka kompleks hastalıkta ve çeşitli kanserlerde olduğu gibi kolorektal kanserde de farklı popülasyonlarda GWAS çalışmaları yürütülmüştür. Bugüne kadar yapılan GWAS analizleri ile özellikle 8q24.21 (*MYC*), 18q21.1 (*SMAD7*), 15q13.3 (*GREM1*), 11q23.1, 8q23.3 (*EIF3H*), 10p14, 19q13.11 (*RHPN2*), 20p12.3, 14q22.2 (*BMP4*) ve 16q22.1 (*CDH1*) lokusları belirlenmiştir ($p < 0.05$) (94-96).

Çizelge 3.2. Kolorektal kanserde yapılan GWASlar ve tanımlanan tüm lokuslar

No	Makale	Yıl	Kolorektal Kanser	Kontrol	Popülasyon	Anlamlı bulunan TNP	Genler	Lokasyon	Yazarlar	Dergi
1	Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24.	2007	1257	1336	Kanada	rs10505477, rs6983267	DQ515897, DQ486513	8q24	Zanke BW	Nat Genet
			4024	4042	Kanada, Amerika, İngiltere					
			2199	2401	Fransa, Avrupa					
2	A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk.	2007	627 KRK, 313 adenoma	965	İngiltere	rs4939827	SMAD7	18q21.1	Broderick P	Nat Genet.
			7473	5984						
3	A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21.	2007	930	960	Avrupa	rs6983267	POU5F1	8q24.21	Tomlinson IP	Nat Genet.
			4316	3752						
			1901	1079						
			1072	415						
4	A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3.	2008	627	965	Avrupa	rs10795668, rs16892766	EIF3H	8q24, 15q13, 18q21, 10p14, 8q23.3	Tomlinson IP	Nat Genet
			2873	2871						
			4287	3743						
			10731	10961						
5	Meta-analysis of genome-wide association data id entifies four new susceptibility loci for colorectal cancer.	2008	1902	1929	İngiltere	rs4444235, rs9929218, rs10411210, rs961253	BMP4; CDH1; RHPN2;	14q22.2 16q22.1 19q13.1 20p12.3	COGENT Study	Nat Genet
			4878	4914						
			13406	14012						
6	Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21.	2008	1012	1012	İskoçya	rs3802842, rs7014346, rs4939827	SMAD7, POU5F1P1, HsG57825, DQ515897	11q23, 8q24, 18q21	Tenesa A	Carcinogenesis
			14500	13294	İskoçya, İngiltere, Almanya, İsrail, İspanya, Kanada, Japonya					
7	Colorectal cancer risk is not associated with increased levels of homozygosity in a population from the United Kingdom.	2009	921	929	İngiltere	nope	nope	nope	Spain SL	Cancer Res.
			1214	1435	İngiltere					
8	A genome-wide scan of 10 000 gene-centric variants and colorectal cancer risk.	2009	2873	2871	İngiltere	rs1133950	UTP23 K195Q	8q24.11	Webb E	Eur J Hum Genet.
9	Meta-analysis of three genome-wide association studies identifies susceptibility loci for colorectal cancer at 1q41, 3q26.2, 12q13.13 and 20q13.33.	2010	3334	4628	Avrupa	rs6691170, rs6687758 rs10936599, rs1116955 rs7136702, rs4925386	LARP4, DIP2B, ATF1, LAMA5, MYNN	1q41, 3q26.2, 12q13.13, 20q13.33	Houlston RS	Nat Genet
			18095	20197	Avrupa					
10	Genome-wide association study for colorectal cancer identifies risk polymorphisms in German familial cases and implicates MAPK signalling pathways in disease susceptibility.	2010	371	1263	Almanya	rs12701937, rs6038071, rs11014993	GLI3, INHBA, CSNK2A1, MYO3A	8q24.21 and 11q23	Lascorz J	Carcinogenesis
			4915	5607						
11	Genotype-environment interactions in microsatellite stable/microsatellite instability-low colorectal cancer: results from a genome-wide association study.	2011	1191	999	Kanada, Yeni Zelanda, Avustralya	nope	nope	nope	Figueiredo JC	Cancer Epidemiol Biomarkers Prev
			872	810	Avrupa					
12	Common variant in 6q26-q27 is associated with distal colon cancer in an Asian population	2011	1583	1898	Japonya	rs7758229, rs6983267, rs7837328	SLC22A3, SMAD7	6q26-q27, 8q24	Cui R	Gut
			4809	2973	Japonya, Kore					

13	Evidence of linkage to chromosomes 10p15.3-p15.1, 14q24.3-q31.1 and 9q33.3-q34.3 in non-syndromic colorectal cancer families.	2011	241(53 Aile)	-	Avustralya, İspanya	rs10508218 ,rs10508270	PFKP, PITRM1, KLF6	10p15.3–p15.1	Saunders IW	Eur J Hum Genet.
14	Genome-wide association analyses in east Asians identify new susceptibility loci for colorectal cancer	2012	2098 5358	5749 5922	Doğu Asya	rs647161, rs2423279, rs10774214	CCND2, HAO1, PLCB1, PITX1, CATSPER3, PCBD2, MIR4461, H2AFY	5q31.1, 20p12.3, 12p13.32	Jia WH	Nat.Genet.
15	Association of Caucasian-Identified Variants with Colorectal Cancer Risk in Singapore Chinese	2012	1000	1000	Kuzey ve HonKong Çinlileri	rs6983267, rs6695584, rs11986063, rs3087967, rs2059254, rs7226855, rs827401	EIF3H, UTP23, SMAD 7	8q24.21, 1q41, 8q23.3, 11q23.1, 16q22.1, 18q21.1	Thean LF	Plos One
16	Genome-wide investigation of gene-environment interactions in colorectal cancer.	2012	314 259	- 1002	Almanya	rs1944511	TRIM29	11q23.3	Siegert S	Hum Genet
17	Genome-wide search for gene-gene interactions in colorectal cancer.	2012	8380 2527	10558 2628	Fransa, Almanya, Kanada, Avustralya, Amerika Almanya	rs10795668, rs367615, rs1571218, rs10879357		10p14, 5q21, 20p12.3, 12q21.1	Jiao S	PLoS One
18	Colorectal cancer-susceptibility single-nucleotide polymorphisms in Korean population	2013	105 189	- 190	Kore	rs4939827, rs4779584, rs10795668, rs17051076	SMAD7, CRAC1,	18q21, 15q14, 4q28, 10p14,	Hong SN	J of Gastro and Hepatol
19	Fine-mapping of genome-wide association study-identified risk loci for colorectal cancer in African Americans	2013	1894	4703	Afrikalı Amerikalı	rs12759486, rs7547751, rs7252505	GPATCH1, RP11-815M8.1	19q13.1, 1q41	Wang H	Hum. Mol. Genet.
20	A colorectal cancer genome-wide association study in a Spanish cohort identifies two variants associated with colorectal cancer risk at 1p33 and 8p12	2013	882 1436	473 1780	İspanya	rs12080929, rs11987193	SLC5A9, DUSP4	1p33, 8p12	Fernandez-Rozadilla C	BMC Genomics
21	BMP2/BMP4 colorectal cancer susceptibility loci in northern and southern European populations.	2013	1449 2028	1000 4273	İspanya İspanya, Portekiz, İtalya	rs4444235, rs1957636, rs961253, rs4813802	BMP4, BMP2,	14q22.2, 20p12.3	Fernandez-Rozadilla C	Carcinogenesis.
22	A genome-wide association study on copy-number variation identifies a 11q11 loss as a candidate susceptibility variant for colorectal cancer.	2013	881 1342	667 1874	İspanya	rs1944682	OR4A15	11q11	Fernandez-Rozadilla C	Hum Genet.
23	Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Colorectal Cancer Susceptibility and Loss of Heterozygosity in a Taiwanese Population	2014	705	1802	Tayvan	rs10795668, rs4631962, rs1338565, rs12657484, rs3802842, and rs4444235	FLJ38028 42, CCND2, BMP4, ZNF239, C11orf93	10p14, 10q11.22, 5q31.1, 11q23,	Yang CY	Plos One
24	Genetic ancestry is associated with colorectal adenomas and adenocarcinomas in Latino populations	2014	303-190 adenocarcinomas, 113 sporadic adenomas	243	Kolombiya	678 SNP	valide edilmedi	valide edilmedi	Hernandez-Suarez G1	Eur. J of Hum. Genet.
25	A colorectal cancer susceptibility new variant at 4q26 in the Spanish population identified by genome-wide association analysis.	2014	480 1305	801 2049	İspanya	rs3987, rs1100508, rs8111948, rs10936599, rs10505477, rs6983267, rs3824999, rs4444235	TRAM1L1 and NDST3 GPR37, LINC00662, LINC00906, LINC00587, PRNCR1	4q26, 7q31.33, 19q12, 3q36.2 , 8q24, 8q24.21, 11q13.4, 14q22.2	Real LM	PLoS One

26	Genome-wide association study identifies a new SMAD7 risk variant associated with colorectal cancer risk in East Asians	2014	1773 3612 3290	2642 3,523 4339	Çin, Güney Kore, Japon	rs7229639, rs4939827	SMAD7	18q21.1	Zhang B	Int. Journal of Cancer
27	Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk	2014	2098 3519 2814 6532 14963 11934	6172 6275 11358 8140 31945 28282	Çin, Japonya, Güney Kore Çin Japonya Çin, Japonya, Güney Kore	rs647161, rs10774214, rs2423279, rs7229639	TCF7L2, TGFB1, ZMIZ1, FEN1, FADS1, FADS2	10q22.3, 10q25.2, 11q12.2, 12p13.31, 17p13.3, 19q13.2, 8q24.11, 10q21.1, 10q24.2	Zhang B	Nat.Genet.
28	Trans-ethnic genome-wide association study of colorectal cancer identifies a new susceptibility locus in VTI1A	2014	4521 16,823	8500 18211	Japonya, Afrika Kökenli (Metaanaliz) Avrupa	rs12241008	VTI1A	10q25	Wang H	Nature Communications
29	A novel colorectal cancer risk locus at 4q32.2 identified from an international genome-wide association study.	2014 2014	2462 1131	1497 831	Askenazi Yahudileri, Kanada, Avustralya, Amerika Askenazi Yahudileri	rs35509282	FSTL5	4q32.2	Schmit SL	Carcinogenesis
30	Genetic variations affecting serum carcinoembryonic antigen levels and status of regional lymph nodes in patients with sporadic colorectal cancer from Southern China	2014	- 194	4346 erkek -	Kuzey Çin	rs1047781	FUT2	19q13	Liang Y	PLoS One
31	Genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for colorectal cancer at 5q23.3 and 17q12 in Han Chinese.	2015	932 1759 943	966 1875 1838	Bejing Çinlileri Jiangsu Çinlileri Bejing Çinlileri	rs12522693, rs17836917, rs6983267, rs10795668	CDC42SE2, CHSY3, ASIC2, CCL2	5q23.3, 17q12, 10p14, 8q24.21	Jiang K	Oncotarget
32	Genome-wide association study of colorectal cancer identifies six new susceptibility loci.	2015	18299 4725	19656 9969	Kuzey Amerika, Avustralya, Avrupa Çin, Japonya, Kore	rs35360328, rs812481, rs11190164, rs3184504, rs73208120, rs6066825	CTNNB1, LRIG1, SLC25A28, ENTPD7, COX15, CUTC, ABCC2 , SH2B3, NOS1, PREX1	3p22.1, 3p14.1, 10q24.2, 12q24.12, 12q24.22, 20q13.13	Schumacher FR	Nat Commun.
33	A new GWAS and meta-analysis with 1000Genomes imputation identifies novel risk variants for colorectal cancer	2015	7577	9979	Kanada, Amerika, Avustralya, İngiltere	rs72647484, rs16941835, rs10904849	CDC42, WNT4RP11-58A18.1, CUBN	1p36.2, 16q24.1, 10p13	Al-Tassan NA	Sci Rep
34	A genome wide association study on Newfoundland colorectal cancer patients' survival outcomes.	2015	431	-	Kanada	rs17057166, rs17026425	AC011343.1, LINC01121, JUN/JUND	2p21, 19p13.2	Xu W	Biomark Res
35	A genome-wide association study for colorectal cancer identifies a risk locus in 14q23.1.	2015	16517 1894 22627	14487 4703 3797	Avrupa Afrika Japonya	rs17094983	RTN1	14q23.1	Lemire M	Human Genetics
36	Genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for colorectal cancer at 5q23.3 and 17q12 in Han Chinese.	2015	932 1759 943	966 1875 1838	Han Çinlileri	rs12522693, rs17836917, rs6983267, rs10795668	CDC42SE2, CHSY3, ASIC2, CCL2	5q23.3, 17q12, 8q24.21, 10p14	Jiang K	Oncotarget.
37	Common genetic variation and survival after colorectal cancer diagnosis: a genome-wide analysis.	2016	3494	-	Avrupa	rs209489	ELOVL5	6p12.1	Phipps AI	Carcinogenesis.

Sporadik kolorektal kanser ileri yaş (late onset) hastalığı olduğu için genelde popülasyon temelli çalışmalar yapılmaktadır. Ancak bu yöntem kullanılırken popülasyon stratifikasyonu olması, homojen grup oluşturma güçlüğü nedeni ile oluşan arka plan kirliliğini gidermek için örneklem boyutu geniş tutulmalıdır (Çizelge 3.2). Aile temelli yöntemin avantajı daha homojen gruplar oluşturulabilmesi ve küçük örneklem boyutunun toplumu temsil edebilmesidir. Ancak geç dönem hastalığı olması nedeni ile sağlıklı anne-baba, hasta çocuk üçlüsünden oluşan hasta-kontrol grubunun toplanması güçlüğü vardır. Türkiye şartlarında ekonomik ve lojistik olarak popülasyon temelli çalışmaların gerçekleştirilme güçlüğü ekibimiz tarafından yürütülmüş olan araştırmada aile temelli GWAS'ın kullanımını zorunlu kılmıştır. 2007-2011 yılları arasında grubumuz tarafından yürütülen projede 51 trio kullanarak yine aynı projede geliştirilmiş SPRT analizi ile güvenilir sonuç alınabilir hale gelmiştir (97).

3.3.2. POPÜLASYON STRATİFİKASYONU (POPÜLASYON KAYMASI) VE ASOSİYASYON ÇALIŞMALARI

Asosiyasyon çalışmaları hastalık veya fenotip ilişkili kromozomal bölgelerin belirlenmesinde güçlü bir tekniktir (81). Temelde etkilenmiş bireylerde, kontrol bireylere göre sık gözlenen alleller ve dolayısı ile genomik bölgeler aranır. İstatistiksel anlamlı olarak belirlenen fenotip ile ilişkili bulunmuş TNP ve dolayısı ile ilişkili bölge fiziksel olarak bağlantılıdır (98).

Yapılan çalışmalarda farklı etnik gruplarda rastgele belirlenmiş TNP'lere özgü allel frekansının farklılık gösterebildiği belirlenmiştir (99). Bu durum popülasyon stratifikasyonu olarak isimlendirilmektedir. Popülasyon stratifikasyonu popülasyon içindeki alt popülasyonlar arasında genomik ve allel frekansı farkı gözlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Temelde bu durum sosyolojik, kültürel, coğrafik bariyerler nedeni ile oluşan rastgele olmayan eşleşmeler sebebiyle gerçekleşmektedir ve belli allelerin seçilimi, genetik kayma ile sonuçlanmaktadır (100).

Gen haritalama çalışmaları, asosiyasyon çalışmaları gibi genom boyu analiz yöntemlerine hasta-kontrol grupları farklı etnik gruplardan seçildiğinde genom üzerinde yer alan birçok bölgede farklı allel frekansı belirlenebilir. Bu durum da hastalığı temsil eden TNP'lerin ayrıştırılmasını güçleştirmektedir. Eğer hasta-kontrol birbiri ile uyuşan-paralel gruptan seçilirse hastalık ilişkili istatistiksel anlamlı TNP ve allel frekansı etnik farklılık elimine

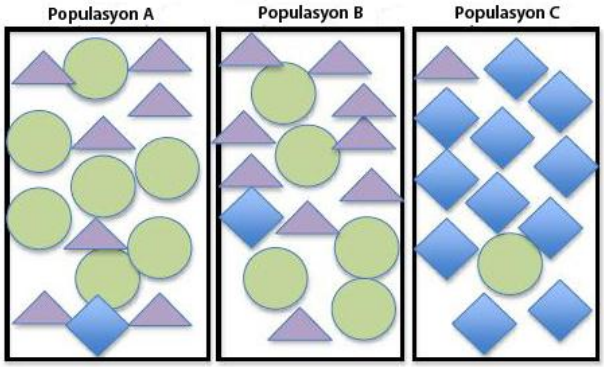
edilmiş olarak daha güvenilir belirlenmiş olur. Asosiyasyon çalışmasında hasta-kontrol grubunun oluşturulması bu farklılık dikkate alınarak oluşturulsa da stratifikasyon elimine edilmiş sayılmaz. Bu durum popülasyon ilişkili TNP'lerin incelenmesi ile kontrol edilir. Eğer stratifikasyon var ise normalde hastalık ilişkili olmayan TNP'ler anlamlı gibi gözlenebilir. Sonuçta popülasyon stratifikasyonu gösteren TNP'lerin eliminasyonu ile istatistiksel anlamlı TNP ve genomik bölgeler gösterilmiş olur (99,101). Temel bileşen analizi (PCA) ve atasal geçmiş ilişkili belirteçlerin gösterildiği Fiksasyon indeksi (Fst) popülasyon stratifikasyonu belirlenmesi için kullanılmaktadır (101).

3.3.2.1. Atasal Bilgi Veren (Ancestry Informative) Belirteçlerin (AIB) Belirlenmesi (Fiksasyon İndeksi -Fst)

Fst indeksi, popülasyonlar arasındaki genetik uzaklığı ortaya çıkarmak için yani genetik varyansın ortaya çıkarılması için kullanılmaktadır (102). Aşağıdaki şekilde 3 farklı popülasyonda atasal genler üzerinden Fst indeksi hesaplandığını varsayalım.

Şekil 3.3'da her bir figür farklı genotipi simgelemektedir. Hardy-Weinberg (HW) dengesi Matlab yazılımında değerlendirilmiştir. Popülasyon kayması (*admixture*) oranları Wright's F istatistiği (F_{ST}) ve 'Informativeness for assignment measure' (I_n) kullanılarak AIB'lerin belirlenmesi için kullanılmıştır.(103-105). Fst değeri 0-1 arasında hesaplanmaktadır."0" iki gen havuzunun birbiriyle tamamen aynı olduğunu , "1" ise iki gen havuzunun tamamen farklı olduğunu, ortak allel paylaşmadığını ifade etmektedir (106,107).

Bu tez çalışmasında, Fst analizi coğrafik olarak stratifikasyona neden olabilecek TNP'leri elimine etmek için kullanılmıştır. Böylece bölgesel farklılıklar elimine edilerek, Türk toplumunu temsil ettiği düşünülen hastalık ile ilişkili TNP'ler belirlenmiş olmuştur.



Şekil 3.3. Fst indeksi hesaplanacak 3 farklı popülasyon (107)

3.4. YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİ

Teknolojinin gelişimi ile birlikte her alanda olduğu gibi moleküler genetikte de veri birikimi ivmeli bir şekilde artmaktadır. 1988 yılında başlayan tek bir bireyin dizilenmesini içeren "insan genom projesi" Sanger metodu kullanılarak ancak 2003 yılında yüksek bir bütçe ile tamamlanabilmişti. "Yeni nesil dizi analizi" teknolojinin de gelişmesi ile dizi analizi maliyetini ve harcanan sürenin azaltılmasını hedefleyerek ilk kez 2003 yılında Roche markası altında geliştirilmiştir. Günümüze kadar bu teknoloji gelişmiş, tüm genom analizi 1000 dolar civarına, saatler düzeyine indirilmiştir. Bu maliyetin ilerleyen yıllarda 100 dolara düşmesi beklenmektedir. Aşağıda farklı markalar altında geliştirilmiş farklı teknolojilerin karşılaştırılmalı çizelgesi bulunmaktadır (Çizelge 3.3). Farklı markaların farklı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. İon Torrent PGM, PacBio RS, Illumina MiSeq gibi platformlar maliyeti yüksek olduğundan ve çalışmamızda süre kısıtlaması bulunmadığından kullanılmamıştır. Bunun yerine fiyat-okuma kalite ikilisi göz önünde bulundurularak Illimuna Hiseq 2000 platformu ile hizmet alımı 4 hastada yaptırılmıştır. Fiyat-süre-okuma kalitesi gibi yeni nesil dizi analizi cihaz-teknik karşılaştırılması aşağıdaki çizelgede ayrıntılı olarak verilmiştir (Çizelge 3.3).

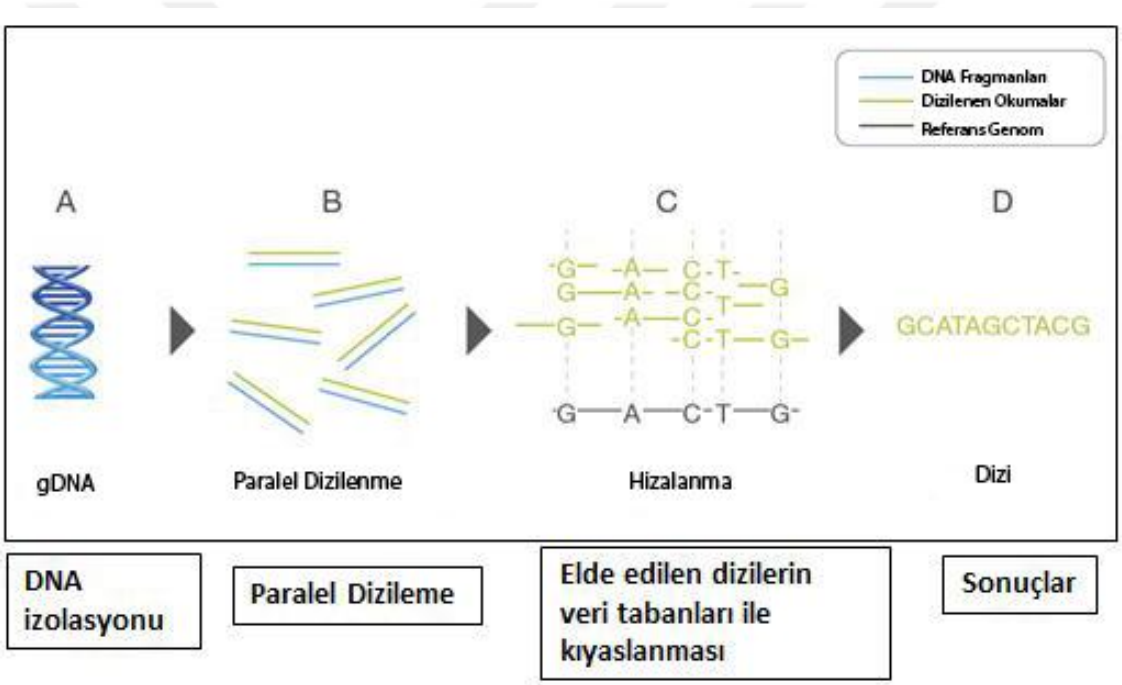
Çizelge 3.3 Yeni nesil dizi analizi cihaz ve teknikleri karşılaştırması (108)

Platform	Roche/454's GS FLX Titanium XL	Ion Torrent PGM	PacBio RS	Illumina HiSeq 2000	Illumina MiSeq	Ilumina NextSeq 500	Illumina HiSeq X10
Cihazın fiyatı	$ 500 K	$80 K	$695 K	$654 K	$128 K	$250 K	$10 milyon
Çalışma başına elde edilen ürün	700Mb	20–50Mb 314çip, 100–200Mb 316 çip, 1 Gb 318 çip	100 Mb	600 Gb	1.5–2 Gb	120 Gb	1.6–1.8 Tb
Gb başına fiyat	NA	$1000 (318 çip)	$2,000	$41	$502	$40	$10
Çalışma süresi	10 saat	2 h	2 saat	11 gün	27 saat	30 saat	<3 gün
Rapor edilmiş Kalite Skoru	NA	Q20	<Q10	>Q30	>Q30	>Q30	>Q30
Gözlenen ham veri hata oranı	1%	1.71%	12.86%	0.26%	0.80%	0.80%	0.50%
Okuma uzunluğu	800 baz	~200 baz	Ortalama 1500 baz	150 baza kadar	150 baza kadar	2×150 baz	2×150 baz
Paired reads*	hayır	evet	hayır	evet	evet	evet	evet
Gerekli gDNA miktarı	500ng	100–1000 ng	1000 ng	50–1000 ng	50–1000 ng	50–1000 ng	50–1000 ng
NGS teknolojisi sınıflandırması	1	2	3	2	2	2	2
Örnek hazırlanması	EmPCR	EmPCR	TMA	KA	KA	KA	KA
DNA dizi methodu	Pyrodizileme	İOS	RT	SD	SD	SD	SD

EmPCR: Emülsiyon PCR, KA: Köprü amplifikasyonu-Klonal amplifikasyon, TMA:Tek molekül amplifikasyonu, İOS: İon semikonduktör, RT:Eş zamanlı dizileme, SD: Sentezleyerek dizileme

3.4.1. ILLUMİNA GENOM ANALİZ SİSTEMİ

Prensip olarak Illumina genom analiz sistemi Sanger Metoduna benzemektedir. Buna göre, 100 bazlık parçalara ayrılan genomik DNA (gDNA) denatüre edilir ve kalıp ipliğe göre, yarışmacı ortamda floresan ışıma veren dATP, dGTP, dCTP, dTTP nükleotitler ile muamele edilir. Böylece, diziye uygun olan nükleotit bağlanır ve bu sırada floresan ışıma verir. Işıma lazer tarafından yakalanır. Bu şekilde, tüm genom veya analiz edilecek bölge milyonlarca kere tekrar edilerek analiz yapılır. Dizileme işlemi sonrasında biyoinformatik analiz büyük önem arz etmektedir. Özellikle, tüm genomun analizi büyük veri yumağında zorluk göstermektedir. Ancak, nispeten 1Mb'lık bir bölgenin analizi daha kolay sonuç alınabilmesini sağlayacaktır (109) (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Yeni Nesil DNA Dizi Analiz Sistemi genel şeması

İnsan genom projesinin tamamlanması postgenomik alanın başlangıcı olmuş ve sistem biyolojisi yaklaşımı büyük önem kazanmıştır. İnsan genomundaki hücresel hemostaz, gelişim ve hastalık ilerleyişi ile ilişkili düzenleyici ağlar (regülatör network) ve bu ağlarda rol oynayan fonksiyonel elementler tanımlanmaya başlanmıştır. Hücresel aktiviteleri düzenleyen genomdaki bu fonksiyonel elementlerin belirlenmesi ve bunların popülasyonlar arasındaki varyasyonları kişiye özgü tedavinin geliştirilmesine de temel oluşturur. Son yıllarda geliştirilen yeni nesil dizileme teknolojisi, genetik/epigenetik düzenleyici ağların, kromatin yapısı, nükleer yapılanma ve genom varyasyonları (çeşitliliği) hakkında bilgi üretimini sağlayan önemli bir araç olmuştur.

Yeni nesil dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukla, ultra hızlı olarak, dizileme yapılabilmektedir. Bu yöntemle elde edilen bir mikrobiyal genom dizisi araştırmacılara başka hiçbir deneysel yöntem ile elde edilemeyecek kadar zengin ve özgün bilgi sağlamaktadır. Örneğin 4.6 Mb'lık E. coli genomu tek bir okuma ile tamamlanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada E. coli genomu dört kere, her bir koşmada 400.000 okuma yapılarak de novo dizilenmiş ve sekanslamalanın %99.997 ila %99.999 arasında doğrulukla yapıldığı tespit edilmiştir (110-112). Yeni nesil dizileme teknolojisi hayal bile edilemeyecek kadar çok bilgi ve yeni yaklaşımlar sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında Illimuna genom analiz sistemi kullanılmıştır.

3.4.2. HEDEFE YÖNELİK DNA DİZİ ANALİZİ

Hedefe yönelik DNA dizi analizinde, tüm genom dizi analizi ile temelde aynı yol izlense de hedef bölge dizi analizindeki en önemli farklardan biri daha az maliyetli olmasıdır. Tüm genom yerine bölgeye özgü primerler ile alan sınırlandırılmaktadır.

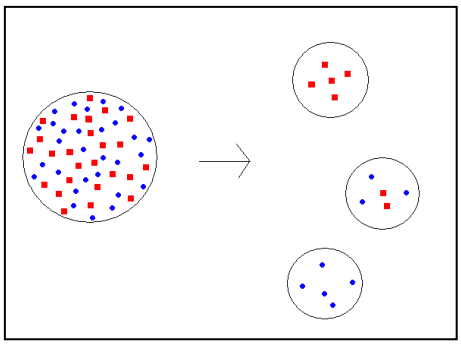
4. KURAMSAL TEMELLER_KURUCU ETKİSİ (FOUNDER EFFECT) BELİRLENDİĞİ DÜŞÜNÜLEN GEN BÖLGESİNİN İNCELENMESİ

Bu tez çalışması kapsamına alınmış yine grubumuz tarafından yapılmış aile temelli GWAS ile sporadik kolorektal ile ilişkilendirilmiş 6 hastada homozigot bloklar gözlenmesi ile kurucu etkisi belirlendiği düşünülen 3p22.3 (35565537-35941124) kromozomal bölge incelenmiştir. Bu bölge 1 mikroRNA (miRNA) ve 2 geni içermektedir (Şekil 7.7). Bu kısımda kurucu etkisi ve bahsedilen bölge hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir.

4.1. KURUCU ETKİSİ (FOUNDER EFFECT)

Popülasyon genetiğinde, kurucu etkisi geniş bir popülasyondan ayrılan yeni küçük toplulukta genetik farklılığın, değişikliğin kaybı olarak isimlendirilmektedir. İlk kez 1942 yılında Sewall Wright'ın teorisini geliştirerek Ernst Mayr tarafından kullanılmıştır. Genetik farklılığın kaybı ile yeni popülasyonda genotipik ve fenotipik bakımdan belirgin bir şekilde atasal toplumdan farklılaştığı ve kendi içinde birbirine benzediği gözlenmektedir. Ekstrem koşullarda, kurucu etkisi yeni türlerin oluşmasında ve türlerin evrimleşmesine neden olmaktadır (113,114).

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere, atasal popülasyonda mavi ve kırmızı bireyler neredeyse eşit sayıda bulunmaktadır. Rastgele örnekleme sonucu oluşturulan üç küçük popülasyonda ise, iki renkten birisi baskın şekilde bulunmaktadır yani kurucu etkisi gözlenmektedir. Popülasyonun maruz kaldığı darboğaz (botteneck) etkisi kesin suretle olmasa da yine kurucu etki ile sonuçlanabilmektedir.



Şekil 4.1. Kurucu Etkisi şekilsel anlatımı

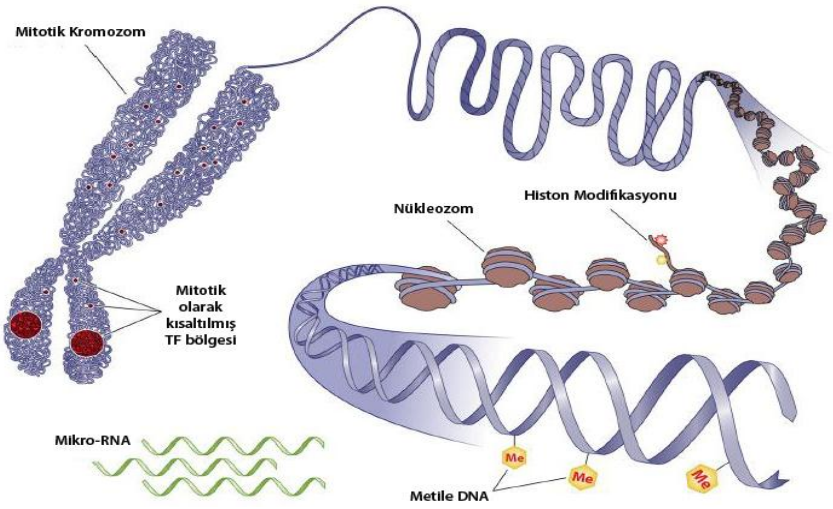
Kurucu etkisi, geniş popülasyonu temsil edemeyecek sayıda birey içeren, yeni bir araya gelmiş, gelişmekte olan küçük göçmen toplumlarda gözlenmektedir. Bu yeni popülasyonda kurucu etkisine ek olarak, genelde küçük bir popülasyondan ibarettir ve genetik kayma

durumuna hassasiyet gösterir, akraba evliliği artışı gözlenir ve genetik farklılaşma azalır. Sınırlı gen havuzu olan ada toplumlarında, kapalı toplumlarda veya koloni dönemlerinde bir bölgeye sınırlı sayıda göçmen gönderilmesi sonucu gözlenmektedir. Buna örnek olarak Martha's Vineyard" adası verilebilir. Amerika'nın Güneydoğusunda yer alan 1642 yılında İngiltere'den göç alan "Martha's Vineyard" adasında 19. yüzyılda kalıtımsal sağırlık ana karada %20 iken bu ada toplumunda %65 olması ile kendini göstermiştir (115,116).

4.2. EPİGENETİK VE MİRNA

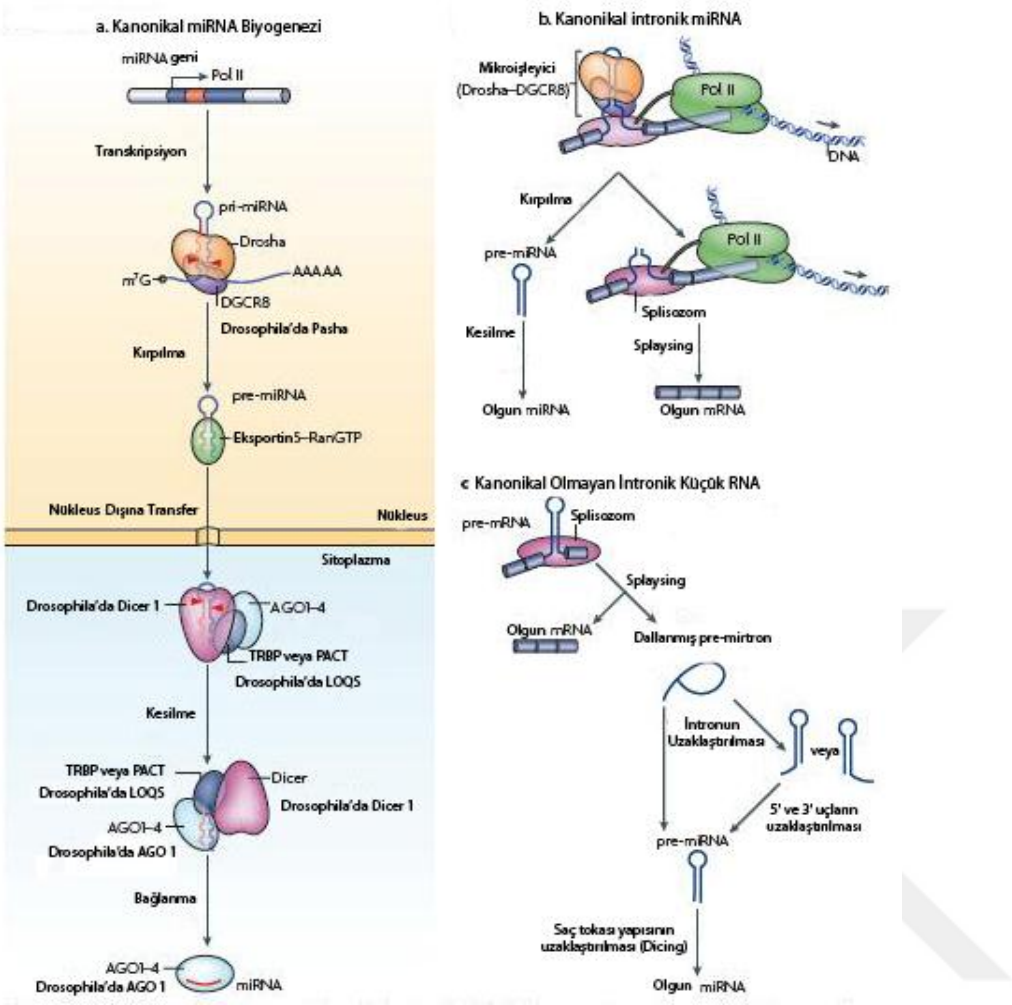
Genotipte herhangi bir değişim olmadan fenotipe yansıyan değişiklikler epigenetik değişimler olarak isimlendirilmektedir. Memeli gen ifadelenmesi genetik ve epigenetik mekanizmalar tarafından sağlanmaktadır. Histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve kodlanmayan RNA temelli gen ifade düzeyi değişimleri iyi tanımlanmış epigenetik mekanizmalardandır. Bunlardan bazıları kalıtım ile sonraki nesillere geçebilmektedir. Mitotik kromozomdaki transkripsyonel regülasyon makinesi ile hedef gen arasındaki etkileşim son zamanlarda ortaya çıkarılmış epigenetik mekanizmasıdır. Bu mekanizma büyüme, proliferasyon, neslin devamı için gerekli düzenlemeleri sağlamaktadır (117).

Epigenetik mekanizmalar içerisinde gen ifade düzeyini etkileyen küçük RNA'larda yer almaktadır. Bunlardan, mikroRNA'lar (miRNA) günümüzde birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Epigenetik mekanizmalar Şekil 4.2'de özetlenmiştir.



Şekil 4.2. Epigenetik mekanizmalar

mikroRNA'lar, tek iplikli yaklaşık 22nt uzunluğunda, post transkripsyonel regülasyon sırasında gen ifade düzeyinin belirlenmesinde görev alan diziye özgü çalışan kodlanmayan RNAlardır (118). miRNA biyogenezi Şekil 4.3'de özetlenmiştir.



Şekil 4.3. miRNA biyogenezi (119)

Mikro-RNA'ların vaskülogenez, anjiogenez, lenfopoesiz, bağışıklık sistemi, kardiyogenez, iskelet ve kas oluşumu, nörogenez ve nörogenetik hastalıklar, boşaltım sistemi, karaciğer üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle tedavi amaçlı olarak araştırma odakları arasında yer almaktadır (120,121). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, kanser gibi hastalık ile ilişkili ifade düzeyi değişimlerinin miRNA genleri ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (122). miRNA'ların ifade düzeyini artırıp, azaltmak suretiyle tümör supressör veya onkogen fonksiyonu olduğu gösterilmiştir (123).

4.3. MİKRORNALAR VE KANSER

Olgun miRNA'lar tipik olarak tümörigenezde, inflamasyonda, hücre döngüsünde, stress yanıtında, farklılaşmada, apoptosizde, invazyonda rol alan genler de dâhil olmak üzere RNA stabilitesini azaltmaktadır. miRNA'nın gelişimdeki rolü gösterildikten sonra tümörigenezdeki öneminin ortaya çıkarılması çok sürmemiştir. 2002 yılından itibaren

biyomedikal yayınları içeren PubMed veritabanında "kanser ve miRNA" ile ilişkili 4000 derleme olmak üzere toplamda 24.000 yayın bulunmaktadır (Eylül 2016).

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi kolorektal kanserde (KRK) de 2000li yılların başından itibaren hastalık başlangıcı ve gelişiminde fonksiyonel etkili olan mikroRNA'lar (miRNA'lar) gösterilmiştir (124). Hücresel çevreye göre miRNAlar onkogen veya tümör baskılayıcı olarak görev yapabilmektedir

KRK teşhis, hastalığın gelişimi ve tedavi aşamasında bu belirteçler kullanılabilmektedir. Hastalık ile ilişkilendirilmiş TNP'ler, fekal ve sirkülasyonda yer alan miRNA'ların girişimsel olmayan –*non-invaziv*- erken teşhis için biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Bu bilgiler eşliğinde kurucu etkisi belirlendiği düşünülen gen bölgesinde yer alan mir-128-2 gen bölgesinde ileri analizler yapılmıştır.

4.4. MİR-128-2 (MIR-128-2-201, MİR-128B, HSA-MİR-128B)

3p22.3'de lokalize olan bu gen, 84bp'dan oluşmakta, 1 ekzon ve 1 transkripti vardır. Kodlanmayan RNA'lardan miRNA sınıfında bulunmaktadır. miRBASE veritabanına göre mir-128-2a ve mir-128-2b farklı varyantı bulunmaktadır.

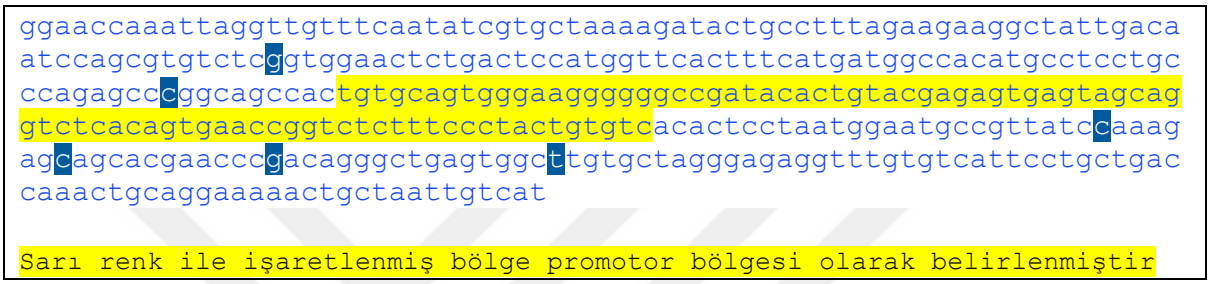
Bazı kanser tiplerinde –nöroblastoma (125), glioblastoma (126), prostat kanser (127), akciğer kanseri (128)ve MLL-AF4 Akut lenfosittik lösemi (129)- miR-128 ifade düzeyinin azaldığı gösterilmiştir. 3p22.3'de yer alan miR-128-2 trasnkripti nöroblastoma ve akciğer kanserinde tamamen kaybolmuştur (125,128). Daha önce yapılan çalışmalara göre, potansiyel 20 antiproliferatif/pro-apoptotik mir-128 gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalar, mir-128'in tümör baskılayıcı görevi olduğunu göstermekle beraber tam olarak mekanizma açıklanamamıştır (130). miR-128-2 mikroRNA'sının gen içi ve genler arası promotorlarının yer aldığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Aşağıda ayrıntılı bilgi verilmiştir. Monteys ve arkadaşları tarafından belirlenen *miR-128-2* promotor bölgesi Şekil 4.4'de sarı ile gösterilmiştir.

ttgaagagagtgcttcctctgttcttaaggctagggaaccaaattaggttgtttcaatatcgtgct
aaaagatactgcctttagaagaaggctattgacaatccagcgtgtctcggtggaactctgactcca
tggttcactttcatgatggccacatgcctcctgcccagagccggcagccacTGTGCAGTGGGAAG
GGGGGCCGATACACTGTACGAGAGTGAGTAGCAGGTCTCACAGTGAACCGGTCTCTTTCCCTACTG
TGTCacac

Sarı renk ile işaretlenmiş bölge promotor bölgesi olarak belirlenmiştir

Şekil 4.4. miR-128-2 promotor bölgesi (131)

Öncü mir-128-2 (pre-miR-128-2)'nın mutant p53 ile etkileştiği dolayısıyla p53'ün miR-128-2 ifadesini daha transkripsiyon düzeyinde kontrol ettiği düşünülmektedir (132). Aynı zamanda miR-128-2 miRNA gen bölgesinin *ARPP-21* geni 19. intronunda aşağıda da verildiği gibi tamamen eşleşme gösterdiği bilinmektedir. Bu durum da gen içi (intragenik) miRNA olduğunu göstermektedir (133). miR-128-2 ve *ARPP-21* geni *p53* geninin tarafından düzenlendiği, bu 3 elemanın transkripsiyonel regülasyon mekanizmasında ortak yolakta yer aldığını göstermektedir. Ayrıntılı bilgi tezin "*ARPP-21* geni ve miR-128-2 etkileşimi" kısmında verilmiştir.


ggaaccaaattaggttgtttcaatatcgtgctaaaagatactgcctttagaagaaggctattgaca
atccagcgtgtctcggtggaactctgactccatggttcactttcatgatggccacatgcctcctgc
ccagagcccggcagccactgtgcagtgggaagggggccgatacactgtacgagagtgagtagcag
gtctcacagtgaaccggtctctttccctactgtgtcacactcctaatggaatgccgttatccaaag
agcagcacgaacccgacagggctgagtggcttgtgctagggagaggtttgtgtcattcctgctgac
caaactgcaggaaaaactgctaattgtcat

Sarı renk ile işaretlenmiş bölge promotor bölgesi olarak belirlenmiştir

Şekil 4.5. Gen içi miR-128-2'nın *ARPP-21* geni 19. ıntronunda yer alan promotor bölgesi (132)

4.5. ARPP-21 (CAMP-REGULATED PHOSPHOPROTEİN)

cAMP-düzenleyici fosfoprotein olan *ARPP-21* geni, 3p24.3 lokalizedir. 21KDa boyutunda olan bu protein 20 ekzon tarafından kodlanmaktadır ve 37 ayıklama varyantı bulunmaktadır. Kalmodulin regülasyonu sinyal yolağında görev yapan bu protein, orta çatallı nöron hücresel iletişiminde anahtar nörotransmitter olarak yer almaktadır. *ARPP-21* geni, kalmodulin-bağlanma protein regülatörü (RCS) şeklinde bu yolakta düzenleyici olarak görev almaktadır. Bu protein, protein kinaz A'yı aktive ederek kalmodulin yolağının inhibisyonunu sağlar. Bu proteinde mutasyon olması, fosforilasyonu durduracağından ters yönde etki gözlenmektedir (134).

ARPP-21 geni, Genomatix veritabanı kullanılarak analiz edildiğinde "Kurucu Etkisi" belirlendiği düşünülen gen bölgesinde daha önce promotor olarak belirlenmiş bölgeler ve promotor dizisi taşıyan dolayısıyla promotor olma ihtimali olan diziler belirlenmiştir. Bu bölgeler Şekil 4.7'de sarı ile gösterilmiştir. Sarı ile gösterilen bölgeler genel olarak *ARPP-21* gen bölgesi içinde toplanmıştır. Donzelli ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu çalışmaya göre, *ARPP-21* geninin önemli bir tümör baskılayıcı ve transkripsiyon faktörü

olan *p53* geni ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir. Bu durum farklı transktripsiyon faktörleri bağlanma noktası olabileceğini de düşündürmüştür.

Bu sebeple, önceki çalışmamızda 6 ayrı hastada birden kurucu etkisi belirlendiği düşünülen bu gen bölgesinde yer alan promotor dizileri veya aday promotor dizilerinin incelenmesinin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

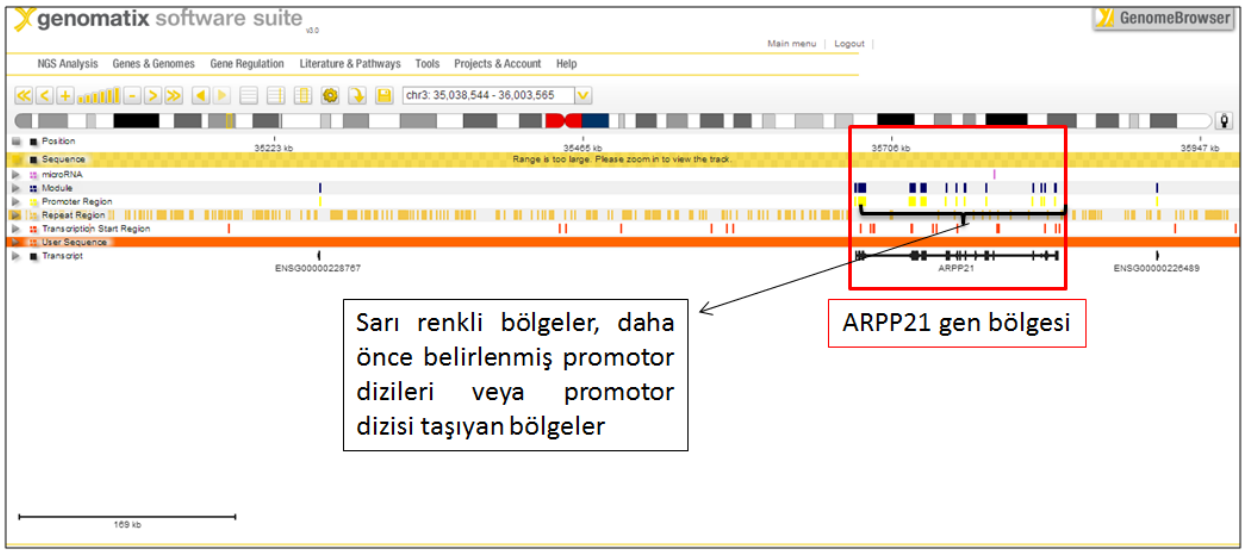
Bu amaçla, bu bölgenin de dâhil olduğu bir deney tasarlanarak 6 hastada yeni nesil DNA dizi analizi planlanmıştır. Yapılan literatür araştırmasında hedefimize ulaşmamız için kodlanan bölgeler dışında geriye kalan *ARPP-21* geni 5', 3' regülatör bölgeleri ve intronik kısımlarının da analiz edilmesi gerektiği görülmüştür.

Özellikle *ARPP-21* geni Genomatix veritabanı incelendiğinde daha önce belirlenmiş veya aday olduğu düşünülen birçok promotor bölgesi belirlenmiştir. Şekil 4.7'de Genomatix veritabanından elde edilen bu bölgelerin ayrıntılı bilgisi verilmiştir. Şekil 4.6'de *ARPP-21* geni bilinen promotor bölgesi verilmiştir.

tttagagtacagatattcattttaatctttgatttctttaagtttttgatgtttgattttctacc
agtatgacactcagcctctcaaaacaagaaggacattccccaaagttgaaatgaatctgtataaga
tttcattcaaatgcagaataaattcaaatgattcctaacccctcctcatctactttggagataaaa
actgctatgattgttttaagtaaacagagaagtggagatgacaggaaatcatttttcatttgttaa
aaatcagaaaacctttgacacacttttagataaatacacctactcctttgatcctttgtgtatgta
ttaccacagggcttaaatatcttaagattttagttaatgtcattttcatgaaagacagtcatttgg
aagccaagagctctatctatgttttgttcaaatagccgagtaatctactatcttggcagtaattac
ttctgctgcatttctaatgtgaattgcatgtgagagcttatgaatacactcttttcaagtgtatgt
gggttttcaaggtatgtatttgtgtttgatcctatatttcctttgttataacattctgcttttcat
cactttgacagaatatttgtaaattttctggagagtgagtttgggtatatgctttgaggaatatgc
ttcctcattacaaaagatatggaaacataattgattactacacttgcttatcaatagtattttgat
tttgtttaaatgaaatgtttaagatacgtggattgctatgcattcatgttttagatttatcctctc
caggcatgatttatgccattcaataattaaaataactaagttactttagaaaaagtgcctattaaa
cagagtactttgtttagaggacgtatatttaaataaacttatacagctaaagaaactgactttcac
ttcctcagtgacttaatttcactacatgctgatttgtcctttgcagtatttagctcagaccaagac
agaattgtatGTGCTATTAGATTTGCAAATTGCTGATCTCCCAGTGACTTTCCCTCTTAGATCCCA
GTTGAGTATGGTTACCTTGAGAACTGTGGTATTAGCCATGTTAGAGCATGCTCCACTGGGGAGTTC
TGTGCAGTCTATTTTTAATGCTATTTAATGAAGGAGCGAGCGCCTCACTCAGCAATAAAAGAAGCA
TGAGGGAAGACAGAGCAGTGCATGGTTATGGATACTGGACAAGGATATTTGGAAAGgtaaaggctg
accattggatatggtaattttaattaagtcctaatatatcatatgaatggaaatatggatttttgt
tagagaattatacatgaatagttcaataggtgttttcgtaaacctcttcactagttcttagaaaga
agactcaataatttgagtttttaaaacttgagggacat

Sarı renk ile işaretlenmiş bölge promotor bölgesi olarak belirlenmiştir
(ARPP-21 Promoter Reporter (S700257) Human promoter reporter construct: transfection

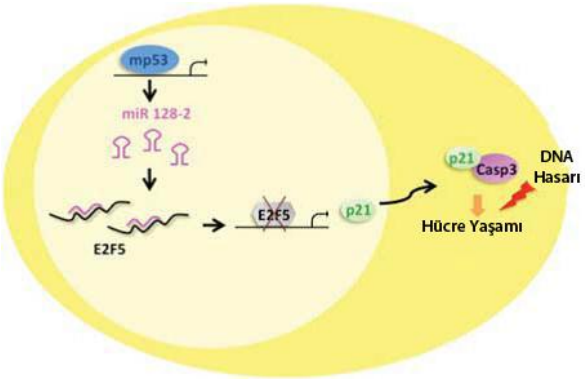
Şekil 4.6. ARPP-21 promotor bölgesi (Swich Gear Genomics) ARPP-21 promotor bölgesi (Swich Gear Genomics)



Şekil 4.7. Kurucu etkisi belirlendiği düşünülen tüm bölgenin promotor analiz programında analizi (Genomatix software kullanılmıştır)

4.6. *ARPP-21* GENİ VE MİR-128-2 ETKİLEŞİMİ

Donzelli ve arkadaşlarının, 2012 yılında yayınladıkları çalışmalarında, *ARPP-21* geni ve miR-128-2 miRNAsının karşılıklı etkileştiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, Akciğer kanserinde fazla ifade olan p53'ün miR-128-2 ifadesini uyardığı gösterilmiştir. Mutant *p53*, promotoru *ARPP-21* geninde yer alan mir-128-2'ye bağlandığı ve bununla beraber ARPP-21 ifadesini uyardığı gösterilmiştir. miR-128-2 ifadesinin akciğer kanserinde, apoptozu inhibe ettiği ve "cisplatin, doxorubicin ve 5-fluorouracyl" tedavisine direnç sağladığı gösterilmiştir. Moleküler düzeyde, miR-128-2'nin transkripsiyon sonrası hedefinin E2F5 olduğu ve baskılayıcı özellikte olan $p21_{waf1}$'in çalışmasını bozmaktadır. $p21_{waf1}$ proteini, sitoplazmik kısımda bulunmakta ve prokaspaz 3'ün kesilmesinin önlenmesinde görev almaktadır. Bu çalışmada, miRNA-128-2'nın kimyasal dirence karşı esas rolü üstlendiği gösterilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Kanser hücresinde miRNA-128-2'nin yer aldığı gösterilmiş moleküler mekanizması

Öncü miR-128-2 (pre-miR-128-2)'nın mutant p53 ile etkileştiği dolayısıyla p53'ün miR-128-2 ifadesini daha transkripsiyon düzeyinde kontrol ettiği düşünülmektedir (132). Aynı zamanda *mir-128-2* miRNA gen bölgesinin *ARPP-21* geni 19. intronunda tamamen eşleşme gösterdiği bilinmektedir. Bu durum da gen içi (intragenik) mirna olduğunu göstermektedir (133). *miR-128-2* ve *ARPP-21* geni *p53* geni tarafından düzenlendiği, bu 3 elemanın transkripsiyonel regülasyon mekanizmasında ortak yolakta yer aldığını göstermektedir. ARPP-21 mRNA'sı ve mir-128-2'nin ortak öncü tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada mutant *p53* geninin ARPP-21 5'UTR kısmında transkripsiyon başlama noktasından önceki 2 Kb'lık bir alanda 3 noktaya bağlandığı gösterilmiş ancak intragenik *miR-128-2* geninde herhangi bir noktaya bağlandığı gösterilmemiştir (132). Bu çalışma, *miR-128-2* ve *ARPP-21* geninin kendi içinde etkileşimini, yer alabilecekleri moleküler yolakları, kanser gelişimi ve ilaç direnç mekanizmasında yer alabileceklerini göstermiştir.

4.7. PSEUDOGENLER VE KANSER

Pseudogenler, fonksiyonel olarak protein kodlamayan, genlerin kopyalarıdır. İnsan genomunda 20.000'den fazla pseudogen olduğu belirlenmiştir. Genom içerisinde bu kadar sık gözlenen pseudogenler anlaşılmaya çalışılsa da henüz biyolojik rolleri ile ilgili pek fazla bilgi bulunmamaktadır (135).

Pseudogen transkriptlerinin endojen siRNA veya miRNA bağlanma noktası oluşturması ve gen regülasyonunda yeni elemanlar olabileceği düşünülmektedir. Sundaram ve arkadaşlarının 2012'de yapmış olduğu çalışmada RNA dizileme metodu kullanılarak 13 kanseri temsil eden 293 kanserli doku ve normal dokularda pseudogenler analiz edilmiştir. Ancak kanserlere göre ayrım gözlenmemiştir. Buna ek olarak hastalık alt tiplerine göre ifade edilen pseudogenler analiz edilmiştir. Tüm bu veriler bir araya getirildiğinde ise, pseudogenlerin daha önce zannedildiği gibi anlamsız diziler olmadığı otaya çıkmıştır. Elde edilen veriler, pseudogenlerin hücrede transkripsyonun genel düzenlenmesine katıldığı, hücre farklılaşması ve kanser gelişiminde özellikle miRNAlar gibi yarışmacı endojen RNA ağında (competing endogenous RNA-ceRNA) yön verici önemli roller aldıklarını düşündürtmüştür. Bu çalışmada sadece kanserli örneklerde ifade edilen 218, bu pseudogenler içinden birden fazla kanserde bulunan 178, özellikle kansere özgü olduğu düşünülen 40 pseudogen belirlenmiştir.

Kansere özgü pseudogenler içinde, ökaryotik translasyonunun başlatma faktörleri *EIF4A1* ve *EIF4H*, heterojen nükleer ribonükleoprotein *HNRPH2*, küçük nükleer ribonükleoprotein *SNRPG* yer almaktadır. Buna ek olarak, kanser ile ilişkili bulunmuş genlerin –*RAB-1, Ras ilişkili protein, VADC-1, RCC2, PTMA*- pseudogenleri de belirlenmiştir. İlginç biçimde, 5 işlenmiş pseudogeni olan *PTMA* geni, korunmuş TATA elementi, transkripsiyon başlangıç noktası, açık okuma çerçevesi atasal gen ile homoloji göstermektedir. Bu gen, 30 farklı kanser örneğinde belirlenmiş ve tümör gelişiminde önemli olduğu düşünülmüştür (136).

4.8. İNTRONİK MUTASYONLAR VE KURUCU ETKİSİ

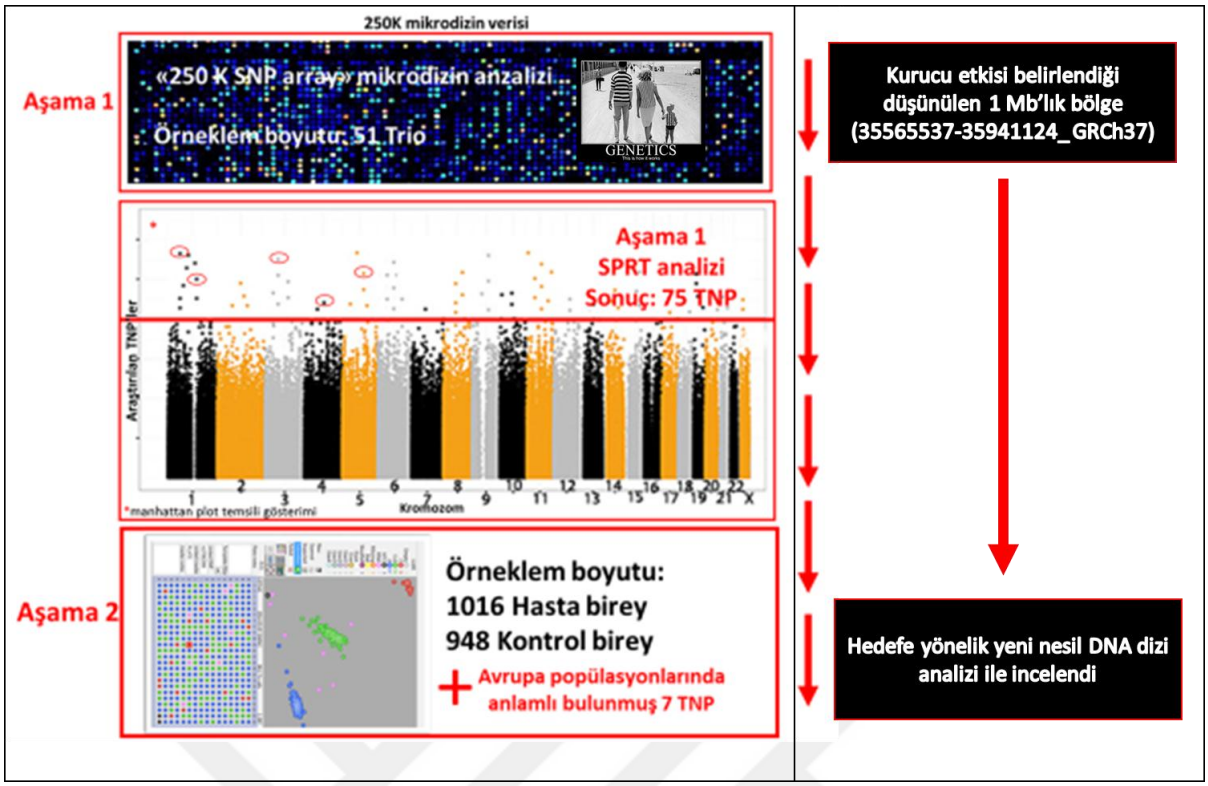
Smith ve arkadaşlarının 2013 yılında 1347 ALS VE FDT hastasında yapmış oldukları yayında, tek bir polimorfizmin risk haplotipini belirlemede etkili olabileceğini göstermişler ve bu durumu da Avrupa'da gözlenen 6300 yıl önce oluştuğu düşünülen kurucu etkisi ile açıklamışlardır. Buna göre, *C9ORF72* hekzanükleotit tekrar mutasyonu (HREM) ALS VE FDT hastalığıyla ilişkilendirilmiştir. Bu mutasyon, *C9ORF72* geni 1. intronunda yer almaktadır ve bahsedilen iki hastalık için de patojenik mutasyon olduğu belirlenmiştir (137,138). Smith ve arkadaşlarının çalışmasında 5 Avrupa popülasyonunda HREM mutasyonuna bakılmıştır. Buna göre, genomik instabilitenin kaynağı olan lokusta detaylı genetik varyasyon haritalaması yapılmış ve HREM taşıyan bireylerde genomik stabiliteyi bozan büyük insersiyonların olduğu belirlenmiştir. *C9ORF72* mutasyonu sporadik ALS hastalarında da sık gözlenmektedir. Toplumlara göre, ailesel ALS, FDT hastalarının %20-86'sında gözlenmektedir. Her ne kadar kesin bir yargı için incelenen popülasyon miktarı az olsa da, bu durumun kurucu etkisi nedeniyle geliştiği ve fenotipe yansıdığı sonucuna varılabilir.

5. GEREKÇE VE AMAÇ

T.C Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Daire Başkanlığı'nın 2004-2006 yılları kanser istatistiğine göre, kadınlarda görülen kanserler içinde 3. sırada yer alan kolorektal kanser erkeklerde ise 4. sırada yer almaktadır. Bu sıralama 2017 verilerine göre hem kadın hem de erkeklerde 3. sırada olarak güncellenmiştir. Bu tez çalışmasında KRK'in %75'ini oluşturan sporadik form çalışılmıştır. Teknolojinin ilerlemesi ve insan genomunda yer alan varyasyonların belirlenmesi ile popülasyona özgü GWAS çalışmaları önem kazanmıştır. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında ilk kez yapılan Türk toplumuna özgü GWAS çalışması sporadik KRK yatkınlığına neden olan gen veya değişimlerin belirlenmesi açısından önem arz etmektedir.

Sporadik KRK'de yatkınlığın belirlenmesinde kullanılabilecek ve toplumumuzu yansıtan hedef gen listelerinin daha önce sınırlandırılmamış olması ve nihai olarak da hedef gen/lokusların belirlenmemiş olması nedeni ile bu çalışma konusu seçilmiştir. Hipotez sporadik KRK hastalarında aday gen bölgelerinin hastalık ile ilişkili olduğu yönünde kurulmuştur. Ayrıntılı olarak ifade etmemiz gerekirse hipotezimiz, aile temelli genom boyu asosiyasyon çalışmasında belirlenmiş 75 TNP'nin, haplotip analizi ile 6 bağımsız hasta bireyde belirlenmiş yaklaşık 1 Mb'lık bölgenin ve literatür araştırması ile belirlenmiş Avrupa GWAS sonunda KRK ilişkili bulunmuş 7 TNP'nin çalışma grubumuz ile ilişkili olduğu şeklinde oluşturulmuştur

Bu tez kapsamında amacımız coğrafik bulunuşu sebebi ile özgün olan Türk popülasyonunda sporadik KRK yatkınlık bölgelerinin belirlenmesidir. Bu başlık altında 2011 yılında tamamlanan 107S348 numaralı TÜBİTAK projesinde 51 trioyu kapsayan aile temelli GWAS ile ortaya konulmuş 75 TNP'nin bağımsız büyük bir toplulukta validasyonu, kurucu etkisi olduğu düşünülen 1 Mb'lık alanın incelenmesi ve Avrupa toplumunda KRK ile ilişkili bulunmuş 7 TNP'nin Türk toplumunda incelenmesi amaçlanmıştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Tez kapsamında yapılmış tüm çalışmaların genel görünümü

Bu tez çalışması ile Türk popülasyonunda asosiyasyon çalışması sonuçlarının validasyonu ilk kez yapılmıştır. Yukarda ayrıntısı verilmiş toplam 82 TNP'nin Türkiye'deki 45 merkezden tesadüfi örnekleme ile seçilerek 1000 sporadik KRK ve 1000 sağlıklı kontrolde değerlendirilmesi hedeflenmiş, örneklem sayısının %95'e yakınında analizler gerçekleştirilmiştir. Toplamda 1016 hasta, 948 kontrol birey çalışmaya dahil edilmiştir. GWAS çalışmaları için elzem olan bu 2. aşama ile Türk popülasyonunda sporadik KRK yatkınlığa neden olan olası gen lokusları belirlenmiştir. Yine 107S348 numaralı TÜBİTAK projesinde belirlenen kurucu etkisi olduğu düşünülen 1Mb'lık bölgenin hedefe yönelik yeni nesil dizi analizi ile incelenmesi ve bu bölgedeki 3 genin (*ARPP21*, *ARPP21-AS*, *miR-128-2*) tümör-kontrol dokularda ifade düzeyinde kıyaslanması amaçlanmıştır. Ancak bütçe dahilinde sadece 1Mb'lık genomik bölge 4 hastada incelenmiştir. Bu tez çalışması 3 projeden oluşturulmuştur (TÜBİTAK 112S634, BAP-14L0415003, BAP-16H0415001).

Kanser gibi kompleks hastalıklarda tanı, teşhis ve tedaviye giden yolda hedeflerin belirlenmesi ve yeni alternatifleri geliştirmenin pahalı ve uzun süreli pek çok basamak içeren bir süreç olduğu göz önünde bulundurulduğunda belli bir noktaya gelmiş bu çalışmanın önemli çıktılara sahip olabileceği öngörülmektedir. Buna ek olarak bu çalışma literatür ve

Türk popülasyonu ilişkili çalışmalar kapsamında bakıldığında toplum temelli çalışmaların eksikliğinden doğan boşluğun doldurulması için ilk adımlardan biri olacaktır.

Sonuç olarak, Türk toplumunda sporadik kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş yatkınlık genleri ve değişimlerinin belirlenmesi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Bu tez çalışması geniş kapsamda Türk toplumunda ilk kez yapıldığı için sonuçları bakımından yaygın etki ve literatüre katkı değerini artırmaktadır.

6. MATERYAL VE YÖNTEM

6.1. MATERYAL

Tezin ilk kısmını oluşturan proje kapsamında, proje başlangıcından sonra çalışma grubu ve sağlıklı kontrolleri daha hızlı ve homojen toplayabilmek amacıyla merkez sayısı 45'e Genel Cerrahi Uzman sayısı ise 52'e çıkartılmıştır. Bununla ilgili izinler Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumundan alınmıştır (Karar sayısı: 41343506/5454.9788) (Ek [1]). Örneklemlerin toplanması ve çalışılması için etik kurul onayı alınmıştır (Güncel etik kurul sayı karar-no: 20-879-15 Tarih: 28.12.2015).

Aşağıdaki şekil ve çizelgede sırasıyla Türkiye coğrafik bölgelerine göre merkezlerin yer aldığı şehirler (Şekil 6.1) ve gelen periferik kan örnek oranı gösterilmiştir. Çizelge 6.1'de hasta ve kontrol bireylerin ikamet yerine göre dağılımı gösterilmiştir. Çizelge 6.2'de ise hastaların doğum yeri göz önüne alınarak Türkiye coğrafik bölgelerine göre dağılımları görülmektedir. Buna göre, çalışmaya dâhil edilen merkezlerden toplanan örneklerin bazı bölgelerde daha düşük olduğu gözlenmiştir. Çalışmaya dâhil edilen bireylerin doğduğu bölgeler temel alınarak çizelge oluşturulduğunda dağılım göreceli olarak homojen hale gelmektedir. Çizelge 6.3'de çalışma grubunda toplanan klinik parametreler gösterilmiştir.



Şekil 6.1. Projeye dâhil edilen merkezlerin genel görünümü

[1] EK 1-112S634 -Proje dahilinde Örnek Akışını Sağlandığı Merkezler

Çizelge 6.1. 29.02.2016 tarihine kadar toplanan hasta ve kontrol sayısının ikamet yerine göre örnek dağılımı

	Kontrol (%)	**Çalışma Grubu (%)**	**Toplam (%)**
İç Anadolu	178 (21)	208 (23)	386 (22)
Akdeniz	193 (22)	155 (17)	348 (20)
Ege	27 (3)	58 (7)	85 (5)
Karadeniz	187 (22)	143 (16)	330 (19)
Marmara	197 (23)	222 (25)	419 (24)
Doğu Anadolu	51 (6)	76 (9)	127 (7)
Güney Doğu Anadolu	26 (3)	24 (3)	50 (3)
Ara Toplam	859	886	1745
Bilgisi Eksik Kontrol Birey Sayısı	89		
Bilgisi Eksik Hasta Birey Sayısı	133		
Toplam	1967		

Çizelge 6.2. 29.02.2016 tarihine kadar toplanan hasta ve kontrol sayısının kişi doğum yerine göre dağılımı

	Kontrol (%)	**Çalışma Grubu (%)**	**Toplam (%)**
İç Anadolu	145 (16)	204 (22)	349 (19)
Akdeniz	150 (16)	139 (25)	289 (16)
Ege	41 (4)	61 (6)	102 (6)
Karadeniz	281 (31)	210 (22)	491 (27)
Marmara	128 (14)	135 (14)	263 (14)
Doğu Anadolu	108 (12)	132 (14)	240 (13)
Güney Doğu Anadolu	59 (6)	59 (6)	118 (6)
Ara Toplam	912	940	1852
Bilgisi Eksik Kontrol Sayısı	36		
Bilgisi Eksik Hasta Sayısı	79		
Toplam	1967		

Çizelge 6.3. Çalışma Grubundan toplanan parametreler gösterilmektedir.

Doktorunun Bilgisi	Çevre Organ İnvazyonu
Tedavi Merkezi	Lenf Nodu Metastazı
xxxxx	Uzak Organ Metastazı
İkincil Odak Durumu	Kanser Tipi
Ailesel Kanser Durumu	Differansiasyon
Radyolojik Evre	TNM EVRESİ
Lezyonun Yeri	Periferal Nöral-Periferal Vasküler İnvazyonu
Preoperatif- Neoadjuvan	

Tezin ikinci kısmında kullanılan materyal, çalışmaya dâhil edilen bireylerin 2007-2011 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalına başvuran TÜBİTAK 107S348 numaralı projede kurucu etkisi belirlenmiş 6 birey içinden 4 hastanın seçilmesiyle oluşturulmuştur. Hasta sayısı, incelenen kişilerin seçimi aşağıdaki Çizelge 6.4'e göre belirlenmiştir. Çizelge 6.5'de kurucu etkisi belirlendiği düşünülen örneklerin memleket

ve örnek stok durumu verilmiştir. Örneklemlerin toplanması ve çalışılması için etik kurul onayı alınmıştır (Sayı karar-no: 18-699-13 Tarih: 09.12.2013).

Çizelge 6.4. Çalışmaya dâhil edilen bireylerin seçimi, gerekçeleri ve kullanılan yaklaşım

Proje No	**107S348**	
İleri Araştırma Gereken Konu	3p22.3 gen bölgesi (1 Mb bölge)	*3p22.3 bölgesinde bulunan genlerin ifade düzeyleri (ARPP21, ARPP21-AS, mir128-2a)
İleri Araştırma Gereken Hasta Sayısı	Çalışma dâhilinde şüpheli olduğu düşünülen 4 hasta	*Çalışma dâhilinde şüpheli olduğu düşünülen 4 hastanın manuel diseksiyon sonucunda elde edilen kontrol ve sağlıklı dokuları
İleri Analiz Yapılacak Teknoloji	Yeni nesil DNA dizi analizi	*QRT-PCR
İleri Analiz Yapılacak Gen /Baz Sayısı	1 Mb	*3 Gen

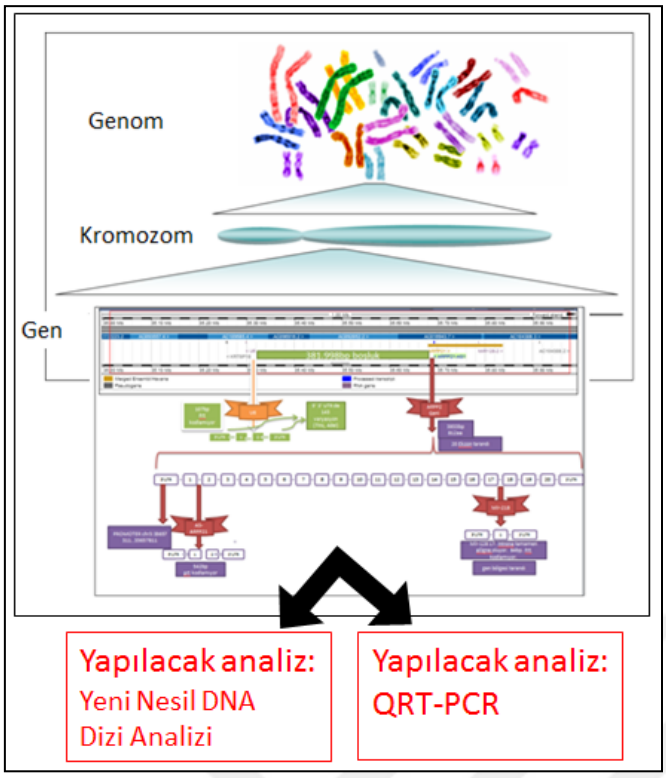
*Çalışmanın bu ayağı projedeki bütçe sıkıntısı nedeni ile yapılamamıştır.

Çizelge 6.5. Kurucu etkisi belirlendiği düşünülen tüm örneklerin memleket bilgileri.

Örnek ID	İsim	Memleket	Örnek Stok durumu
08/98	H.Ç.	Zonguldak	+
08/79	C.A.	Ankara	+
08/78	A.N.	Kayseri	+
09/148	Y.G.	Zonguldak	-
09/256	A.A.	Ankara	+
09/142	E.Y.	Ulaşılamadı	+

* Gri renk ile işaretli bireyler yeni nesil DNA dizi analizi yapılmıştır.

Bu projede genom içinde 1Mb'lık alanda inceleme yapılmıştır. Aşağıda verilen Şekil 6.2'de 107S348 numaralı projede tüm genom üzerinde yapılan analiz, bunun sonucunda genom ve ifade düzeyinde araştırılması gereken 1 Mb'lık alan ve bu bölgede yer alan genler vurgulanmıştır.



Şekil 6.2. 107S348 numaralı proje sonucunda ileri araştırma gerektiren analizler

6.2. YÖNTEM

6.2.1. KANDAN DNA İZOLASYONU

Asosiyasyon çalışmasında genotipleme için merkezlerden gelen periferik kan örnekleri 6 tüpe ayrılarak 2 alikuat -20°C'de, 4 alikuat -80°C'de stoklanmıştır. KASP deneyleri için gerekli DNA miktarı her bir örnek için çalışılacak TNP sayısı dikkate alınarak 10µg olarak belirlenmiştir. Buna göre, -20°C'de stoklanan örneklerden öncelikle Promega DNA İzolasyon Kiti ile izolasyon yapılmakta; 10 µg'a ulaşamayan örnekler yeniden izolasyona alınmıştır. İkinci izolasyon ise Klasik Fenol-Kloroform yöntemi ile yapılmıştır.

Yeni nesil DNA dizi analizi için, 19 Şubat 2007 tarihinde 107-2796 sayı ile etik kurul raporu alınmış 107S438 numaralı TÜBİTAK 1001 projesinde çalışmaya dâhil edilen ve kanları -80°C'de stoklanan 4 kişiden toplanmış periferal kan örneklerinden klasik fenol-kloroform yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Her iki protokol de aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

6.2.1.1. Fenol Kloroform DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için kullanılan protokol aşağıda verilmiştir.

- 700 µl kan üzerine 800 µl RBC lizis solüsyonu eklenir.
- 13000 rpm'de (4°C'de) santrifüj edilir.
- Süpernatant uzaklaştırılır. (Süpernatant %10'luk çamaşır suyuna atılır.)
- Pelet, üzerine 800 µl RBC lizis solüsyonu eklenerek kaldırılır.
- 13000 rpm'de (4°C'de)santrifüj edilir.
- Süpernatant uzaklaştırılır. (Süpernatant %10'luk çamaşır suyuna atılır.)
- 4-6 arası basamaklar pellet beyazlaşıncaya kadar tekrarlanır.
- Dipte kalan lökositler üzerine 500 µl STE, 30 µl %10'luk SDS ve 20 µl proteinaz K ilave edilir.
- Tüpün ağzı parafilm ile kapatılarak 56°C'ye ayarlanan su banyosunda bir gece inkübasyona bırakılır.
- Su banyosundan alınan tüpe 25:24:1 oranındaki Fenol:Kloroform:İzoamilalkol karışımından 500µl ilave edilir.
- Beyaz renk alıncaya kadar vorteks yardımıyla karıştırılır. 13000 rpm'de (4°C'de) santrifüj edilir.
- Üst faz alt faza temas etmeden yavaşça temiz tüpe alınır.
- 10-12 arası aşamalar bir kez daha tekrarlanır.
- Temiz tüpe alınan süpernatant üzerine 1000 µl %95'lik etanol ve 1/10 oranında sodyum asetat koyulur ve çalkalanır.
- Bu aşamada DNA beyaz yumak şeklinde görünür. Yüksek devirde (4°C'de) santrifüj edilir. Alkol uzaklaştırılır.
- DNA üzerine 500 µl %70'lik soğuk etanol eklenir. Pelet kaldırılır. 4°C'de 13000 rpm'de santrifüj edilir.
- Alkol dikkatlice dökülür. DNA kurumaya bırakılır.
- Alkolden uzaklaştırılmış DNA üzerine 200 µl ddH_2O eklenir.
- 65°C'de 2 saat bekletilerek DNA'nın çözünmesi sağlanır.

6.2.1.2. Promega DNA İzolasyon Kiti ile İzolasyon

DNA izolasyonu için kullanılan protokol aşağıda verilmiştir (Promeda, Wizard Genomic DNA Purification Kit-A1125).

- 300 µl kan için 900 µl, 1500 µl kan için 4500 µl liziz solüsyonu kullanılır.

- Kan karıştırıldıktan sonra 4500 µl hücre liziz solüsyonu içeren tüpe transfer edildikten sonra karışması için 5-6 kez karıştırılır.
- Karışım 10 dk. oda koşulunda inkübe edilir. İnkübasyon süresince de 2-3 kez alt üst edilerek kırmızı kan hücreleri parçalanır.
- 2000g'de 10 dk. oda koşulunda santrifüj edilir.
- Süpernatant, görünür haldeki beyaz pellete dokunmadan uzaklaştırılır (Falkon tüpte yaklaşık 50-100µl sıvı kalabilir).
- Kan daha önceden dondurularak kullanılmışsa 1-5 basamakları pellet beyaz hale gelene dek tekrar edilir.
- Eğer pellet sadece kırmızı kan hücrelerinden oluşuyorsa hücre liziz solüsyonu tekrar eklenir ve 3-5 basamakları tekrar edilir.
- Beyaz kan hücreleri çözülene dek tüp kuvvetli devirde vortekslenir. Hücre parçalanmasının başarılı olması için beyaz kan hücrelerinin tamamen çözülmesi sağlanmalıdır.
- Çözünmüş beyaz kan hücrelerinin üzerine 1500 µl "Nuclei lizis solüsyonu" eklenir. Hücrelerin parçalanması için, solüsyon 5-6 kez pipetlenir. Solüsyon çok viskoz hale gelmelidir. Eğer karıştırmanın ardından hücreler hala belirginse, 37°C'de hücreler belirgin olmayana dek inkübe edilir.
- 500 µl "Protein çöktürme solüsyonu" nükleer lizata eklenir ve 10-20 sn yüksek devirde vortekslenir. Vorteks sonrasında küçük protein parçaları bir arada görünür hale gelebilir.
- 3ml kan örneği için 2000g'de 10 dk, 300µl için 13000-16000g'de 3 dk. oda koşulunda santrifüj edilir.
- 1500 µl isopropanol içeren 15ml falkon tüpe transfer edilir.
- DNA ipliği görünür hale gelene dek solüsyon dikkatlice alt üst edilir.
- 3ml kan örneği için 2000g'de 1 dk., 300 µl için 13000-16000g'de 1 dk oda koşulunda santrifüj edilir. DNA küçük beyaz pellet halinde görünür hale gelecektir.
- Süpernatant uzaklaştırılır ve DNA üzerine 1500 µl %70'lik etanol eklenir. Tüp dikkatlice alt üst edilerek DNA pelleti ve falkon tüpün kenarları yıkanmış olur.
- 3ml kan örneği için 2000g'de 1 dk., 300 µl için 13000-16000 g'de 1 dk. oda koşulunda santrifüj edilir.

- Etanol pastör pipeti ya da pipet ucu ile dikkatlice uzaklaştırılır. Pelet bu aşamada kaygandır, dikkatle etanol uzaklaştırılmalıdır. Tüp ters çevrilerek pelletin 10-15 dk. kuruması beklenir.
- 125 µl ddH_2O eklenir ve 65°C'de 1 saat inkübe edilerek DNA'nın çözünmesi sağlanır.

6.2.2. DNA NİCELİK VE NİTELİK TAYİNİ

6.2.2.1. Spektrofotometrik Analiz

DNA izolasyonu yapılan örneklerin nicelik analizi spektrofotometrik teknikle çalışan "Nanodrop" cihazı ile ölçülmüştür. Nanodrop, nükleik asit ve proteinlerin miktar tayininde rutin olarak kullanılan ve otomatik olarak hesaplama yapmaya gerek kalmadan sonuç veren bir cihazdır. DNA örnekleri 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında okunmaktadır. Bunun için homojen hale getirilmiş DNA örneğinden 2 µl alınarak cihazda ölçüm yapılmıştır.

6.2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA izolasyonu yapılan örneklerin nitel analizi %1'lik agaroz jelde görünür hale getirilmiş ve DNA örneğinin bütünlüğü kontrol edilmiştir. Aşağıda %1'lik agaroz jel protokolü verilmiştir.

%1'lik agaroz jel
2 µl Red Safe (Chembio- 21141)
1gr Agaroz (Sigma-A9539)
Toplam hacim 100 ml 'ye 1X Tris Borik Asit EDTA ile tamamlanır.

1X Tris Borik Asit EDTA
Trisma Base 445Mm -10.8g (Sigma-T1503)
Borik Asit 445Mm -5.5g (Sigma- B6768)
EDTA (0.5M, pH:8) 10Mm- 4ml (Lonza-51201)
Toplam hacim 1000ml ddH20 ile tamamlanır.

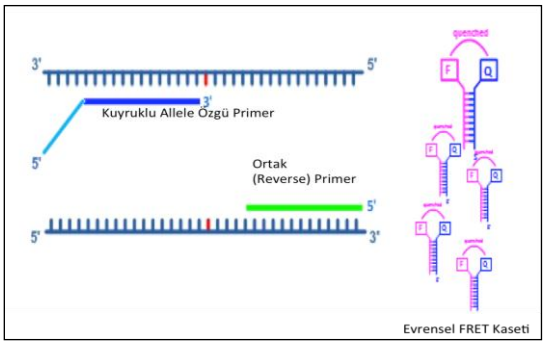
Çözelti homojen hale gelene kadar mikrodalga fırın yardımı ile ısıya maruz bırakılır. 1dk aralıklarla karıştırılır. DNA'yı görünür hale getirmek amacıyla 4µl "RedSafe" eklenerek homojen hale gelene kadar karıştırılır. Uygun jel tabakları ve tarakları kullanılarak agaroz jel hazır hale getirilir.

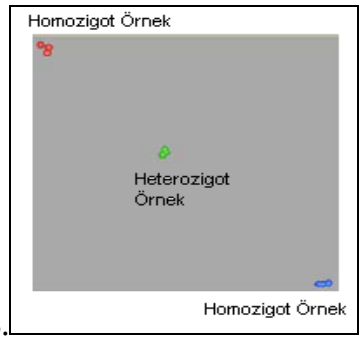
3 µl DNA örneği ve 1,5 µl 6X yükleme boyası (Fermentas, R0611) kullanılarak agaroz jele yükleme yapılmıştır. 85 volt'da 1 saat elektrik akımında yürütülen örnekler ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

6.2.3. REKABETÇİ ALLEL SPESİFİK PCR_KASP

KASP, floresan temelli genotipleme teknolojisi olarak tanımlanmaktadır. Bu teknoloji yüksek işlem hacmi, doğru genotipleme başarısı ve benzerlerine kıyasla uygun fiyat sunması nedeni ile seçilmiştir. Türkiye'de ilk kez bu tez çalışmasında bu kadar fazla reaksiyon sayısı çalışılmıştır. "Rekabetçi Allele Özgü PCR" sırasında ayrım gücüne bağlı DNA üzerindeki değişim noktasına özgü allel spesifik amplifikasyon yapılmaktadır. Buna göre, her iki allele özgü 2 farklı "forward primer" ve amplifikasyonun sağlanması için ortak "reverse primer" kullanılmaktadır. Bu teknolojinin yüksek işlem hacimli olması sisteme FRET kasetlerinin dahil edilmesi ile sağlanmıştır. Reaksiyon oluştururken PCR amplifikasyonu için FRET – FAM ve HEX probları - kasetlerini içeren master miks eklenir. Buna ek olarak 3 çeşit primer içeren primer miks de eklenir. Allele özgü primerlerin 5' ucunda her iki FRET kasetlerine özgü esas diziden bağımsız diziler bulunmaktadır. Allele özgü bağlanma primerlerin 3' ucu ile gerçekleşir. Orijinal diziye eklenen ayrımı sağlayacak dizilere FAM veya HEX floresans boyalarına bağlı komplementer diziler bağlanır. Amplifikasyon öncesi ışıması baskılanan boyalar, bağlanma sonrasında 3'uçta bulunan baskılayıcı florokromun uzaklaşması ile ışımaya başlar. Böylece allele özgü ışıma gerçekleşir.

İlgili TNP açısından homozigotluk durumuna göre mavi ya da kırmızı sinyal alınır. (HEX; kırmızı: homozigot/ FAM; mavi: homozigot). Eğer birey heterozigot ise iki boyanın karışımı bir floresan sinyali alınır (HEX/FAM; yeşil: heterozigot) (Şekil 6.3).

A. 

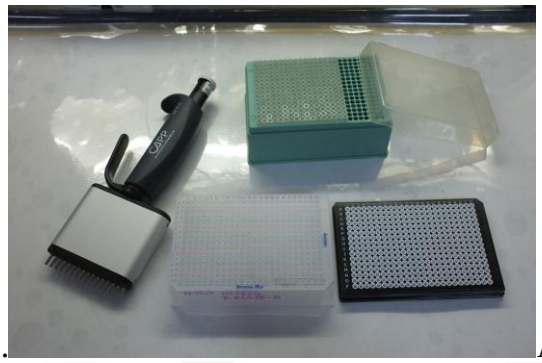
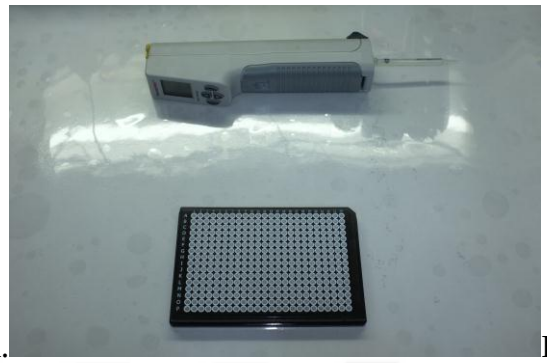
B. 

Şekil 6.3. A. KASP teknolojisi FRET kaset şematik görüntüsü, B. KASP teknolojisi sonuç penceresi

Projeye dâhil edilmesi planlanan 2000 adet örnek ve 82 TNP olduğundan işlem hacminin artırılması gerekmiştir. Bu sebeple reaksiyonlar 384'lük plakalarda yapılmıştır. Örnek stoklanması için derin kuyulu plakalar ("*plate*") ve örnek dağıtılması için 16'lı çok kanallı pipet kullanılmaktadır (Şekil 6.4A). Ayrıca reaksiyon karışımı dağıtılması için "repeater dispenser" pipetleri kullanılmaktadır (Şekil 6.4B).

Örnek ve reaksiyon karışımı eklenen plakalar K-seal cihazı ile üzeri naylon tabaka ile kapatılarak deneylere devam edilmiştir (Şekil 6.5).

PCR amplifikasyonu için yüksek işlem hacimli 4 tane 384lük plaka bir arada reaksiyon yapabileceğimiz Hydrocycler cihazı kullanılmıştır (Şekil 6.6).


A.

B

Şekil 6.4.A. 384lük derin kuyulu stok örnek plakasından siyah-beyaz zebra çalışma plakasına örneklerin dağıtılması B. Örnek dağıtılmış çalışma plakalarına "repeater dispenser" pipet ile reaksiyon karışımının dağıtılması



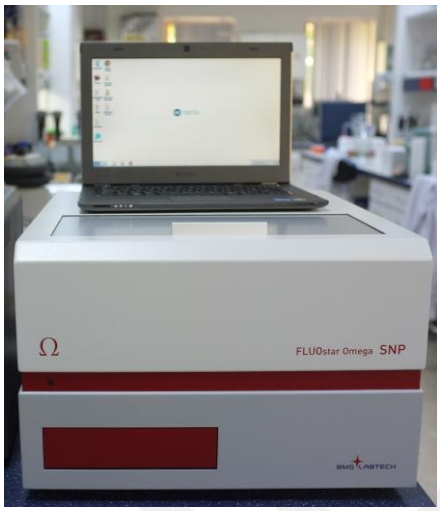
Şekil 6.5. KASP deneylerinde plaka üzerini kapatmak için kullanılan K-seal Cihazı



Şekil 6.6. KASP deneylerinde kullanılan su banyosu temelli PCR Hydrocycler cihazı

6.2.3.1. Veri Analizi

KASP sonrasında FAM-HEX problarını analiz eden Omega cihazı ile plaka okutulmuştur (Şekil 6.7).



Şekil 6.7. KASP deneylerinde PCR sonrası analizlerde kullanılan Omega cihazı

6.2.3.2. KASP verisinin İstatistik Analizi

Verilerin analizleri kapsamında, hasta-kontrol grupları arasında coğrafi farklılıklar gözlenip-gözlenmediğinin araştırılması amacı ile Cochran-Armitage'in ki-kareli eğilim testi her bölge için ayrı hesaplanmıştır. Bu analizler için R yazılımında HapEstXXR Kütüphanesi altındaki "catt" fonksiyonu kullanılmıştır (139,140). Bu fonksiyon TNP genotipleri için Cochran-Armitage'in ki-kareli eğilim testini yapılmıştır.

Bu test sonucunda, çalışma ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık gözlenen TNP ve coğrafik bölgeler için, 2x2 lik tablolar oluşturulmuş ve bu tablolardan Göreceli Olasılıklar Oranı (OR) ve bu oran için güven aralığı hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar aşağıdaki örnek tablo ile açıklanmıştır (Çizelge 6.6).

Çizelge 6.6. Göreceli Olasılıklar Oranı (OR) hesabı için oluşturulan 2x2'lik çizelge

TNP x – y bölgesi	G:G	G:A	A:A
Çalışma Grubu	a	b	c
Kontrol Grubu	d	e	f

→

	G	A
Çalışma Grubu	2a+b	2c+b
Kontrol Grubu	2d+e	2f+e

$$\text{OR} = \frac{(2a+b)(2f+e)}{(2c+b)(2d+e)}$$

OR asimetrik dağılıma sahip olduğundan güven aralıkları bu oranın doğal logaritması üzerinden hesaplanır ve sonuçlara ters dönüşüm uygulanarak orijinal ölçeğe erişilir.

Log OR için %95'lik güven aralığı: Ln(tahmini OR) ± 1.96 * Standard hata

$$\text{Standard hata} = \frac{1}{2a+b} + \frac{1}{2f+e} + \frac{1}{2c+b} + \frac{1}{2d+e}$$

Log OR için elde edilen güven aralığının uç noktaları (L, U) olsun. Bu durumda, OR için %95'lik güven aralığı (exp(L), exp(U)) olur.

6.2.3.3. "Ancestry Informative Belirteçlerin" Belirlenmesi

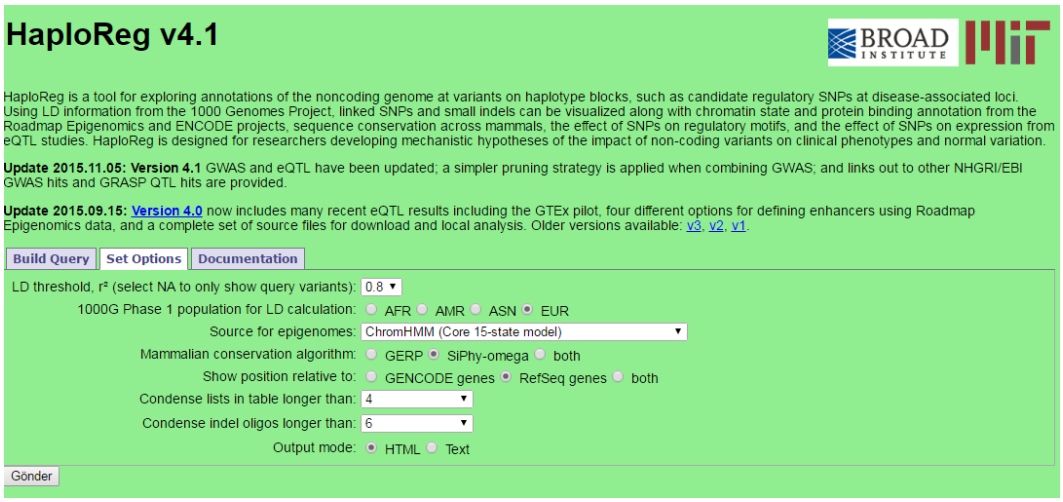
Bu tez çalışmasında incelenen TNP'lerin 7 coğrafik bölge bazında KRK'den bağımsız olarak bir stratifikasyon gösterip göstermediğini değerlendirebilmek üzere Fst hesaplamaları yapılmıştır. Fst indeksi popülasyonlar arasındaki genetik uzaklığı ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır. Fst değeri 0-1 arasında hesaplanmaktadır. "0" iki gen havuzunun tamamen birbiriyle aynı olduğunu, "1" ise iki gen havuzunun tamamen farklı olduğunu, ortak allel paylaşmadığını, sabit olduğunu ifade etmektedir. Bu amaçla grubumuz tarafından R platformunda kod yazılmıştır. Memelilerde kullanılan 0.25 eşik değeri temel alınmıştır (141). Çalışılan TNP'ler arasında 0.25 üzeri olduğu belirlenmiş TNP'ler popülasyon stratifikasyonu gösterdikleri varsayıldığı için asosiyasyon değerlendirmesi dışında bırakılmıştır. Kalan TNP'lerin Fst değerleri 0.25'in altında bulunmuş ve asosiyasyon analizlerine bu TNP'lerle devam edilmiştir.

Popülasyon stratifikasyonu, genom boyu asosiyasyon çalışmalarında hastalık ilişkili TNP ve genomik bölgelerin belirlenmesinde dikkat edilmesi gereken hususlardandır. Hastalık ile ilişkili çalışılan popülasyonu temsil eden homojen bir grup oluşturulması sırasında popülasyon stratifikasyonunun elimine edilmesi gerektiği 90'lı yıllardan itibaren bilinmektedir (99). Bir önceki çalışmada kullanılan 51 çiftten (anne-baba) akrabalık bağı olmayan 102 bireyin 75 TNP verisi Fst indeksi ile analiz edilmiştir. Analiz edilen 75 TNP'nin doğum yerine göre gruplanma olup olmadığına bakılmıştır. Avrupa popülasyonlarında ilişkili bulunmuş çalışma grubumuzda genotipleme yapılmış 7 TNP için bu analizler yapılmamıştır.

6.2.3.4. GWAS Sonuçlarının Fonksiyonel Anlamlandırılması ve HaploReg v4.1 Aracı

Yaygın gözlenen kompleks özellikler ile ilişkilendirilmiş değişimler, direkt olarak proteini etkilemese de gen ifade düzeyini değiştirebilmektedir. Bu da düzenleyici genomik bölgelerin anlaşılması konusunun önemini vurgulamaktadır. HaploReg GWAS sonrası hastalık ilişkili olduğu belirlenmiş değişimlerin fonksiyonel olarak anlamlandırılmasında kullanılan araçlardandır. HaploReg aracılığı ile haplotip blokları belirlenerek; sistematik olarak epigenomik bilgi, regülatör genomik dizilerin bilgisi, ifade düzeyi gibi diğer verilerin karşılaştırmalı analizleri sonunda hedef gen/genler öne sürülmektedir. HaploReg aracı, ENCODE projesinden kromatin haritalarını, düzenleyici bağlanma motifleri ve bunların bağlanma verisini, GTEx, GRASP 2.0 veritabanlarından eQTL/QTL ve dokuya özgü hedef gen verilerini kullanmaktadır. Bununla beraber 1000 Genom Projesi Faz 1 sonuçlarını da haplotip analizi için kullanmaktadır. dbSNP verileri, eQTL, 1000 Genom Projesi, ENCODE verileri ile eşleştirilmektedir. Ayrıca bu araç, korunmuşluk analizi yapabilmekte ve daha önce yapılmış GWAS verilerini içermektedir

Ayrıntı vermek gerekirse bu araç "dbSNP 137" veritabanındaki tüm TNP'ler ve küçük indel'lerin genomik koordinatlarını ve dizilerini kullanmaktadır. 1000 Genom Projesi faz 1 Afrika, Amerika, Asya, Avrupa popülasyonları sonuçlarında 250kb'lık alanda LD analizi hesaplamaktadır. Analizde düzenleyici motiflerin belirlenmesi sırasında "pozisyon ağırlık matrisi" kullanılarak literatür ve genomik diziler skorlanır. Bu literatür verisi TRANSFAC, JASPAR gibi veri tabanlarından sağlanmaktadır ve eşik değeri $p < 4\text{-}7$ olarak alınmaktadır. GWAS sonuçları NHGRI kataloğundan sağlanmaktadır. GRASP 2.0 verileri GWAS olmayan QTL sonuçlarını içermekte, GTEx analysis V6 GWAS eQTL verilerini içermektedir. Aşağıda eklerde verdiğimiz (Ek5) hastalık ile ilişkili bulunmuş TNP'ler analiz edilirken kullanılmış parametreler verilmiştir. LD analizleri Avrupa popülasyonu verisi, r^2=0.8 değerine göre yapılmıştır. Haplotip analizlerinde Avrupa verisi kullanılmıştır.



Şekil 6.8. HaploReg v4.1 analiz parametre ayarları

6.2.4. YENİ NESİL DNA DİZİ ANALİZİ

Yeni Nesil DNA dizi analizi ile 107S438 numaralı projede belirlenmiş kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş ve kurucu etkisi belirlendiği düşünülen 3p22.3 (35565537-35941124-GRCh37) bölgesinde 1 Mb genomik bölge incelenmiştir. Buna göre, DNA izolasyonu yapılmış örnekler, yüksek işlem hacmi ve düşük maliyet nedeniyle yeni nesil DNA dizi analizi ile incelenmiştir. 1 Mblık genomik bölgenin tümünün Sanger DNA dizi analizi ile incelenmesi durumunda en az 6 katından fazla maliyet hesaplanmıştır (116.525,60TL). Aynı zamanda işlem hacmi ve verimi bakımından da Sanger DNA dizi analizi teknolojisi yavaş ve daha düşüktür.

Yeni nesil DNA dizi analizi için, gDNA izole edildikten sonra rutin olarak hizmet alımı veren ve standart protokollerini oluşturmuş bir laboratuvardan hizmet alımı yapılmıştır. Bu amaçla izole edilen gDNA hizmet alımı yapılan laboratuvara gönderilmiştir. Bu laboratuvarda yapılan işlemler aşağıda verilmiştir (Şekil 6.9).

1. Genomik DNA kalite Kontrolü
2. Genomik DNA fragmentasyonu sonrasında ilgili adaptörler kullanılarak kütüphane oluşturulması ve DNA barkodlama
3. Ekzom/Hedefe yönelik (1Mb'lık alan) amplifikasyon
4. İllumuna Yeni Nesil Dizileme Cihazı (HiSeq2000) kullanılarak 100 tekrarlı analiz yapılmıştır.
5. Referans genoma göre biyoinformatik analiz

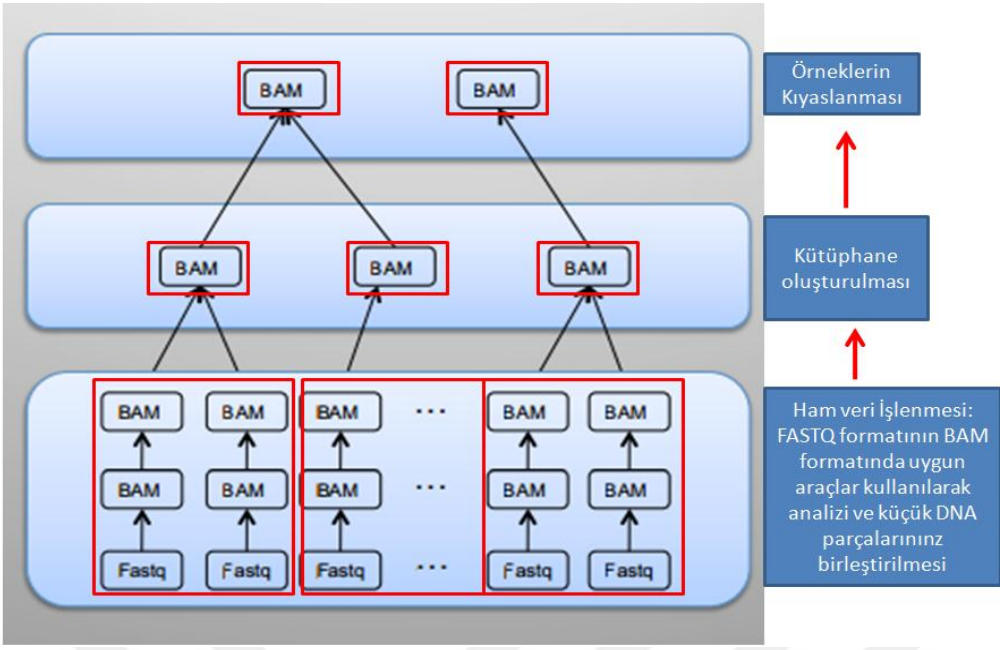


Şekil 6.9. Yeni Nesil DNA Dizi Analizi genel şeması

107S438 numaralı projede, *ARPP-21* ve hsa-*miR-128-2* genleri kodlanan bölgeleri Sanger DNA dizi analizi ile incelenmiş ancak herhangi bir değişim belirlenememiştir. Kolorektal kanser ile ilişkili bulunmuş kurucu etkisi belirlendiği düşünülen bu 1 Mb'lık genomik bölge, 3 geni (*ARPP21*, *ARPP21-AS*, *hsa-miR-128-2*) içerecek şekilde yeni nesil DNA dizi analizi ile 4 hastada incelenmiştir.

6.2.4.1. Yeni Nesil DNA Dizi Verisi İstatistiksel Analiz

FASTQ formatında elde edilen yeni nesil DNA dizi analizi sonuçları yine aynı laboratuvarda temel istatistiksel analizleri de yaptırılmıştır. Bu analizler de hizmet alımı olarak yapılmıştır (Şekil 6.10).



Şekil 6.10. Yeni nesil DNA dizi analizi istatistiksel analiz iş akış şeması

6.2.4.2. Yeni Nesil DNA Dizi Verisi Biyoinformatik Analiz

BAM formatında elde edilen 4 örneğin ham sonuçlarına biyoinformatik analiz uygulanmıştır. Bu amaçla, BWA-MAM yazılımı çalışmamıza göre özelleştirilerek biyoinformatik analiz yapılmıştır. Kontrol dizisi hg19 (UCSC) kullanılarak kıyas yapılmıştır. Yöntem kaynaklı duplikasyonları uzaklaştırmak için Picard (142) kullanılmıştır. Ayrıca baz kalitesini kontrol etmek için ise GATK (143) yazılımı kullanılmıştır. "Variant calling" yani varyasyon değişimini belirlemek için GATK ve Pindel yazılımları kullanılmıştır. Ayrıca hedef bölgeye özgü biyoinformatik analizler de yapılmıştır.

7. ARAŞTIRMA BULGULARI

7.1. KASP ARAŞTIRMA BULGULARI

7.1.1. HASTA-KONTROL GRUBUNUN OLUŞTURULMASI

Tez önerisi sırasında çalışmaya 1000 hasta 1000 kontrol birey dâhil edileceği bildirilmişti. Ancak proje başlangıcından itibaren çalışmaya 1019 hasta ve 948 kontrol olmak üzere toplam 1967 örnek çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışma ve kontrol grubunun kadın-erkek oranları Çizelge 7.1'de verilmiştir.

Toplamda 1967 örnekten, 102 bireyin yaş bilgisine ulaşılamamıştır (Çizelge 7.2). Projede ulaşılması gereken örnek sayısının hastalarda %100'üne, kontrol bireylerde ise %94.8'ine ulaşılmıştır. Toplanan 1967 örneğin tamamının genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Aşağıda örnek kalitesiyle ilgili bilgi verilmiştir (Çizelge 7.3, Çizelge 7.4).

Çizelge 7.1. Çalışmaya dâhil edilen örneklem bilgisi

Çalışma Grubu	**% (n)**
Kadın	%34 (345)
Erkek	%66 (674)
Kontrol Grubu	**% (n)**
Kadın	%55 (520)
Erkek	%45 (428)

Çizelge 7.2'de toplanan örneklerde, çalışma grubunda hem erkek hem de kadınlarda 50 yaş üstü bireylerin 50 yaş altı gruba göre yüzdelerinin fazla olduğu gözlenmiştir. Kontrol gurubunda ise yaş dağılımı çalışma grubuna kıyasla homojendir.

Projede toplanacak hasta sayısına ulaşılmış olmasına rağmen homojen yaş-cinsiyet dağılımı sağlayabilmek için proje sonuna kadar örnek toplanmasına devam edilmiştir. Bununla beraber kontrol bireylerin sayısının artırılması için merkezlerdeki doktorlar ile görüşülerek örnek akışı proje sonuna kadar sağlanmıştır.

Çizelge 7.2. Çalışmaya dâhil edilen Hasta-Kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılım ve ortalamaları

Grup	Yaş/Cinsiyet	n (%)	Toplam n (%)	Toplam n (%)
	50 yaş üstü Erkek	524 (27)	638 (32)	957 (49)
	50 yaş altı Erkek	114 (6)		
	50 yaş üstü Kadın	235 (12)	319 (16)	
	50 yaş altı Kadın	84 (4)		
	50 yaş üstü erkek	226 (11)	417 (21)	908 (46)
	50 yaş altı erkek	191 (10)		
	50 yaş üstü kadın	258 (13)	491 (25)	
	50 yaş altı kadın	233 (12)		
Toplam				1865 (95)
Doğum Tarihi Belirsiz Çalışma Grubu	Erkek- Yaş Belirsiz	36 (2)		102(5)
	Kadın-Yaş Belirsiz	26 (1)		
Doğum Tarihi Belirsiz Kontrol Grubu	Erkek- Yaş Belirsiz	11 (1)		
	Kadın-Yaş Belirsiz	29 (1)		
Toplam				1967

7.1.2. DNA İZOLASYONU

7.1.2.1. Nanodrop Sonuçları

Örnek sayısı çok fazla olduğu için temsili olarak Nanodrop ölçüm tablosu ve toplam DNA miktar hesaplanması aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 7.3, Çizelge 7.4).

Çizelge 7.3. DNA Örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri (Temsilen seçilen 22 örnek gösterilmiştir.)

No	Örnek No	Konsantrasyon (ng/ul)	A260/280	A260/230	Toplam Hacim(µl)	Toplam DNA miktarı (mikrogram)
1	14/294	89,42	1,87	1,86	200	17884
2	14/295	115,16	1,83	1,48	200	23032
3	14/296	130,72	1,82	1,5	200	26144
4	14/297	113,87	1,86	1,5	200	22774
5	14/298	54,1	1,84	1,54	200	10820
6	14/299	288,61	1,89	2,04	200	57722
7	14/300	89,44	1,85	1,68	200	17888
8	14/301	1098,28	1,91	2,09	200	219656
9	14/302	26,01	1,87	1,62	200	5202
10	14/303	60,82	1,9	1,73	200	12164
11	14/304	18,7	1,96	1,4	200	3740
12	14/305	18,22	1,93	1,34	200	3644
13	14/306	84,93	1,87	1,7	200	16986
14	14/307	135,6	1,92	2,22	240	32544
15	14/308	81,28	1,86	1,78	200	16256
16	14/309	104,03	1,84	1,49	200	20806
17	14/310	34,39	1,86	1,65	200	6878
18	14/311	144,19	1,85	1,69	200	28838
19	14/312	103,04	1,84	1,64	200	20608
20	14/313	71,84	1,92	1,93	200	14368
21	14/314	44,73	1,89	1,92	200	8946
22	14/315	158,92	1,91	2,13	200	31784

KASP deneylerinde gerekli DNA miktarı 10 µg olduğundan -20°C'de stoklanan örneklerden öncelikle Promega DNA İzolasyon Kiti ile izolasyon yapılmıştır. 10 µg'a ulaşamayan örneklerin yeniden izolasyonu Klasik Fenol-Kloroform yöntemi ile yapılmıştır. Dört kez izolasyona alınıp toplam DNA miktarı 10 µg'a ulaşılamayan örnekler, çalışmadan dışlanmıştır.

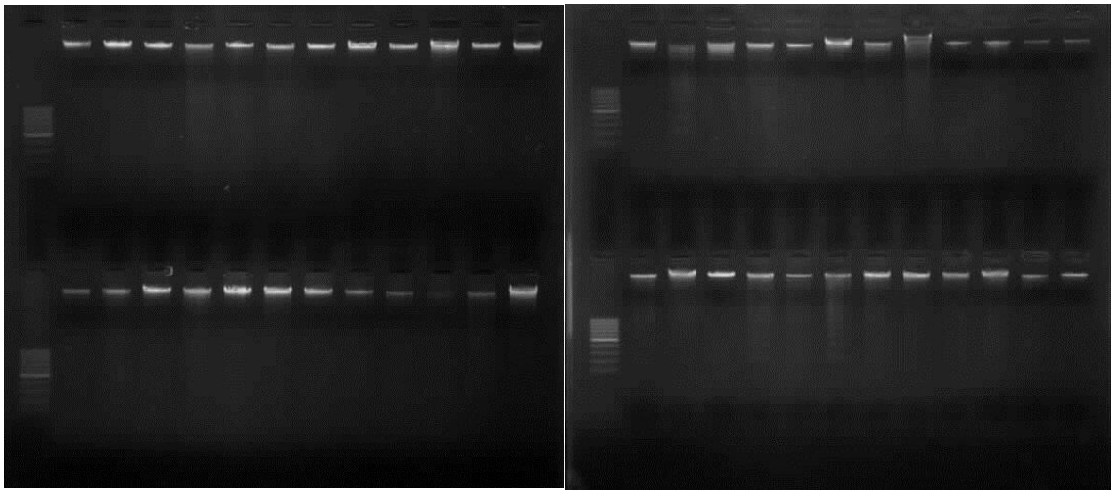
Çizelge 7.4'de izolasyon sonunda ulaşılan minimum, maksimum DNA kalite değerleri verilmiştir.

Çizelge 7.4. 15.06.16 tarihine kadar izole edilen örneklerin minimum/maksimum Nanodrop sonuçları

DNA Ölçüm Minimum/Maksimum Değerleri	
Konsantrasyon (ng/ul)	25-1369
A°260/280	1,8-1,9
A°260/230	1,9-2,30

7.1.2.2. Elektroforez

Örnek sayısı çok fazla olduğu için temsili olarak 48 örneğin %1lik Agaroz jel görüntüsü aşağıda verilmiştir (Şekil 7.1).



Şekil 7.1. Temsili %1'lik agaroz jel görüntüsü

7.1.3. KASP DENEYLERİ VE ANALİZİ

7.1.3.1. Genotipleme Deneyleri

Genotipleme deneyi yapılan "örnek-TNP" bilgileri aşağıdaki çizelgede ayrıntılı olarak verilmiştir (Çizelge 7.5). Çalışma kapsamında daha önce yürütmüş olduğumuz aile temelli genom boyu asosiyasyon çalışması sonucunda belirlemiş olduğumuz 75 TNP'nin analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak tez çalışmasının sonuçlarının yayın aşamasında verilerimiz ve çalışma popülasyonumuzun karşılaştırılabilirliğini güçlendirmek için Avrupa toplumlarında KRK ilişkili bulunmuş 7 TNP çalışmaya dâhil edilmiştir.

Böylece popülasyonumuzdaki sporadik KRK'e yatkınlıkla ilişkili TNP'leri daha geniş kapsamlı değerlendirilmiştir. Avrupa toplumlarında geniş kapsam ve yüksek çözünürlüklü genom boyu asosiyasyon çalışmaları ile tespit edilmiş 26 TNP'de gösterilmiştir (Çizelge 7.6). Bu TNP'ler arasında p değerleri 4.02 E-8-3.16 xE-11 arasında olan 7 TNP projemize dâhil edilmiştir (Çizelge 7.7).

Bugüne kadar genotipleme deneyi yapılan örnek-TNP bilgileri aşağıda çizelgede ayrıntılı olarak verilmiştir (Çizelge 7.5).

Çizelge 7.5. 82 TNP, 1967 hasta-kontrol için yapılan genotipleme deneylerinin görünümü

PLAKA 1	PLAKA 2	PLAKA 3	PLAKA 4	PLAKA 5	PLAKA 6
TNP1	TNP1	TNP1	TNP1	TNP1	TNP1
TNP2	TNP2	TNP2	TNP2	TNP2	TNP2
TNP3	TNP3	TNP3	TNP3	TNP3	TNP3
TNP4	TNP4	TNP4	TNP4	TNP4	TNP4
TNP5	TNP5	TNP5	TNP5	TNP5	TNP5
TNP6	TNP6	TNP6	TNP6	TNP6	TNP6
TNP7	TNP7	TNP7	TNP7	TNP7	TNP7
TNP8	TNP8	TNP8	TNP8	TNP8	TNP8
TNP9	TNP9	TNP9	TNP9	TNP9	TNP9
TNP10	TNP10	TNP10	TNP10	TNP10	TNP10
TNP11	TNP11	TNP11	TNP11	TNP11	TNP11
TNP12	TNP12	TNP12	TNP12	TNP12	TNP12
TNP13	TNP13	TNP13	TNP13	TNP13	TNP13
TNP14	TNP14	TNP14	TNP14	TNP14	TNP14
TNP15	TNP15	TNP15	TNP15	TNP15	TNP15
TNP16	TNP16	TNP16	TNP16	TNP16	TNP16
TNP17	TNP17	TNP17	TNP17	TNP17	TNP17
TNP18	TNP18	TNP18	TNP18	TNP18	TNP18
TNP19	TNP19	TNP19	TNP19	TNP19	TNP19
TNP20	TNP20	TNP20	TNP20	TNP20	TNP20
TNP21	TNP21	TNP21	TNP21	TNP21	TNP21
TNP22	TNP22	TNP22	TNP22	TNP22	TNP22
TNP23	TNP23	TNP23	TNP23	TNP23	TNP23
TNP24	TNP24	TNP24	TNP24	TNP24	TNP24
TNP25	TNP25	TNP25	TNP25	TNP25	TNP25
TNP26	TNP26	TNP26	TNP26	TNP26	TNP26
TNP27	TNP27	TNP27	TNP27	TNP27	TNP27
TNP28	TNP28	TNP28	TNP28	TNP28	TNP28
TNP29	TNP29	TNP29	TNP29	TNP29	TNP29
TNP30	TNP30	TNP30	TNP30	TNP30	TNP30
TNP31	TNP31	TNP31	TNP31	TNP31	TNP31
TNP32	TNP32	TNP32	TNP32	TNP32	TNP32
TNP33	TNP33	TNP33	TNP33	TNP33	TNP33
TNP34	TNP34	TNP34	TNP34	TNP34	TNP34
TNP35	TNP35	TNP35	TNP35	TNP35	TNP35
TNP36	TNP36	TNP36	TNP36	TNP36	TNP36
TNP37	TNP37	TNP37	TNP37	TNP37	TNP37
TNP38	TNP38	TNP38	TNP38	TNP38	TNP38
TNP39	TNP39	TNP39	TNP39	TNP39	TNP39
TNP40	TNP40	TNP40	TNP40	TNP40	TNP40
TNP41	TNP41	TNP41	TNP41	TNP41	TNP41

TNP42	TNP42	TNP42	TNP42	TNP42	TNP42
TNP43	TNP43	TNP43	TNP43	TNP43	TNP43
TNP44	TNP44	TNP44	TNP44	TNP44	TNP44
TNP45	TNP45	TNP45	TNP45	TNP45	TNP45
TNP46	TNP46	TNP46	TNP46	TNP46	TNP46
TNP47	TNP47	TNP47	TNP47	TNP47	TNP47
TNP48	TNP48	TNP48	TNP48	TNP48	TNP48
TNP49	TNP49	TNP49	TNP49	TNP49	TNP49
TNP50	TNP50	TNP50	TNP50	TNP50	TNP50
TNP51	TNP51	TNP51	TNP51	TNP51	TNP51
TNP52	TNP52	TNP52	TNP52	TNP52	TNP52
TNP53	TNP53	TNP53	TNP53	TNP53	TNP53
TNP54	TNP54	TNP54	TNP54	TNP54	TNP54
TNP55	TNP55	TNP55	TNP55	TNP55	TNP55
TNP56	TNP56	TNP56	TNP56	TNP56	TNP56
TNP57	TNP57	TNP57	TNP57	TNP57	TNP57
TNP58	TNP58	TNP58	TNP58	TNP58	TNP58
TNP59	TNP59	TNP59	TNP59	TNP59	TNP59
TNP60	TNP60	TNP60	TNP60	TNP60	TNP60
TNP61	TNP61	TNP61	TNP61	TNP61	TNP61
TNP62	TNP62	TNP62	TNP62	TNP62	TNP62
TNP63	TNP63	TNP63	TNP63	TNP63	TNP63
TNP64	TNP64	TNP64	TNP64	TNP64	TNP64
TNP65	TNP65	TNP65	TNP65	TNP65	TNP65
TNP66	TNP66	TNP66	TNP66	TNP66	TNP66
TNP67	TNP67	TNP67	TNP67	TNP67	TNP67
TNP68	TNP68	TNP68	TNP68	TNP68	TNP68
TNP69	TNP69	TNP69	TNP69	TNP69	TNP69
TNP70	TNP70	TNP70	TNP70	TNP70	TNP70
TNP71	TNP71	TNP71	TNP71	TNP71	TNP71
TNP72	TNP72	TNP72	TNP72	TNP72	TNP72
TNP73	TNP73	TNP73	TNP73	TNP73	TNP73
TNP74	TNP74	TNP74	TNP74	TNP74	TNP74
TNP75	TNP75	TNP75	TNP75	TNP75	TNP75
TNP76	TNP76	TNP76	TNP76	TNP76	TNP76
TNP77	TNP77	TNP77	TNP77	TNP77	TNP77
TNP78	TNP78	TNP78	TNP78	TNP78	TNP78
TNP79	TNP79	TNP79	TNP79	TNP79	TNP79
TNP80	TNP80	TNP80	TNP80	TNP80	TNP80
TNP81	TNP81	TNP81	TNP81	TNP81	TNP81
TNP82	TNP82	TNP82	TNP82	TNP82	TNP82

**PLAKA 1-4: 376 örnek, PLAKA 5: 288 örnek, PLAKA 6: 178 örnek içermektedir. Her bir plaka içerisinde homozigot, heterozigot, yabanıl tip (WT) genotip ve negatif kontrol için 2 tekrarlı kontrol kuyuları bulunmaktadır.*

Çizelge 7.6. Avrupa'da yapılan GWAS sonrasında anlamlı bulunan TNP'ler.

Kromozom Lokusu	Yakın Gen(ler)	TNP rs numarası	p değeri	Hasta/Kontrol Sayısı	Lokasyon	Referans	PMID ID
1q25.3	LAMC1	rs10911251	$1.75x10^{-8}$	5.626/7817	intronik	Whiffin vd. 2014	24737748
1q41	DUSP10	rs6691170*	$9.55x10^{-10}$	18.095/20.197	intronik	Houlston vd. 2010	20972440
3q26.2	TERC, MYNN	rs10936599	3.39 E-8	18.095/20.197	3' intergenik, intronik	Houlston vd. 2010	20972440
6p21.2	CDKN1A	rs1321311	$1.14x10^{-10}$	29.778/29.204	5' intergenik	Dunlop vd. 2012	22634755
8q23.3	EIF3H	rs16892766	$3.3x10^{-18}$	7792/7792	5' intergenik	Tomlinson vd. 2008	18372905
8q24	CCAT2/CASC8	rs6983267 *	$3.16x10^{-11}$	7480/7779	gen içi/intronik	Zanke vd. 2007	17618283
			$1.27X10^{-14}$	4.361/3.752		Tomlinson vd. 2007	17618284
9p24.1	UHRF2, TPD52L3	rs719725	0.011	2195/3581	3', 5' intergenik	Poynter vd. 2007	18056436
10p14	GATA3	rs10795668	$2.5x10^{-13}$	7792/7792	3' intergenik	Tomlinson vd. 2008	18372905
10q24.2	ABCC2, MRP2	rs1035209 *	$4.54x10^{-11}$	5.626/ 7817	5' intergenik	Whiffin vd. 2014	24737748
11q13.4	POLD3	rs3824999	$3.65x10^{-10}$	29.778/29.204	intronik	Dunlop vd. 2012	22634755
11q23.1	FLJ45803	rs3802842	$5.8x10^{-10}$	14.500/13.294	intronik	Tenesa vd. 2008	18372901
12p13.32	CCND2	rs3217810*	$2.16x10^{-10}$	5.626/ 7817	intronik	Whiffin vd. 2014	24737748
12q13	DIP2B, ATF1	rs11169552*	$1.89x10^{-10}$	18.095/ 20.197	5' intergenik	Houlston vd. 2010	20972440
12q13	DIP2B, ATF1	rs7136702*	$4.02x10^{-8}$	18.095/ 20.197	5' intergenik	Houlston vd. 2010	20972440
14q22.2	BMP4	rs4444235	$8.1x10^{-10}$	18.327/19.466	5' intergenik	Houlston vd. 2008	19011631
14q22.2	BMP4	rs1957636	1.36×10^{-9}	24.910/26.275	intronik	Tomlinson vd. 2011	21655089
15q13.3	SCG5, GREM1	rs4779584	$4.44x10^{-14}$	8.211/6.810	3' intergenik/ 5' intergenik	Jaeger vd. 2008	18084292
			Tag SNP	24.910/26.275		Tomlinson vd. 2011	21655089
15q13.3	SCG5, GREM1	rs16969681	$4.4X10^{-14}$	8.211/6.810	3' intergenik/ 5' intergenik	Jaeger vd. 2008	18084292
			5.33×10^{-8}	24.910/26.275		Tomlinson vd. 2011	21655089
15q13.3	SCG5, GREM1	rs11632715	$2.30\times10-10$	8.211/6.810	3' intergenik/ 5' intergenik	Jaeger vd. 2008	18084292
			2.30×10^{-10}	24.910/26.275		Tomlinson vd. 2011	21655089
16q22.1	CDH1	rs9929218	$4.6x10^{-9}$	18.327/19.466	intronik	Houlston vd. 2008	19011631
18q21.2	SMAD7	rs4939827	$1.0x10^{-12}$	7.473/5.984	intronik	Broderick vd. 2007	17934461
19q13.11	RHPH2, GPATCH1	rs10411210	$4.6x10^{-9}$	18.327/19.466	intronik	Houlston vd. 2008	
20p12.3	BMP2	rs961253	$2x10^{-10}$	18.327/19.466	5' intergenik	Houlston vd. 2008	19011631
20p12.3	BMP2	rs4813802	7.52×10^{-11}	18.327/19.466	5' intergenik	Houlston vd. 2008	19011631
			4.65×10^{-11}	24.910/26.275		Tomlinson vd. 2011	21655089
20q13.33	LAMA5	rs4925386*	$1.89x10^{-10}$	18.095/ 20.197	intronik	Houlston vd. 2010	20972440
Xp22.2	SHROOM2	rs5934683	$7.30x10^{-10}$	29.778/29.204	5' intergenik	Dunlop vd. 2012	22634755

* *İşaretli TNP'ler tüm örneklerde çalışılmıştır.*

Çizelge 7.7. Avrupa GWAS çalışmaları ile KRK ilişkili bulunan çalışmaya ek olarak çalışılan TNP'ler

Kromozom Lokusu	Yakın Gen(ler)	TNP rs numarası	p değeri	Hasta/Kontrol Sayısı	Lokasyon	Referans	PMID ID
1q41	DUSP10	rs6691170	$9.55x10^{-10}$	18.095/20.197	intronik	Houlston vd. 2010	20972440
8q24	CCAT2/CASC8	rs6983267	$3.16x10^{-11}$	7.480/7.779	gen içi/intronik	Zanke vd. 2007	17618283
			$1.27X10^{-14}$	4.361/3.752		Tomlinson vd. 2007	17618284
10q24.2	ABCC2, MRP2	rs1035209	$4.54x10^{-11}$	5.626/ 7817	5' intergenik	Whiffin vd. 2014	24737748
12p13.32	CCND2	rs3217810	$2.16x10^{-10}$	5.626/ 7817	intronik	Whiffin vd. 2014	24737748
12q13	DIP2B, ATF1	rs11169552	$1.89x10^{-10}$	18.095/ 20.197	5' intergenik	Houlston vd. 2010	20972440
12q13	DIP2B, ATF1	rs7136702	$4.02x10^{-8}$	18.095/ 20.197	5' intergenik	Houlston vd. 2010	20972440
20q13.33	LAMA5	rs4925386	$1.89x10^{-10}$	18.095/ 20.197	intronik	Houlston vd. 2010	20972440

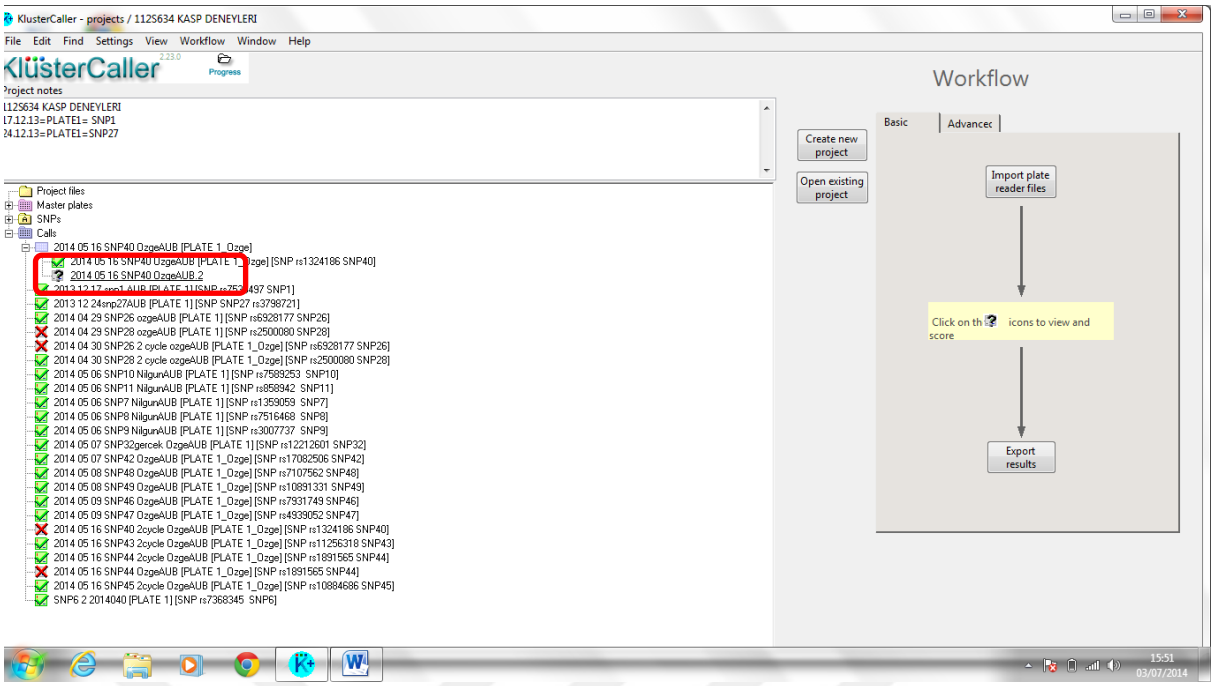
Çalışmada ilk 4 plakada 376 örnek çalışılmıştır. Son iki plakada ise 288 ve 178 örnek çalışılmıştır. Her bir plaka içerisinde homozigot, heterozigot, yabanıl tip (WT) genotip ve negatif kontrol için 2 tekrarlı kontrol kuyuları bulunmaktadır. Toplamda 1967 örnek 82 TNP için çalışılmıştır. Ek [2]'de deneylerde kullanılan genel plaka düzeni verilmiştir. (Ek2). Ek[3]'de ise KASP analizlerinde kullanılan TNP bilgileri verilmiştir. (Ek3)

7.1.3.2. Ham Veri Analizi

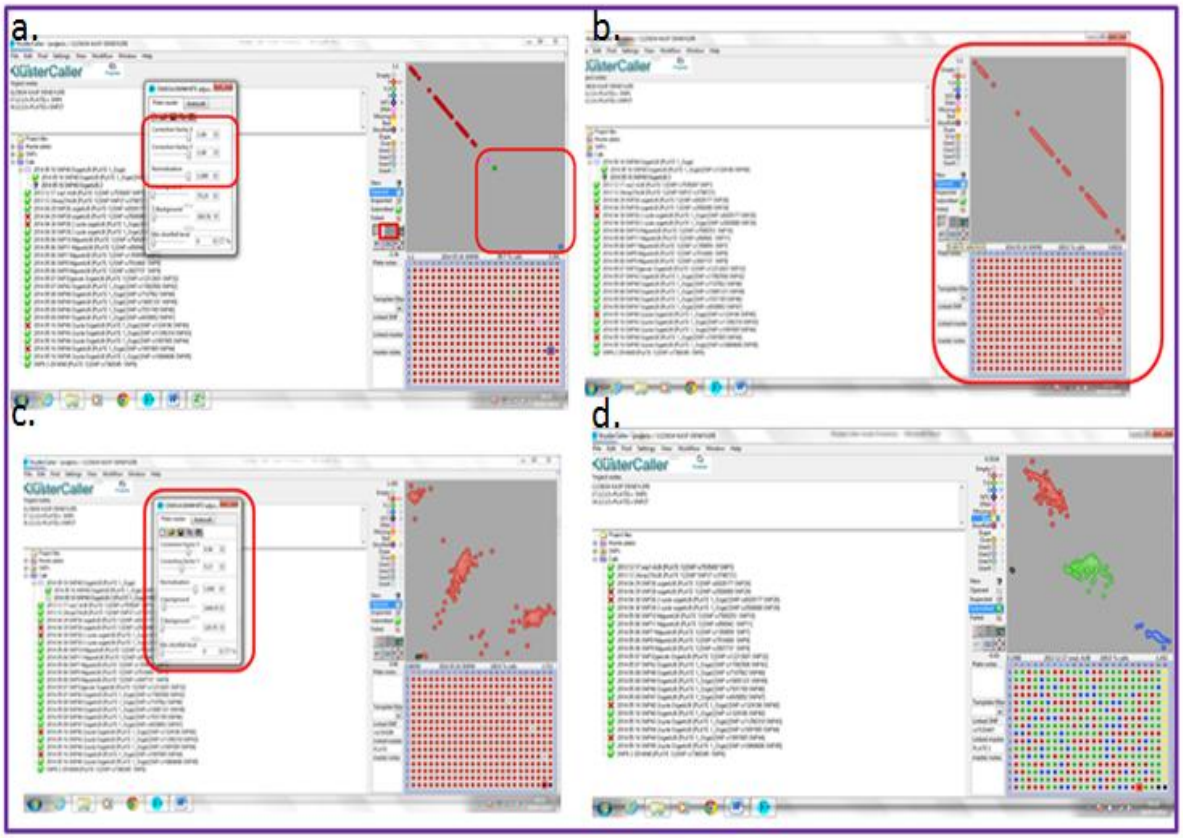
Hydrocycler cihazı ile allel spesifik PCR KASP yapılmıştır. Sonrasında, plaka okuyucu olan Omega cihazı ile örnek kuyularında yer alan FAM veya HEX probları dat. dosyası şeklinde alınmıştır. Sonuç dosyası ise "Klustercaller" programı ile analiz edilmiştir. Kluster Caller programında analiz edilecek örnek plaka görüntüsü aşağıda gösterilmiştir (Şekil 7.2). Şekil 7.3 a ve b'de analiz programı içerisinde normalize edilmiş, şekil 7.3.c ve d'de ise analiz edilmiş örnek plaka görüntüsü bulunmaktadır. Şekil 7.4'de ise, rs17082506 isimli TNP için yapılan analiz sonunda örnek sonuçlarının yer aldığı csv.dosyası gösterilmiştir.

[2] EK 2: 112S634-KASP Çalışma Plate'i düzeni

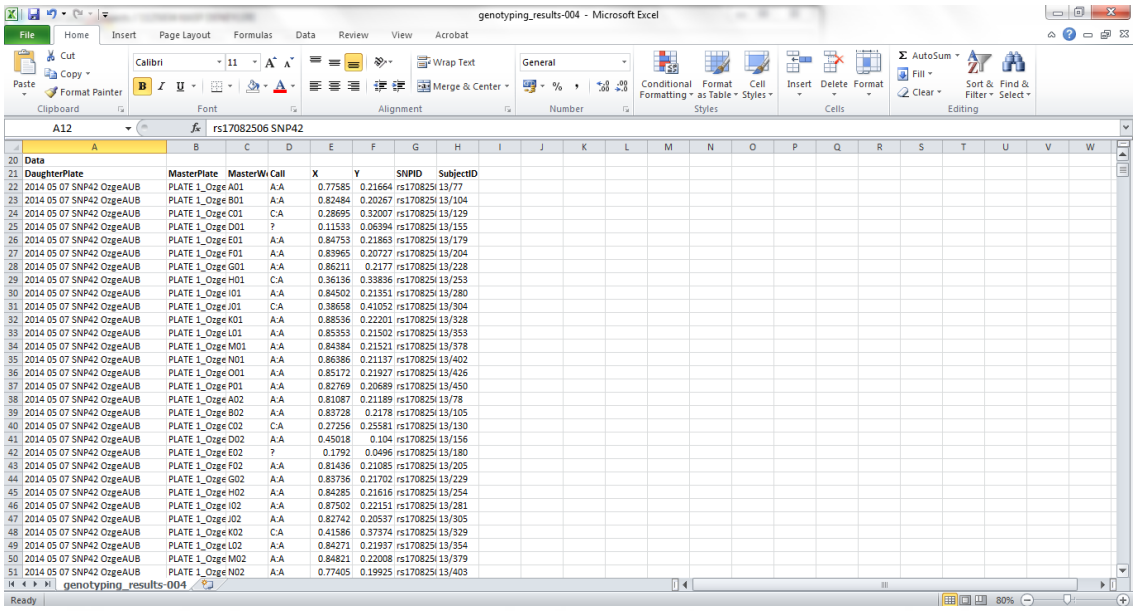
[3] EK 3: KASP Deneylerinde kullanılmış TNP isimleri, rs numarası ve allel bilgileri



Şekil 7.2. KlusterCaller analiz penceresi analiz edilecek örnek genel görünümü



Şekil 7.3. 384 örneklik bir plakanın normalizasyon ve gruplama analizi aşamaları



Şekil 7.4 rs17082506 isimli TNP için yapılan analiz sonunda örnek sonuçlarının yer aldığı csv.dosyası

7.1.3.3. İstatistiksel Analiz

7.1.3.4. Asosiyasyon Değerlendirmeleri

82 TNP için genotipleme analizleri Ki Kare testi ile beklenen ile gözlenen arasındaki fark aranarak yapılmıştır. Bu analizler aşağıdaki gibi yapılmıştır:

1. **Tüm Türkiye** esas alınarak
2. 7 coğrafik bölge esasında **doğum yeri** temel alınarak
3. 7 coğrafik bölge esasında **ikamet adresi** temel alınarak

Aşağıdaki 4 ayrı çizelgede genotipleme deneyi yapılan 82 TNP için istatistiksel analiz sonuçları verilmiştir. Her bölge ve TNP için ayrı çizelgeler oluşturulmuştur. Çizelge 7.8, Çizelge 7.9, Çizelge 7.10'da Türkiye geneli ve coğrafik bölgelere göre Cochran-Armitage'in ki-kareli eğilim testi yapılarak p anlamlılık değeri 0.05'den düşük olduğu belirlenen TNP'ler gösterilmiştir. Eklerde ise istatistiksel olarak çalışma-kontrol grubu kıyaslandığında anlamlı olduğu belirlenen TNP'lerin göreceli olasılıklar oranı (OR) ve güven aralığı (CI) içeren değerler verilmiştir.

75 TNP'ye ek olarak daha önce Avrupa popülasyonunda hastalık ile çok düşük p değeri ($p<10^{-8}$) ile ilişkili bulunmuş 7 TNP de bu çalışmaya ilave olarak incelenmiştir. Aşağıdaki

Çizelge 8.8'de bu TNP'ler ayrıntılı olarak verilmiştir. Bu TNP'ler arasından ise sadece 1 TNP hastalık ile ilişkili bulunmuştur ($p<0.05$).

Tüm bu analizler sonucunda çalışma grubumuzda toplamda 82 TNP'den 6 TNP Türk toplumunda Ki kare testi analizi ile $p<0.05$ olarak sporadik KRK ile ilişkili bulunmuştur. Anlamlı bulunan bu TNP'ler aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda, Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. Bu filtreleme sonrasında ise sadece rs6826441 değişimi anlamlı olarak bulunmuştur (Çizelge 8.1).

Genotipleme sonuçları ikamet yerine göre gruplanarak Cochran-Armitage'in ki-kareli eğilim testi yapıldığında 21 farklı TNP için 22 p değeri anlamlı sonuç vermiştir. TNP42 İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgelerinde birlikte anlamlı bulunmuştur. Akdeniz bölgesi 2, Doğu Anadolu bölgesi 1, Ege bölgesi 3, Güney Doğu Anadolu bölgesi 5, İç Anadolu bölgesi 5, Karadeniz bölgesi 4, Marmara bölgesi 1 TNP bakımından KRK ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıntılı bilgi Çizelge 7.8'de verilmiştir.

Çizelge 7.8. İkamet adresi temel alınarak, Türkiye coğrafik bölgelerine göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilen TNP'ler

İkamet yeri bölgesine göre Ki kare testi p<0.05 TNP'ler									
TNP	**rs numarası**	**Bölge**	**n**	**n.(kayıp)**	**ki-kare**	**p-değeri**	**p<0.05**	**Kromozom**	**Gen sembolü**
2	rs7523855	Karadeniz	330	2	4.49	0.0341	*	1p36.12	ALPL
4	rs582435	Güney Doğu Anadolu	50	1	4.447	0.035	*	1p31.1	CTH , PTGER3
8	rs7516468	Akdeniz	348	16	4.51	0.0337	*	1q32.2	C4BPA , CD55
10	rs7589253	İç Anadolu	386	14	4.925	0.0265	*	2p24.2	NT5C1B , KCNS3 , RDH14
16	rs4678850	Karadeniz	330	7	4.526	0.0334	*	3p22.3	STAC , ARPP21
19	rs6826441	Marmara	419	7	8.448	0.0037	*	4p15.2	STIM2 , PCDH7
22	rs10067633	İç Anadolu	386	11	6.469	0.011	*	5q11.2	SNX18 , ESM1
23	rs1820132	Akdeniz	348	19	5.732	0.0167	*	5q11.2	SNX18 , ESM1
33	rs6463159	Ege	85	3	5.216	0.0224	*	7p14.1	MRPL32 , HECW1
39	rs7858815	Güney Doğu Anadolu	50	2	5.689	0.0171	*	9p24.1	PTPRD
40	rs1324186	Ege	85	2	3.923	0.0476	*	9p23	NFIP, MPDZ
42	rs17082506	İç Anadolu	386	12	4.614	0.0317	*	9q21.31	PSAT1 , TLE4
42	rs17082506	Doğu Anadolu	127	2	8.229	0.0041	*	9q21.31	PSAT1 , TLE4
43	rs11256318	Güney Doğu Anadolu	50	2	4.275	0.0387	*	10p14	LOC105376402, CELF2
57	rs1295782	Güney Doğu Anadolu	50	3	4.058	0.044	*	14q24.1	RAD51B
59	rs1242118	Karadeniz	330	9	4.309	0.0379	*	14q32.12	LGMN
63	rs4283324	İç Anadolu	386	10	5.583	0.0181	*	18q22.1	CDH7 , CDH19
66	rs6034740	Karadeniz	330	9	4.419	0.0355	*	20p12.1	LOC105372544, LOC105372543
71	rs5915502	İç Anadolu	386	8	4.639	0.0313	*	Xp22.32	PRKX , NLGN4X
73	rs16829831	Karadeniz	330	7	5.169	0.023	*	3q25.32	MFSD1 , IQCJ
74	rs4769957	Ege	85	5	5.503	0.019	*	13q12.11	GJA3
80	rs11169552	Güney Doğu Anadolu	50	2	5.484	0.0192	*	12q13.12	ATF1

Çizelge 7.9. Doğum yeri temel alınarak, Türkiye coğrafik bölgelerine göre istatistiksel ol arak anlamlı olduğu gösterilen TNP'ler

Doğum yeri bölgesine göre Ki kare testi p<0.05 TNP'ler									
TNP	rs numarası	Bölge	n	n.(kayıp)	ki-kare	p-value	p<0.05	Kromozom lokalizasyonu	Genin sembolü
2	rs7523855	Doğu Anadolu	240	5	4.668	0.0307	*	1p36.12	ALPL
3	rs635833	Karadeniz	491	4	5.669	0.0173	*	1p32.2	C8A
9	rs3007737	Marmara	263	4	5.417	0.0199	*	1q43	KMO
12	rs765336	Akdeniz	289	6	3.904	0.0482	*	2q22.1	THSD7B
13	rs7590275	Güney Doğu Anadolu	118	0	4.039	0.0445	*	2q31.1	METTL8
13	rs7590275	Karadeniz	491	8	6.108	0.0135	*	2q31.1	METTL8
16	rs4678850	Ege	102	3	4.063	0.0438	*	3p22.3	RFC3P1
16	rs4678850	Marmara	263	3	4.087	0.0432	*	2q31.1	METTL8
19	rs6826441	Akdeniz	289	13	5.804	0.016	*	4p15.2	STIM2 , PCDH7
19	rs6826441	Doğu Anadolu	240	7	5.1	0.0239	*	4p15.2	STIM2 , PCDH7
19	rs6826441	Karadeniz	491	9	5.491	0.0191	*	4p15.2	STIM2 , PCDH7
22	rs10067633	İç Anadolu	349	8	5.265	0.0218	*	5q11.2	SNX18 , ESM1
28	rs2500080	İç Anadolu	349	20	4.947	0.0261	*	6p23	CD83 , JARID2
36	rs10101055	Doğu Anadolu	240	14	5.294	0.0214	*	8q24.13	HAS2 , ZHX2 , HAS2AS
38	rs41470645	Güney Doğu Anadolu	118	6	8.289	0.004	*	8q24.23	KHDRBS3 , FAM135B
39	rs7858815	İç Anadolu	349	11	5.701	0.017	*	9p24.1	PTPRD
39	rs7858815	Karadeniz	491	16	3.982	0.046	*	9p24.1	PTPRD
39	rs7858815	Güney Doğu Anadolu	118	6	4.095	0.043	*	9p24.1	PTPRD
40	rs1324186	Marmara	263	6	4.204	0.0403	*	9p23	MPDZ , NFIB
53	rs11215223	Ege	102	2	4.217	0.04	*	11q23.3	LOC105369505, LOC105369506
58	rs2597093	Marmara	263	11	4.799	0.0285	*	14q31	NRXN3
59	rs1242118	Ege	102	2	4.502	0.0339	*	14q32.12	LGMN
59	rs1242118	Doğu Anadolu	240	11	10.504	0.0012	*	14q32.12	LGMN
59	rs1242118	Karadeniz	491	13	4.404	0.0359	*	14q32.12	LGMN
61	rs2507373	Karadeniz	491	8	4.686	0.0304	*	15q21.1	SQRDL , SEMA6D
61	rs2507373	Marmara	263	7	4.579	0.0324	*	15q21.1	SQRDL , SEMA6D
63	rs4283324	İç Anadolu	349	11	5.11	0.0238	*	18q22.1	CDH7 , CDH19
64	rs878250	İç Anadolu	349	5	4.034	0.0446	*	20p13	RSPO4 , PSMF1
64	rs878250	Akdeniz	289	16	3.998	0.0455	*	20p13	RSPO4 , PSMF1
65	rs16998727	Karadeniz	491	15	3.941	0.0471	*	20p12.1	LOC105372544, LOC105372543
71	rs5915502	Doğu Anadolu	240	9	4.671	0.0307	*	Xp22.32	PRKX , NLGN4X
72	rs2495678	Akdeniz	289	9	4.307	0.038	*	Xq25	GLUD2 , GRIA3

Genotipleme sonuçları doğum yerine göre gruplanarak Cochran-Armitage'in ki-kareli eğilim testi yapıldığında 24 farklı TNP için 32 p değeri anlamlı sonuç vermiştir. TNP13 Güney Doğu Anadolu ve Karadeniz bölgelerinde birlikte anlamlı bulunmuştur. Yine TNP16 Ege ve Marmara bölgelerinde, TNP19 Akdeniz, Doğu Anadolu ve Karadeniz bölgelerinde, TNP39 İç Anadolu, Karadeniz ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde, TNP59 Ege, Doğu Anadolu ve Karadeniz bölgelerinde, TNP61 Karadeniz ve Marmara bölgelerinde, TNP64 İç Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde birlikte anlamlı bulunmuştur. Akdeniz bölgesi 4, Doğu Anadolu bölgesi 5, Ege bölgesi 3, Güney Doğu Anadolu bölgesi 3, İç Anadolu bölgesi 5, Karadeniz bölgesi 7, Marmara bölgesi 5 TNP bakımından KRK ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıntılı bilgi Çizelge7.9'da verilmiştir.

Türkiye genelinde 82 TNP arasında 6 TNP için (rs635833, rs3007737, rs6826441, rs10067633, rs16829831, rs6983267) istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 7.10).

Çizelge 7.10 Türkiye geneline göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilen TNP'ler

Türkiye geneline göre Ki kare testi p<0.05 TNP'ler											
TNP No	**rs numarası**	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**p<0.05**	**p<0.0006 (bonf.)**	**Kromozom**	**Gen sembolü**	**Değişim**	**OR (Allel)**
3	rs635833	1967	33	6.263	**0.0123**	*		1p32.2	*C8A, C8B, DAB1*	A>G	1.278 (G)
9	rs3007737	1967	40	5.555	**0.0184**	*		1q43	*KMO, FH, OPN3*	A>G	1.17 (G)
19	rs6826441	1967	49	12.682	**$4x10^{-4}$**	*	*	4p15.2	*STIM2*	A>G	1.274 (A)
22	rs10067633	1967	56	5.589	**0.0181**	*		5q11.2	*SNX18 HSB3*	C>T	1.2 (T)
73	rs16829831	1967	56	3.946	**0.047**	*		3q25.32	*IQCJ-SCIP1, IQCJ, SCHIP1*	C>G	1.667 (C)
76	rs6983267	1967	65	9.757	**0.0018**	*		8q24	CCAT1, CCAT2, CASC8	G>T	1.225 (G)

Çizelge 7.11'de ise yukarda ayrıntılı bilgisi verilmiş tüm örnekler üzerinden yapılan ayrıntılı istatistik analiz sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre, TNP3 (rs635833) G alleli hastalarda; kontrol bireylere göre 1.278 kat, TNP9 (rs3007737) G alleli hastalarda kontrol bireylere göre 1.17 kat, TNP19 (rs6826441) A alleli hastalarda kontrol bireylere göre 1.274 kat, TNP22 (rs10067633) T alleli hastalarda kontrol bireylere göre 1.2 kat, TNP73 (rs16829831) C alleli hastalarda; kontrol bireylere göre 1.667 kat, TNP76 (rs6983267) G alleli hastalarda kontrol bireylere göre 1.225 kat fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 7.11. Türkiye geneli Hasta-Kontrol Grubunda farklı gözlenen TNP'ler için Göreceli Olasılıklar Oranı (OR) ve Güven Aralığı (CI) değerleri

Türkiye geneli 82 TNP arasından Ki kare testi anlamlı (p<0.05) bulunan TNP'LER Allel ve Genotip Frekans Sonuçları, OR değerleri							
rs635833 A>G	**G:G**	**G:A**	**A:A**	**rs3007737 A>G**	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	24	232	744	Çalışma	334	487	174
Kontrol	11	189	734	Kontrol	296	418	218
TNP3	**G**	**A**		**TNP9**	**G**	**A**	
Çalışma	280	1720		Çalışma	1155	835	
Kontrol	211	1657		Kontrol	1010	854	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**		**LowerCI**	**OR**	**UpperCI**
	1.056	1.278	1.547		1.03	1.17	1.328
rs6826441 A>G	**G:G**	**G:A**	**A:A**	**rs10067633 C>T**	**C:C**	**T:C**	**T:T**
Çalışma	127	419	444	Çalışma	41	355	583
Kontrol	142	451	335	Kontrol	70	337	525
TNP19	**G**	**A**		**TNP22**	**C**	**T**	
Çalışma	673	1307		Çalışma	437	1521	
Kontrol	735	1121		Kontrol	477	1387	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**		**LowerCI**	**OR**	**UpperCI**
	0.689	0.785	0.896		0.72	0.835	0.969
rs16829831 C>G	**G:G**	**G:C**	**C:C**	**rs6983267 G>T**	**G:G**	**T:G**	**T:T**
Çalışma	48	327	611	Çalışma	313	488	182
Kontrol	55	337	533	Kontrol	243	463	213
TNP73	**G**	**C**		**TNP76**	**G**	**T**	
Çalışma	423	1549		Çalışma	1114	852	
Kontrol	447	1403		Kontrol	949	889	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**		**LowerCI**	**OR**	**UpperCI**
	0.737	0.857	0.997		1.078	1.225	1.392

**OR değerleri çizelgedeki altı çizili ilk allele göre hesaplanmıştır.*

7.1.3.5. Fiksasyon İndeksi (Fst)

Coğrafik bölgeler göz önünde bulundurarak 75 TNP için AIM (ancestry-informative marker) panelinde bulunan Fst indeksi analizi yapılmıştır. Bu çalışmada ayrım yapılabilmesi için, 0.25 eşik değeri belirlenmiş ve 0.25 üzerindeki Fst değeri olan TNPler çalışmadan dışlanmıştır. Bu analiz sonunda, coğrafik bölge-TNP dağılımı sonucu, 2 TNP hariç Fst indeksi 0.25'ten düşük bulunmuştur (veriler eklenmemiştir). Aşağıdaki Çizelge 7.12'de

coğrafik bölge açısından Türkiye genelinde stratifikasyon gözlenen 2 TNP'nin bilgileri verilmiştir. Sonuç olarak bahsedilen 2 TNP istatistiksel analizlerden dışlanmıştır.

Çizelge 7.12. Bölgesel farklılık gösteren 2 TNP bilgileri

TNP NO	rs no	Allel 1	Allel 2
21	rs688551	A	G
62	rs4792074	A	C

7.1.3.6. HaploReg v4.1 Analizi Sonuçları

İstatistik analizler sonunda belirlenen 6 farklı TNP için haplotip analizleri yapılmıştır. Toplamda rs10067633 için 2, rs6983267 için 3, rs635833 için 10, rs3007737 için 2, rs6826441 için 35, rs16829831 için 49 TNP'nin birlikte r^2=0.8 olarak LD gösterdiği ve haplotip oluşturduğu belirlenmiştir. Aşağıdaki çizelgede HaploReg v4.1 analiz sonuçlarının genel sonuçları verilmiştir (Çizelge 7.13). Bu sonuçlara göre 75 TNP arasından valide edilen 5 TNP daha önceki GWAS'larda gösterilmemiştir. Ayrıca çalışmamızda anlamlı bulunan TNP'ler regülatör bölge, protein bağlanma, QTL analizlerinde sonuç vermiştir. Bu bilgilerin kontrol edilmesi için literatür ve deneysel anlamda ileri analiz gerekmektedir. Ayrıntılı bilgi eklerde bulunmaktadır (Ek 5).

Çizelge 7.13. HaploReg v4.1 aracı gen-haplotip sonuçları

Ref Seq Gen İsmi	Haplotipdeki toplam TNP sayısı	Haplotip oluşturan TNP'ler rs ID	TNP Lokasyonu
C8A	10	**rs635833**	intronik
		rs623077	intronik
		rs706480	C8A geni 3' ucu 2.5kb
		rs147415061	C8A geni 3' ucu 3.8kb
		rs605648	intronik
		rs652553	intronik
		rs676480	intronik
		rs669358	intronik
		rs10536989	intronik
		rs598772	intronik
KMO	2	rs6658805	intronik
		rs3007737	intronik
SNX18	2	rs766529	SNX18 geni 3' ucu 31kb
		rs10067633	SNX18 geni 3' ucu 32kb
POUF1B	3	rs10505477	POUF1B geni 5' ucu 20kb
		rs12682374	POUF1B geni 5' ucu 17kb
		rs6983267	POUF1B geni 5' ucu 15kb

STIM2	35	rs1982811	STIM2 geni 3' ucu 160kb
		rs1982810	STIM2 geni 3' ucu 160kb
		rs10000844	STIM2 geni 3' ucu 169kb
		rs2087260	STIM2 geni 3' ucu 170kb
		rs7662141	STIM2 geni 3' ucu 174kb
		rs1488287	STIM2 geni 3' ucu 174kb
		rs1488286	STIM2 geni 3' ucu 175kb
		rs1488285	STIM2 geni 3' ucu 175kb
		rs1488284	STIM2 geni 3' ucu 175kb
		rs13144865	STIM2 geni 3' ucu 175kb
		rs6825535	STIM2 geni 3' ucu 175kb
		rs6826441	STIM2 geni 3' ucu 176kb
		rs6857150	STIM2 geni 3' ucu 176kb
		rs979623	STIM2 geni 3' ucu 176kb
		rs979622	STIM2 geni 3' ucu 176kb
		rs5856976	STIM2 geni 3' ucu 176kb
		rs4103808	STIM2 geni 3' ucu 177kb
		rs4692178	STIM2 geni 3' ucu 177kb
		rs1565188	STIM2 geni 3' ucu 177kb
		rs7660015	STIM2 geni 3' ucu 177kb
		rs993395	STIM2 geni 3' ucu 178kb
		rs7659051	STIM2 geni 3' ucu 179kb
		rs7683751	STIM2 geni 3' ucu 179kb
		rs6448502	STIM2 geni 3' ucu 179kb
		rs965978	STIM2 geni 3' ucu 179kb
		rs7666254	STIM2 geni 3' ucu 180kb
		rs2220404	STIM2 geni 3' ucu 180kb
		rs2200691	STIM2 geni 3' ucu 180kb
		rs2220403	STIM2 geni 3' ucu 180kb
		rs4504235	STIM2 geni 3' ucu 181kb
		rs4298124	STIM2 geni 3' ucu 181kb
		rs1488268	STIM2 geni 3' ucu 183kb
		rs1488269	STIM2 geni 3' ucu 183kb
		rs3947590	STIM2 geni 3' ucu 188kb
		rs7683268	intronik
IQCJ	49	rs56324519	IQCJ geni 5' ucu 19kb
		rs6807606	IQCJ geni 5' ucu 19kb
		rs1566550	IQCJ geni 5' ucu 19kb
		rs9872767	IQCJ geni 5' ucu 18kb
		rs9821195	IQCJ geni 5' ucu 18kb
		rs2102108	IQCJ geni 5' ucu 18kb
		rs2088850	IQCJ geni 5' ucu 18kb
		rs6765871	IQCJ geni 5' ucu 17kb

		rs115747548	IQCJ geni 5' ucu 17kb
		rs2134030	IQCJ geni 5' ucu 16kb
		rs1976409	IQCJ geni 5' ucu 16kb
		rs61795961	IQCJ geni 5' ucu 16kb
		rs66556054	IQCJ geni 5' ucu 16kb
		rs9850989	IQCJ geni 5' ucu 15kb
		rs67625330	IQCJ geni 5' ucu 14kb
		rs9842572	IQCJ geni 5' ucu 14kb
		rs9843076	IQCJ geni 5' ucu 14kb
		rs9823603	IQCJ geni 5' ucu 14kb
		rs58791262	IQCJ geni 5' ucu 11kb
		rs16844902	IQCJ geni 5' ucu 11kb
		rs1501280	IQCJ geni 5' ucu 11kb
		rs6768168	IQCJ geni 5' ucu 11kb
		rs6768479	IQCJ geni 5' ucu 11kb
		rs16829831	IQCJ geni 5' ucu 11kb
		rs28526501	IQCJ geni 5' ucu 10kb
		rs4680488	IQCJ geni 5' ucu 8.7kb
		rs6791973	IQCJ geni 5' ucu 7.7kb
		rs74951474	IQCJ geni 5' ucu 7.7kb
		rs6779213	IQCJ geni 5' ucu 7.7kb
		rs6782012	IQCJ geni 5' ucu 7.3kb
		rs58260218	IQCJ geni 5' ucu 7kb
		rs12495683	IQCJ geni 5' ucu 6.8kb
		rs12495742	IQCJ geni 5' ucu 6.6kb
		rs16829848	IQCJ geni 5' ucu 5.8kb
		rs61221330	IQCJ geni 5' ucu 5.5kb
		rs1501286	IQCJ geni 5' ucu 2.8kb
		rs974155	intronik
		rs59930845	intronik
		rs61795965	intronik
		rs16829875	intronik
		rs139496364	intronik
		rs145561447	intronik
		rs150431679	intronik
		rs141971763	intronik
		rs59794476	intronik
		rs61796004	intronik
		rs61796008	intronik
		rs2134029	intronik
		rs4094324	intronik
*koyu işaretli TNP'ler çalışmamızda KRK ile ilişkili bulunan TNP'lerdir.			

7.2. YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ ARAŞTIRMA BULGULARI

7.2.1. NANODROP SONUÇLARI

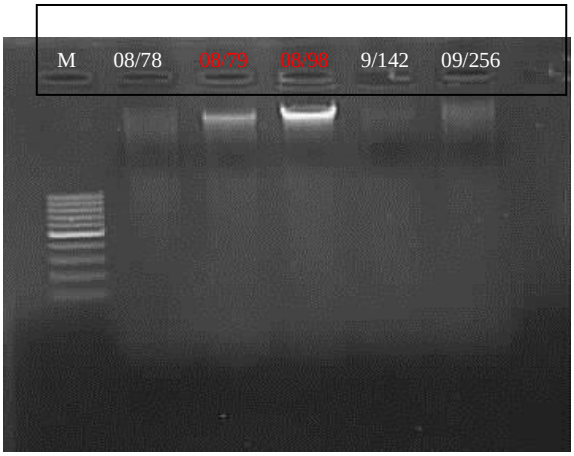
Yeni nesil DNA dizi analizi yapılan 4 örnek için Nanodrop ölçüm tablosu ve toplam DNA miktar hesaplanması aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir. Yeni nesil DNA dizi analizi için gönderilen örnekler gri renk ile işaretlenmiştir (Çizelge 7.14).

Çizelge 7.14. Çalışmaya dâhil edilen örneklerin kalitatif ve kantitatif analizi

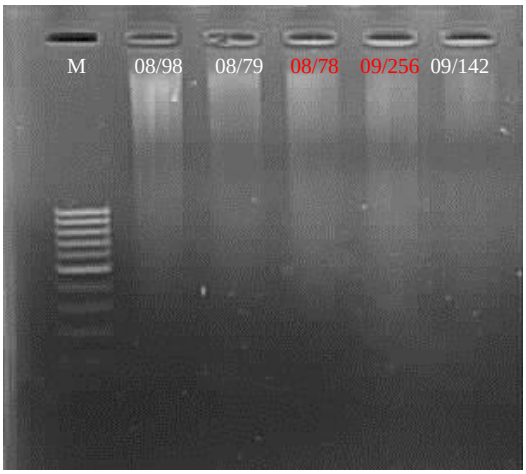
Örnek No	Konsantrasyon (ng/ul)	A°260/280	A 260/230	Toplam Hacim (µl)	Toplam DNA miktarı (ng)	Yöntem
08/98	234.03	1.91	2.23	140	32764.2	Promega
08/98	307.16	1.93	2.37	150	46074	fenol-kloroform
08/79	102.23	1.82	2.14	140	14312.2	Promega
08/79	152.92	1.88	2.41	150	22938	fenol-kloroform
08/78	139.99	1.77	2.43	140	19598.6	Promega
08/78	174.39	1.85	2.38	150	26158.5	fenol-kloroform
09/256	127.72	1.91	2.29	140	17880.8	Promega
09/256	152.24	1.87	2.34	150	22836	fenol-kloroform

7.2.2. ELEKTROFOREZ

Kurucu etkisi belirlenen 6 örnek arasından -80 stoklarında mevcut olan 5 örnek için iki farklı izolasyon yöntemi ile elde edilen %1lik Agaroz jel görüntüleri aşağıda verilmiştir. Yeni nesil DNA dizi analizi için seçilen 4 örnek kırmızı renk ile aşağıda gösterilmiştir (Şekil 7.5, Şekil 7.6).



Şekil 7.5. Promega ile gDNA izolasyon 1'lik agaroz jel görüntüsü

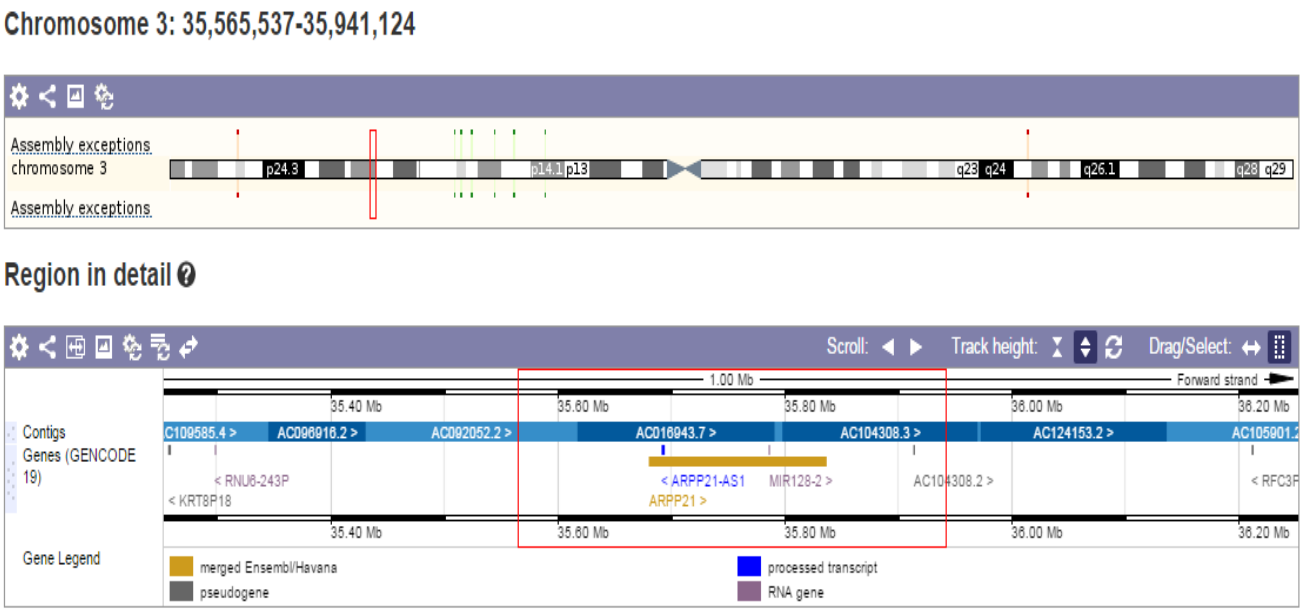


Şekil 7.6. Klasik Fenol-Kloroform yöntemi ile gDNA izolasyon 1'lik agaroz jel görüntüsü

7.2.3. YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ

Yeni Nesil DNA dizi analizi ile 107S438 numaralı projede belirlenmiş kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş ve kurucu etkisi (founder effect) belirlendiği düşünülen 3p22.3 (35565537-35941124) bölgesinde 1 Mb genomik bölge incelenmiştir. Buna göre, DNA izolasyonu yapılmış örnekler yüksek işlem hacmi ve düşük maliyet nedeniyle yeni nesil dizi DNA analizi ile bu bölge incelenmiştir. Aşağıda Şekil 7.7'da incelenen bölgenin genel görünümü verilmiştir.

Hizmet alımı ile yeni nesil DNA dizi analizi yapılan 4 örneğin ham verilerinin kalite kontrol skorları aşağıda Çizelge 7.15'de verilmiştir.



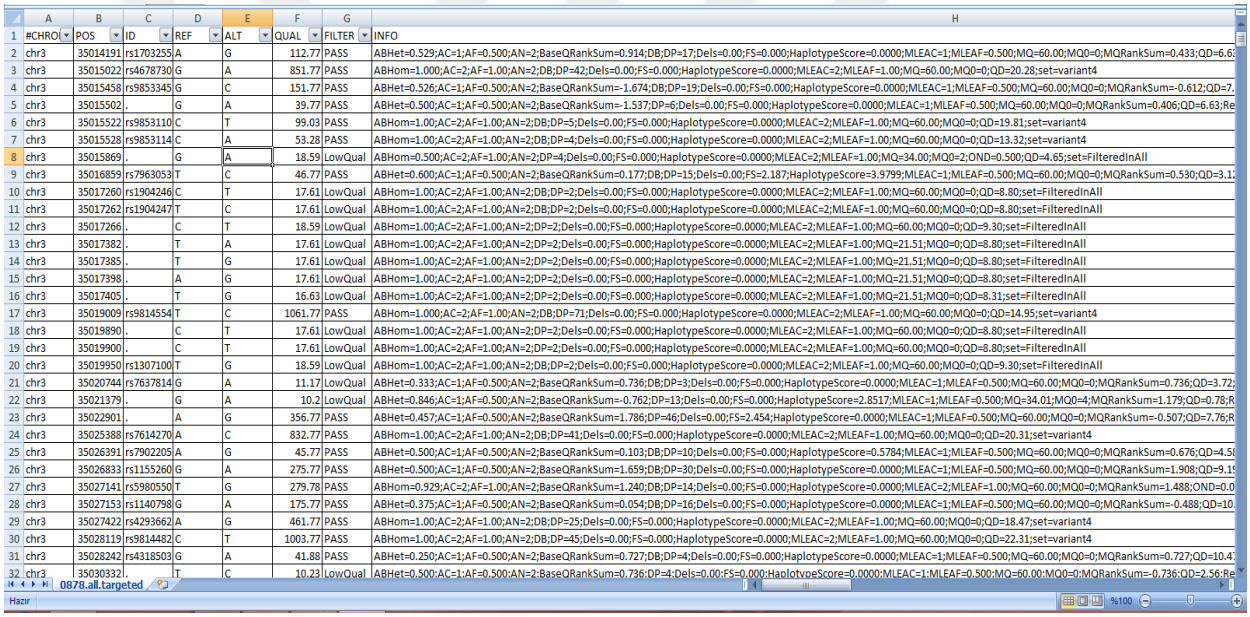
Şekil 7.7. Yeni nesil DNA dizi analizi yapılan genomik bölgenin şematize görüntüsü (144)

Çizelge 7.15. Yeni nesil DNA dizi analizi yapılan 4 örnek kalite kontrol skorları

Örnek No	Örnek Referans	Index	Tanım	Ürün (Mb)	% PF	# Okuma	Her bir sırada ham küme %si	Mükemmel indeks okuma %	Bir Yanlış okuma (İndeks) %	Q30 Baz % (PF)	Ortalama kalite skoru (PF)
08/78	Fastq	ATCACG	0878 Ind: ATCACG	10,154	100	100,532,708	34.77	98.91	1.09	91.86	35.64
08/79	Fastq	TTAGGC	0879 Ind: TTAGGC	6,416	100	63,527,162	21.97	97.41	2.59	93.06	36.09
08/98	Fastq	TGACCA	0898 Ind: TGACCA	6,151	100	60,899,042	21.07	98.18	1.82	93.03	36.08
09/79	Fastq	CGATGT	0979 Ind: CGATGT	5,831	100	57,729,112	19.97	97.54	2.46	92.14	35.65

7.2.4. BİYOİNFORMATİK ANALİZ

Biyoinformatik analiz sonrasında elde edilen VCF dosyası Excel formatına dönüştürülerek izlenebilir hale getirilmiştir. Şekil 7.8'de 1 örnek için temsili sonuç dosyası görüntüsü verilmiştir.

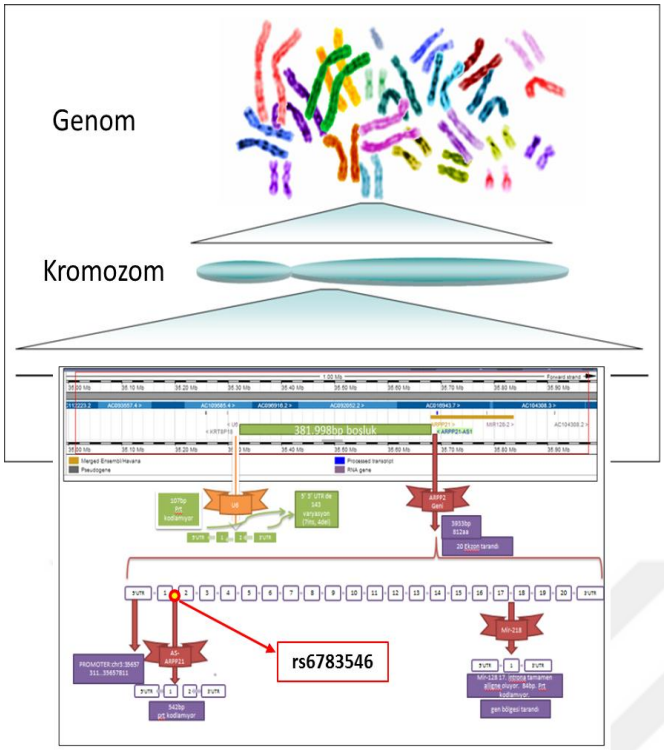


Şekil 7.8. Yeni nesil DNA dizi analizi biyoinformatik analiz sonrası temsili 1 örneğin tablo görüntüsü

7.2.5. YENİ NESİL DİZİ ANALİZİ BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ

Kurucu etkisi belirlendiği düşünülen 1Mb'lık alan yeni nesil sekans analizi tezin önceki kısımlarında da belirtilmiştir. Buna göre, bu bölge içinde aşağıda şekilde de gösterildiği

üzere ARPP21, ARPP21-AS, hsa-mir128-2a genleri bulunmaktadır (Şekil 7.9).

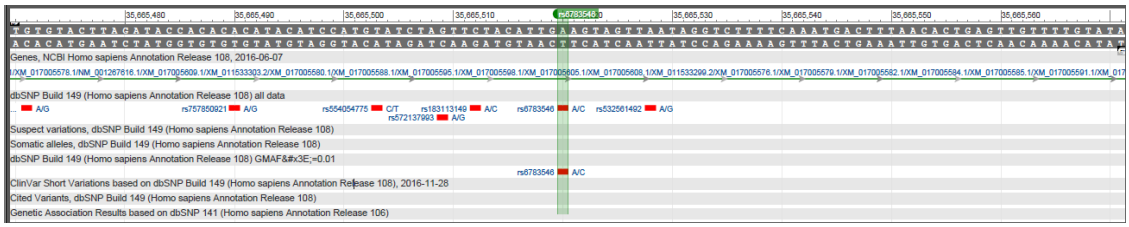


Şekil 7.9. Yeni nesil DNA dizi analizi yapılan bölge ayrıntılı görüntüsü

Yeni nesil DNA dizi analizi ile ARPP21 geni intronik bölgede (intron 1-2) yer alan rs6783546 A>C değişimi 1 hastada heterozigot 3 hastada ise homozigot mutant olarak belirlenmiştir (Şekil 7.10, Çizelge 7.16).

Çizelge 7.16. ARPP21 geni rs6783546A>C değişimi gösterilmiş hastalar yeni nesil DNA dizi analizi bilgisi

Örnek	Kromozom	Koordinat	Atasal Allel	Genotip	Derinlik
08/78	3	35707012	A	C/C	28
08/98	3	35707012	A	A*/C	19
08/79	3	35707012	A	C/C	34
09/79	3	35707012	A	C/C	19



Şekil 7.10. Yeni nesil analizine göre ARPP21 rs6783546A>C değişim noktası

8. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması Türk toplumunda aile temelli genom boyu asosiyasyon çalışması yapılmış ilk projedir. 75 TNP arasından valide edilen 5 TNP daha önce herhangi bir GWAS ile belirlenmemiştir. Bu TNP'lerin kanser ile ilişkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Avrupa toplumlarında hastalık ilişkili bulunmuş TNP'lerden birisi Türk toplumunda ilk kez bu tez çalışmasında belirlenmiştir.

Uygulamada yaygın olarak kullanılan "Illimuna-Affymetrix" mikroçipleri üzerinde yapılan karşılaştırma analizlerinde, mikrodizinlerde yer alan TNP probları kıyaslandığında Illimuna problarının HapMap verisi ile daha fazla uyuştuğu gösterilmiştir (145). Literatürde özellikle Avrupa toplumlarında yapılmış GWAS'larda da sıklıkla Illumina analiz sistemi kullanılmıştır. Daha önce ayrıntısını verdiğimiz Avrupa toplumlarında ilişkilendirilmiş 26 TNP içinden aile temelli GWAS çalışmasında kullandığımız Affymetrix sisteminde tag veya direkt değişim noktasını kapsayan TNP problarından sadece 9'u yer almaktadır. Bu nedenle Affymetrix sisteminin kullanılması, çalışmamızın bir dezavantajı olarak nitelenebilir. Diğer yandan Illumina ve Affymetrix platformlarını paralel olarak değerlendiren kapsamlı çalışmalar bu iki sistemin sonuçlarının karşılaştırılabilirliğini göstermiştir (146,147). Sonuç olarak bu tez çalışmasında aile temelli GWAS ile belirlenmiş 75 aday TNP'nin içinden 5 TNP valide edilmiştir.

Önceki bölümde sonuçları verilmiş analizlerin tartışma metinleri daha kolay anlatılabilmesi ve anlaşılabilmesi için bölümlere ayrılmıştır. En son bölümde ise tüm sonuçlar sentezlenmeye çalışılmıştır. Bu bölümler aşağıda sıralanmıştır:

Genotipleme Analizleri-Tartışma ve Sonuç

GWAS sonrasında belirlenen intergenik veya intragenik TNP'lerin işlevsel olarak anlamlandırılabilmeleri için kesin bir yol haritası bulunmamaktadır. Ancak farklı gruplar tarafından farklı bakış açıları ile analizler yapılmaktadır. İntragenik değişimler basit anlamda bulunduğu geni işaret etse de intergenik bölgeler için böyle bir varsayım yapılaması daha zordur. Bugüne kadar yapılan çalışmalardan bir örnek vermek gerekirse GWAS ile belirlenen değişimler yaşam tarzı, aspirin kullanımı, beslenme gibi çevresel faktörler ile kıyaslanarak KRK yatkınlığı araştırılmıştır (148). Başka bir grupta ise, erken KRK hastalar ile kontrol bireyler kıyaslanmıştır (149). Ayrıca hastalık ile ilişkili bulunmuş TNP'lerle, haplotip analizi yapılarak hedef genomik bölge belirlenebilmektedir. İleri analizlere örnek

olarak HapMap projesi sonuçlarını temel alan GeneCluster aracı kullanılarak LD analizleri yapılabilmektedir. Belirlenen bölgede eQTL ile TNP'lerin bulunduğu genomik bölgedeki genlerin ifade seviyeleri ile entegrasyonu ile bu bölge ile ilişkili aday protein/genler belirlenebilmektedir (150). Tezin bu bölümünde çalışma grubumuzda KRK ile ilişkilendirilmiş TNP'lerin yakınındaki genlerin literatür bilgisi ile kanser/KRK ilişkisi tartışılmıştır. Bu genlerin birçoğu HaploReg aracı ile de gösterilmiştir. Ancak bu konuda literatür ve deneysel anlamda ileri analizler yapılması gerekmektedir.

İlk kez valide edilen aşağıda ayrıntısını verdiğimiz 5 TNP ve/veya tag TNP'leri; ENCODE, 1000 Genom Projesi veri tabanlarını kullanan HaploReg aracı (151) kullanılarak yapılan analize göre daha önceden herhangi bir GWAS ile gösterilmemiştir. Diğer yandan bazı TNP'ler QTL veya eQTL analizi ile fenotip ile ilişkilendirilmiştir. Avrupa toplumlarında gösterilmiş popülasyonumuzda valide edilmiş 1 TNP için de HaploReg aracı ile analizler yapılmıştır. Toplamda 6 TNP için HaploReg bulguları Çizelge7.13'te ve Ek5'te verilmiştir.

Genotipleme analizleri ve tüm örnekler üzerinden yapılan istatistik analizler sonucunda 75 TNP'den 5 TNP, 7 TNP'den de sadece 1 TNP hastalık ile ilişkili bulunmuştur ($p<0.05$). İkamet ve doğum yeri bilgisine göre gruplama yapılarak istatistiksel analizler yapılmış olsa da örnek sayısının bölgelere göre değişkenlik göstermesi, örneklem boyutunun dar olması ve en önemlisi yayın aşamasında olan grubumuz tarafından yapılan PCA sonuçlarında 7 coğrafik bölgenin genotipik olarak benzer dağılım göstermesi nedeni ile tartışma bölümünde sadece Türkiye geneli istatistik analiz sonuçları tartışılmıştır (Çizelge 8.1).

Çizelge 8.1. Tez çalışması sonunda Türkiye geneline göre sporadik KRK ilişkili Ki kare testi p<0.05 TNP'ler

Türkiye geneline göre Ki kare testi p<0.05 TNP'ler											
TNP No	**rs numarası**	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**p<0.05**	**p<0.0006 (bonf.)**	**Kromozom**	**Gen sembolü**	**Değişim**	**OR (Allel)**
3	rs635833	1967	33	6.263	**0.0123**	*		1p32.2	*C8A, C8B, DAB1*	A>G	1.278 (G)
9	rs3007737	1967	40	5.555	**0.0184**	*		1q43	*KMO, FH, OPN3*	A>G	1.17 (G)
19	rs6826441	1967	49	12.682	**$4x10^{-4}$**	*	*	4p15.2	*STIM2*	A>G	1.274 (A)
22	rs10067633	1967	56	5.589	**0.0181**	*		5q11.2	*SNX18 HSB3*	C>T	1.2 (T)
73	rs16829831	1967	56	3.946	**0.047**	*		3q25.32	*IQCJ-SCIP1, IQCJ, SCHIP1*	C>G	1.667 (C)
76	rs6983267	1967	65	9.757	**0.0018**	*		8q24	CCAT1, CCAT2, CASC8	G>T	1.225 (G)

Aşağıda p<0.05 olarak anlamlı bulunan bu TNP'lerin bilinen kanser veya kolorektal kanser metabolizmasındaki yerleri ayrı başlıklar altında anlatılmıştır. Ardından Avrupa popülasyonunda anlamlı olarak bulunmuş TNP'ler ve anlamlı olan bulunan TNP, kanser metabolizmasındaki bilinen yeri anlatılmıştır.

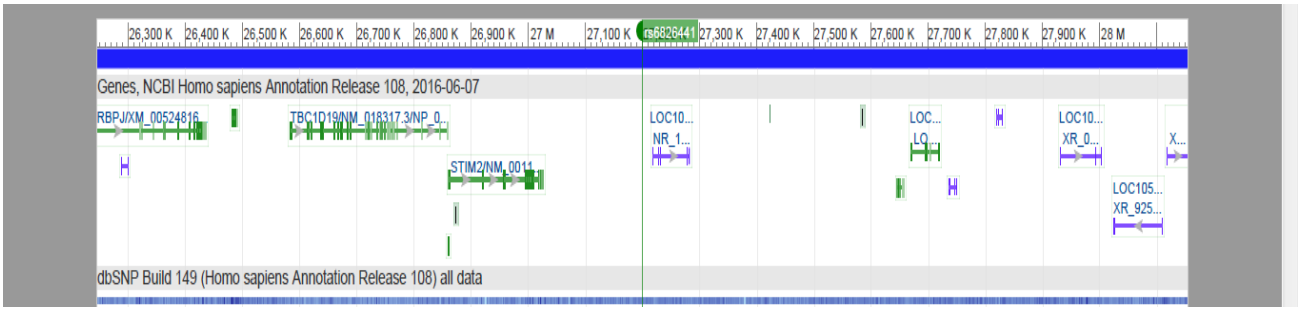
rs6826441, p=0.0004

İntergenik olan bu değişim 4p15.2'de lokalize olan p:0.0004 anlamlılık derecesi ile sporadik KRK gelişimi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. rs6826441 A>G değişimi dbSNP veritabanı ve literatüre göre herhangi bir hastalık ile ilişkilendirilmemiştir. rs6826441 G alelli hastalarda, kontrole göre 1.278 kat fazla bulunmuştur. Aşağıdaki çizelgede bu değişim yakın çevresinde yer alan genler verilmiştir (Çizelge 8.2). Gri ile işaretlenmiş genler bu değişimin 5' ve 3' tarafındaki genleri işaret etmektedir.

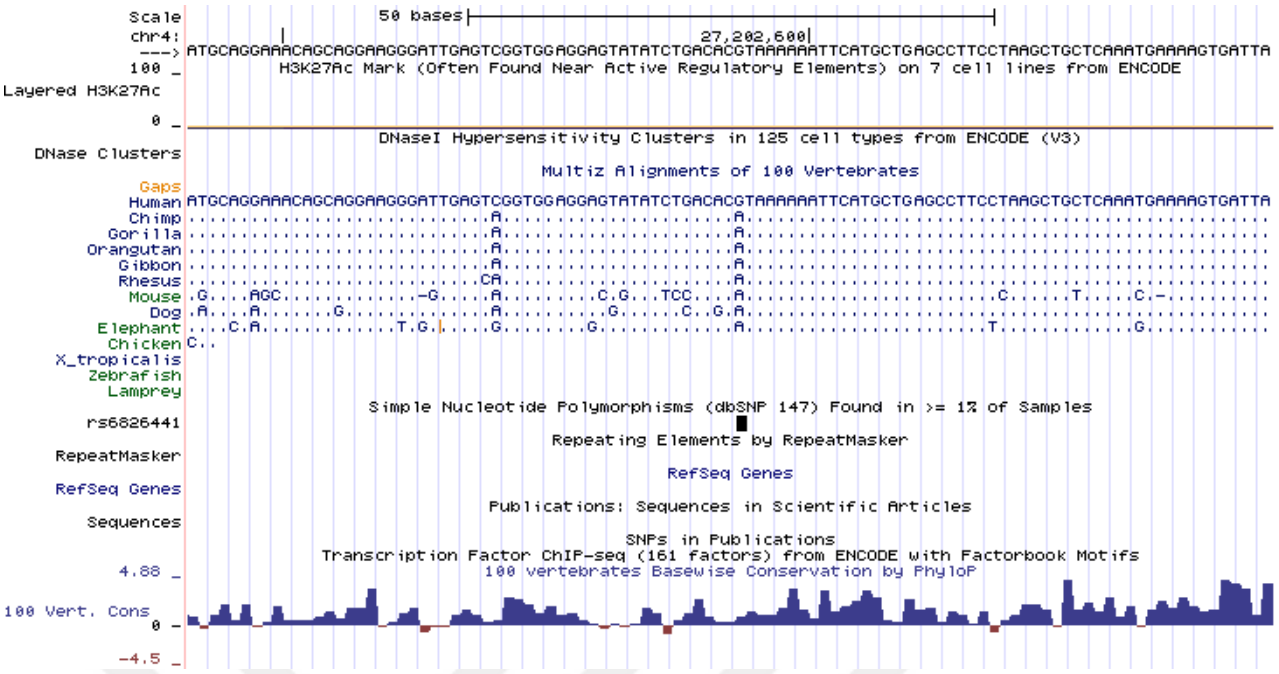
Çizelge 8.2. rs6826441 A>G değişimi yakın çevresinde yer alan genler

rs6826441 A>G, 4p15.2, p:0.0004	
Gen	**Değişime uzaklık (Kb)**
TBC1D19	342
LOC100421493	322
LOC105374546	340
STIM2	148
LOC101929199	16
MRPL51P1	222
IGBP1P5	384

Bu değişim herhangi bir gen bölgesinin içinde yer almamaktadır. Ancak 148 kb uzaklığında *STIM2* (*stromal interaksiyon molekülü 2, "stromal interaction molecule 2"*) geni ve 16 kb uzaklığında henüz görevi tam olarak bilinmeyen ncRNA *LOC101929199* isimli geni arasında lokalizedir. Ayrıca *STIM2* geni 5' uç kısmına yaklaşık 2 kb uzaklığında Rab GTPaz aktivatör domaini içeren ve daha önce kanser patogenezi ile ilişkilendirilmemiş *TBC1D19* (*TBC1 domain family member 19*) geni yer almaktadır. Bu gen bölgesinde çoğunlukla karakterize edilmemiş kodlanmayan genler ve pseudo genler bulunmaktadır. Bu genler ve değişim noktasına uzaklıkları sırası ile "*LOC105374546*-340 kb, *LOC100421493*-322 kb, *MRPL51P1*-222 kb, *IGBP1P5* 384 kb" verilmiştir (Şekil 8.1).



Şekil 8.1. rs6826441 A>G değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (152)



Şekil 8.2. rs6826441 A>G değişimini içeren dizi korunmuşluk analizi sonucu (153)

rs6826441 A>G değişimini içeren gen bölgesinde korunmuşluk analizi yapıldığında bu bölgenin korunmuş olduğu gösterilmiştir. Şekil 8.2'de noktalar korunmuş dizileri göstermektedir. Bu şekilde UCSC verisine göre majör allel G gösterilmiş olsa da çalışmamızda ve 1000 genom projesinde A alleli majör allel olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak bu şekil ile değişim noktasını içeren genomik bölgenin evrimsel olarak korunduğu ve tespit edilen A allelinin insan dışındaki türlerde de tercih edilen nükleotid olduğu görülmektedir.

İlgili genomik bölgede yer alan diğer bir gen olan *TBC1D19*, literatürde çok fazla incelenmemiş olsa da GTPaz aktivatör olarak görev yaptığı düşünülen bu genin, protein ürünü diğer Rab GTPaz aktivatörler gibi endositik yolak ve otofaji yolağında kilit noktada bulunan ATG8 proteinine bağlanıyor olabileceği düşünülmektedir (154). Ancak bu etkileşimi doğrulamak için, herhangi bir fonksiyonel çalışma yapılamamıştır. Bundan başka; TBC ailesinde yer alan diğer proteinlerin nöroendokrin sisteminde yer aldığı, testislerde protein fosfataz 1 ile etkileşimde bulunduğu gösterilmiştir (155,156).

Kanser gelişiminin özellikleri içinde yer alan (Hallmark of Cancer) hücre bölünmesinin artışı, apoptoz direnci, hücrelerin hareket yeteneği kazanarak göç etme yeteneği kazanması, farklı dokulara invazyonu, hücresel düzeyde bakıldığında intraselüler Ca^{+2} sinyali ile düzenlenmektedir. Bu veriler eşliğinde tümör hücrelerinde Ca^{+2} transportunun yeniden düzenlenmesinin kanser gelişiminde önemli bir mekanizma olması şaşırtıcı değildir (157).

STIM ailesinin deri, akciğer, pankreas, meme, glioma kanseri, kolorektal, serviks ve baş boyun kanserleri gibi farklı kanserlerin gelişiminde ilişkili olduğu gösterilmiştir (157-159). Özellikle son yıllarda STIM2-KRK ilişkisi ve önemi son yıllarda vurgulanmıştır (159-161). STIM2, ER üzerinde, asidik organellerde ve çok az (%2-10) da olmak üzere sitoplazmada gösterilmiştir (162).

Endoplazmik retikulum (ER) üzerinde bulunan STIM2 esas olarak sitoplazmik Ca^{+2} düzeyinin belirlenmesinde görev almaktadır. Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda STIM2 proteininin Ca^{+2} homeostasisinin sağlanmasındaki moleküler fonksiyonları, etkileşim içinde bulunduğu literatüre göre moleküller homoloğu olan STIM1 kadar aydınlatılmamıştır. STIM2 proteinini sitoplazmik Ca^{+2} homeostasisinin düzenlenmesinde seçici Ca^{+2} girişini sağlayan en önemli makina olan SOCE (store-operated Ca^{+2} entry) içinde yer almaktadır. Bu kompleks içindeki homoloğu olan STIM1 ile ER içinde tükenen Ca^{+2} stoklarının doldurulabilmesi için aktivasyonu sağlamaktadır. Ayrıca STIM2'nin, Ca^{+2} kanal proteini olan ve STIM1 ile bağlandığı daha önceden bilinen ORAI1 ile etkileşime girdiği ve SOCE regülasyonunda görev aldığı gösterilmiştir (163). Literatüre göre, STIM2 ER içinde bulunan Ca^{+2} stoklarında gözlenen STIM1'e göre daha minimal düzeydeki değişiklerin düzenlenmesinde görev almaktadır. Ayrıca seçici olmayan Ca^{+2} girişini sağlayan SOC (store-operated channels) içinde yer alan TRPC1 ile de kompleks oluşturduğu gösterilmiştir (157).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda STIM2'nin sitoplazmada yer alan Ca^{+2} bağlayan protein olan kalmodulin (CaM) ile de etkileşime girdiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre, STIM2/ORAI etkileşimi ile SOCE aktivasyonu ve sitoplazmik Ca^{+2} artışı gözlenirken, hücrede yeterli artış sonrasında CaM ile bu kanal inhibe olarak Ca^{+2} girişini durdurur (164,165). Ayrıca bu reseptör-protein kompleksinden bağımsız olarak ER üzerinde yer alan InsP3 (inositol 3 fosfat) reseptörlerini inhibe ederek de genel anlamda SOCE aktivitesini durdurduğu bilinmektedir (166).

Bir başka önemli nokta ise 2015 yılında art arda yapılan 2 çalışmada STIM2'nin birbirine zıt çalışan 2 farklı "ayıklama" varyantının olduğu gösterilmiştir. STIM2.1 veya STIM2β olarak isimlendirilmiş bu proteinin diğer STIM2 proteininden farklı olarak STIM/ORAI bağlanma domaini CAD'a 8 aminoasitlik bir insersiyon olduğu gösterilmiştir. Bu da tüm protein-protein bağlanma aktivitesini değiştirmektedir. Her iki çalışmaya göre de STIM2.2 veya STIM2α proteinin hücre içinde daha sıklıkla bulunduğu ve SOCE aktivitesini artırdığı

aksine diğer varyantın STIM2β'nın ise SOCE aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (165,167). Yukarıda bahsedildiği üzere STIM2'nin CaM'e bağlanarak regülasyonu sağladığı bilinmektedir. Miederer ve arkadaşlarının çalışmasında STIM2β'nın kalmoduline bağlanma afinitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (165). STIM2β'nin STIM1 ve OraI1'e direkt bağlanarak hücrede bu kanallardan Ca^{+2} girişinin durdurduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar STIM2'nin 2 zıt çalışan izoformu ile hücre içine Ca^{+2} girişinin düzenlenmesinde önemli regülatör moleküllerden biri olduğunu göstermiştir (165,167).

Yapılan çalışmalarda STIM2 düzeyinin farklı dokulara göre sitoplazmik Ca^{+2}, ER Ca^{+2} veya SOCE düzeyinde farklı etkileri olabileceği gösterilmiştir. STIM2 proteininin apoptoz, hücre proliferasyonu, miyoblast gibi hücrelerin farklılaşmasında, nöronal hücre gelişiminde, otoimmün hastalıkların gelişmesinde etkili olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (162).

Farklı kanser dokularında yapılan çalışmalarda, hücre içi $Ca+^{2}$ stoklarının kanser hücrelerinde azaldığı gösterilmiştir. Bunun sebebi, kanser hücresinde meydana gelen sürekli proliferasyon sinyali aktivasyonu, apoptozdan kaçış ve bazı durumlarda metastatik hücresel davranışların gösterilmesi olarak açıklanmaktadır (168). 4p15.2 LOH meme kanseri ve kolorektal kanserde gözlenmesi ile bu bölgede yer alan tümör baskılayıcı genler, antiapoptotik genler aranmıştır. *STIM2* geni bu yolla aday olarak gösterilmiştir.

Sobradillo ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmada, kolon kanser hücre hattında hücre içine Ca^{+2} girişi sağlayan kompleksler içinde yer alan proteinler olan TRPC1, STIM1, OraI1/2/3 ifadesinin arttığını ve STIM2'nin ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada, STIM2 susturulması ile normal mukus dokularında yapılan çalışmada SOCE aktivasyonu, Ca^{+2} stoklarında düşüş, TRPC1, STIM1 aktivasyonu olduğu gösterilmiştir. Normal dokuda Ca^{+2} hücre içine giriş sadece seçici yolla olurken muhtemel STIM2 proteinin hücrede düşüşü nedeni ile seçici olmayan yolun da aktif hale geldiği yine bu çalışmada gösterilmiştir (157). Bu özellikle KRK hastalarında daha sık gözlenen 4p15 LOH'nin etkisini açıklayabilir. 4p15 LOH gözlemi üzerine Aytes ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, *STIM2*'nin ifadesinin artırılması ile farelerde tümör büyümesinin azaldığı ancak *STIM2* ifadesinin primer KRK hücre kültürü ile oluşturulan zenograftlarda arttığı gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada protein düzeyleri gösterilmediğinden hücresel düzeyde tam olarak etkisi bilinmemektedir (169).

Weidinger ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada *STIM1/STIM2* veya her ikisi birden susturulduğunda farede SOCE aktivitesi azaldığından tümör gelişiminin melanoma ve adenokarsinomada azaldığı gösterilmiştir. Buna zıt olarak, yine aynı çalışmada tümör immünitesinde çok önemli olduğu bilinen, sitotoksik CD8+ T hücrelerinde STIM1/2 eksikliğinin bağışıklık sisteminin düzgün çalışmamasında ve hem in vivo hem de in vitro'da tümör hücrelerini tanıyamamasına neden olmaktadır (170).

Rao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, KRK'de STIM2 düşüşünün STIM1'i aktive edememesine ve bu nedenle STIM1'in yeniden düzenleme ile seçici olmayan Ca^{+2} mekanizmasında yer alan TRPC1 ile normalde olmaması gereken etkileşimler oluşmasına neden olmaktadır. Normal şartlarda, hücrede STIM2 Ca^{+2} düzeyi değişimini daha hassas algılayabilmektedir. Ancak aksi durumda, hücrede eksikliği ile STIM1'in hücrede daha düşük düzeyleri algılamasına ve normalden fazla aktivasyona neden olmaktadır (168). STIM2 düşüşü hücrede STIM1'i ulaşılabilir sensör haline getirir. Yeni durumda artan sitoplazmik Ca^{+2} düzeyi apoptoz direncini, metastazı ve proliferasyonun uyarılmasını aktive etmektedir. Bu durumda da tüm Ca^{+2} yolaklarına rağmen hücrede ikincil Ca^{+2} stokları düşüşü gözlenmektedir. 2016 yılında yapılan bir çalışmada metastatik KRK hastalarında metastaz ile ilişkilendirilmiş ORAI1/STIM1-SK3 kompleksinin anti-EGF tedavisine yanıt verdiği gözlenmiştir. Metastatik fenotip STIM2'nin de etkileşim halinde bulunduğu bilinen ORAI1/STIM1'nin yüksek SOCE aktivasyonu göstermesinden dolayıdır. KRK'in kontrol altına alınması SOCE aktivasyonunun anti-EGF'e yanıt alınması şeklinde düşünülmüştür. Bu çalışma SOCE aktivasyonunun önemini bir daha göstermiştir (171).

STIM2 bugüne kadar herhangi bir miRNA ile ilişkilendirilmemiş olmasına rağmen homoloğu olan STIM1 KRK hastalarında EMT'ye yönlendirilmesi konusunda mir-185 ile ilişkilendirilmiştir (172). Her ne kadar *STIM2* miRNA ile ilişkilendirilmemiş olsa da gen bölgesinde intronik bölgeye lokalize olan henüz görevi bilinemeyen 2 ncRNA tespit edilmiştir (*LOC105374546, LOC100421493*).

Özetçe çift yönlü olarak çoğunlukla ER üzerinde yer alan STIM2'nin hem ER içindeki Ca^{+2} miktarını düzenlediği hem de sitoplazmaya bakan ucu ile sitoplazmik Ca^{+2} düzeyini algıladığı, STIM1/ORAI1'e bağlanarak kanal aktivasyonu ve inaktivasyonu sağladığı, CaM'e bağlanarak inaktif olduğu ve sonuçta hücre idamesi, bölünmesi, apoptozu konusunda hayati öneme sahip Ca^{+2} düzeyi belirlenmesinde anahtar moleküllerden biri olduğu açıktır. STIM-kanser ilişkisi yukardaki literatür özetinden de anlaşılacağı üzere tek yönden

değerlendirilmemeli patolojik durumlar karşısında oluşan sonuçların çok yönlü analiz edilmesi gerekmektedir.

Sonuçta STIM2 geni bazı çalışmalarda tümör baskılayıcı gen bazılarında ise onkogen olarak düşünülmüştür.STIM2 Ca^{+2} metabolizmasının düzenlenmesinde, buna bağlı olarak kanserin kontrol altına alınmasında STIM1, ORAI1/2/3 ile birlikte farklı kanserlerde farklı kombinasyonlar olmakla beraber kanser gelişiminde aday molekül olarak değerlendirilmektedir. Sonuçta STIM proteinlerinin birlikte *TP53, NRAS, BRAF, NF1* gibi "driver" gen olabileceği düşünülmektedir (173).

rs635833, p=0.0123

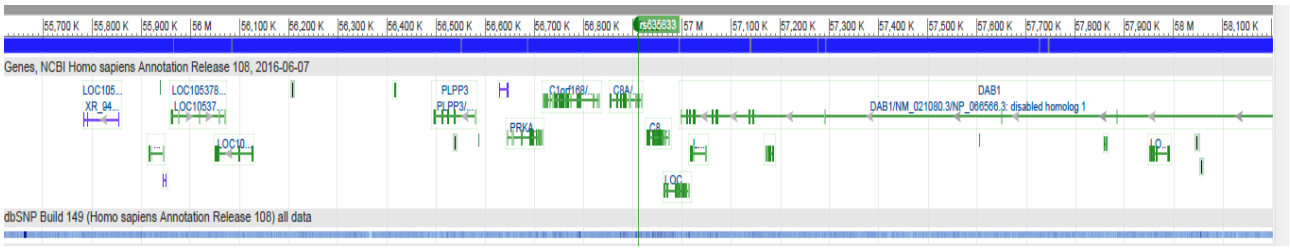
Bu tez çalışmasında, genotipleme sonrasında hasta-kontrol grubu istatistiksel analizlerine göre C8a geni intronik bölgede bulunan rs635833 A>G değişimi p:0.0123 olmak üzere sporadik KRK ile ilişkili bulunmuştur. rs635833 G alelli hastalarda kontrole göre 1.17 kat fazla bulunmuştur. Bu değişim dbSNP veritabanına göre herhangi bir hastalık ile ilişkilendirilmemiştir. Aşağıdaki çizelgede bu değişim yakın çevresinde yer alan genler verilmiştir (Çizelge 8.3). Gri ile işaretlenmiş genler bu değişimin 5' ve 3' tarafındaki genleri işaret etmektedir.

Çizelge 8.3. rs635833 A>G değişimi yakın çevresinde yer alan genler

rs635833 A>G, 1p32.2, p:0.0123	
Gen	**Değişime uzaklık (Kb)**
PRKAA2	200
C1ORF168	80
C8A	İntron 9-10 içinde
C8B	17
LOC105378745	51
DAB1	86
LOC105378748	100

1p32.2'de lokalize olan bu değişim *C8A* (*Komplement bileşeni 8 alfa alt birimi*, *Complement component 8, alpha polypeptide*) geni intron 9-10'da ve 10. ekzona 265 nükleotit uzaklıkta bulunmaktadır. Bu gen bölgesinde değişim noktasına 17 kb uzaklıkta *C8B (Komplement bileşeni 8 beta alt birimi, Complement component 8, beta polypeptide)*, 86 kbp uzaklıkta *DAB1("reelin adaptor protein")*, 10 kb uzaklıkta *LOC105378748* ncRNA geni, 51 kb uzaklıkta *LOC105378745* ncRNA geni, 80 kb uzaklıkta ise protein ürünü bulunan ancak

henüz görevi belirlenmemiş *C1ORF168 (chromosome 1 open reading frame 168)* geni bulunmaktadır. *C8A, C8B* genleri kompleman sistemde yer alan kompleman 8 kompleksinin üç alt biriminden ikisidir (Şekil 8.3).



Şekil 8.3. rs635833 A>G değişimi değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (152)

C8A(C8α) ve C8B(C8β) doğuştan gelen bağışıklık sistemi olan kompleman sistemi içinde yer alan C8'in alt birimlerinden sırasıyla alfa ve beta polipeptidini kodlamaktadır. C8 bakteri membranlarının tanımlanması ve parçalanmasını sağlayan membran hücum kompleksi (MHC, MAC, membrane attack complex) içinde yer almaktadır.

Kompleman sistemi 100 yıldan fazla süre önce keşfedilmiş ve birbirlerini aktive ederek çalışan çok önemli serum proteinleri ve reseptörleri içeren doğal bağışıklık sistemidir (174). Kompleman proteinlerinin sonradan kazanılmış bağışıklık ile doğal bağışıklık sistemi arasında köprü olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (175).

Kompleman proteinleri akut ve kronik inflamasyonun birçok aşamasında, vasküler geçirgenliğin artırılmasında, lökositlerin kemotaksisi ve çağrılmasında, lenfosit aktivasyonu ve ifadesinin artışında, bakteri veya istenmeyen hücrelerin opsonizasyonunda, nekrotik, apoptotik, hücrelerin ve kanser hücresi gibi atipik hücrelerin temizlenmesinde görev alırlar (174). Hücresel bütünlüğün sağlanması, doku homeostasisi sağlanmasında, sonradan kazanılmış bağışıklık yanıtın modifiye edilmesinde kompleman sistemi önemli görevler yapmaktadır.

Kompleman sistemi aktivasyonu ve görev aldığı fonksiyonlara gör 3'e ayrılmaktadır. Bunlar inflamasyon ve fagositozun aktivasyonunu sağlayan klasik yolak, patojen optonizasyonu ve immün kompleksin uzaklaştırıldığı mannan bağlanma (MB) lektin yolağı son olarak membran hücum kompleksinin (MHC) aktive olduğu patojen ve hücrelerin uzaklaştırıldığı alternatif yolaktır (176). Kompleman sistemi elemanlarından C3 tüm kompleman yolakları ortasında kilit noktada bulunmaktadır. C5 ise MHC oluşumunda ilk aktive olan proteindir.

Farklı yanıtların aktivasyonu faklı kompleman proteinlerinin aktivasyonu ve birbirlerini aktive etmesi ile gerçekleşir.

Genotipleme analizi ile belirlenen değişim noktası *C8A(C8α)* ve *C8B(C8β)* genlerini işaret etmektedir. Bu iki genin protein ürünleri ise kompleman sisteminde yer alan MHC içindeki C8 protein kompleksi içinde bulunmaktadır. Kompleman sisteminde yer alan, uzaklaştırılması gereken hücrelerin üzerinde 110A° genişliğinde por oluşturarak (177) hücrenin yok olmasını ve bağışıklık sisteminin uyarılmasını sağlayan bu protein kompleksi daha önce de bahsedildiği üzere MHC olarak isimlendirilmiştir.

MHC C5b'nin oluşması ile bir araya gelmeye başlar. Ardından C5b, C6, C7, C8 ve C9 ile birleşir. Tüm bu proteinler bir araya geldiğinde lipit tabakası üzerinde asimetrik pul şeklinde bir por oluşmuş olur. Bu por yapısı tamamen halka değil asimetrik yarı açık pul "split-washer" şeklindedir. Bir başka deyişle bu yapı asimetrik, birbiri üzerine tamamen oturmayan halkasal yapıdadır (177). MHC kompleksi oluşumunda C5b67 kompleksinden sonra C8α, C8β, C8γ bağlanır. Membran üzerinde esas por yapısını oluşturacak olan 18 homo-oligomer yapı olan C9'un saat yönündeki C8β'ya bağlı olan C8α'ya bağlanarak kompleksi tamamlaması ile gerçekleşir. Sonuçta transmembran MHC protein kompleksi 22 altbirimden oluşur (177,178). Bir başka çalışmada, C8α'nın C9 ile birlikte memrandan geçebileceği ve por formasyonunu oluşturduğu gösterilmiştir. Bu nedenle C8 por formasyonunun oluşumunda kilit alt ünitelerdendir (179). Ayrıca 2007'de Hadders ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada C8α'nın sitotoksik T hücreleri, NK hücrelerinde bulunan perforin ile yüksek homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Lipokalin ailesinden olan C8γ'nın ise küçük lipofilik moleküllere bağlanan ve taşıyabilir olduğu gösterilmiştir. Bu veriler ışığında. C8γ'nın MHC oluşumunda önemli ligand bağlanma noktası olduğu öne sürülmüştür. (178). Buna karşın Parker ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ortamda bulunmadığında MHC fonksiyonunu durdurmadığı gösterilmiştir (180). 2015 yılındaki yapısal analiz çalışmasına göre, C8γ'nın iç boşluk oluşumunda görev aldığı öne sürülmüştür (177).

Sonuç olarak MHC'nin oluşması ile meydana gelen por aracılığı ile hücrenin H_2O, iyon dengesi bozulmakta ve C5a kemokin gibi davranarak bağışıklık sistemi hücrelerini çağırmaktadır. Örneğin mast hücreleri ve bazofil tarafından histamin sentezi uyarılır, nihayetinde patojen veya istenmeyen hücreler yok edilir. MHC oluşumu sonrasında hücrede Ca^{2+} akışı, henüz aydınlatılmamış farklı sinyal iletimleri olduğu bilinmektedir (181).

Günümüzde tümör immünitesinin kontrolü hakkında henüz tam olarak ayrıntılı bilgi bulunmamaktadır. Ancak modifiye olmuş tümör hücrelerinin bağışıklık sisteminde tanımlanması normal şartlar altında beklenen bir sonuçtur. Bu olmadığında kanser gelişiminin 10^9 hücre birikene kadar belirlenmesi, günümüz teknolojisi ile mümkün değildir. Tümör hücrelerinde antijen sunan molekül yokluğu, antijenlerin azalması/yok olması hücrenin immün toleran hale gelmesini sağlamaktadır (182).

Kanser tedavisinde, bilinen hedef moleküllere yönelik immün sistemi yönlendirerek spesifik monoklonal ilaç ile antitümör tedavisinin mümkün olduğu bilinmektedir (183,184).

Kompleman sisteminin kanser ile ilişkili olabileceği, 70li yıllardan itibaren öne sürülmüştür. KRK'de de bu ilişki gösterilmiştir. Literatüre baktığımızda; C8-Kanser ilişkisi sınırlı sayılı yayında gösterilmiştir. 1976 yılında yapılan çalışmada, akut lenfoma, Hodgkin lenfoma ve sarkomada C8'in, C5, C9 ile birlikte serum düzeyinin kontrole göre yüksek olduğu gösterilmiştir (185). 2012'de yapılan bir diğer çalışmada ise, meme kanseri hastaları C8 ve C3 serum düzeylerinin, kontrole göre yüksek olduğu belirlenmiştir (186). Her ne kadar C8-kanser ilişkisi literatürde tartışmalı olsa da MHC inhibitörü CD59'un C8'e bağlanarak inaktivasyon gösterdiği bilinmektedir.

Kompleman sistemi düzenleyici proteinleri, inhibitörleri CD21, CD35, CD46, CD55, CD59 ve H faktörü kompleman sitotoksitesini düzenlemektedir. Bu faktörlerden bir glikoprotein olan CD59'un C8α-C9 alanına bağlanarak MHC kompleksinin ayrılmasına, fonksiyon görememesine neden olmaktadır (178).

Günümüzde kompleman bağımlı hedefe yönelik monoklonal antikor (mab) bulunmamaktadır. Ancak kompleman faktörlerinin kullanılan ilaçları etkilediği bilinmektedir. Örneğin CD59'un susturulmasının B hücre malignansilerinde, Rituximab'ın, HER2+ gastrik ve meme kanseri hücre hattında, Pertuzumab/Transtuzumab kombinasyonunu, uterus seröz karsinomada Transtuzumab'ın etkisini artırdığı ve kompleman, makrofaj yönelimli anti-tümör etkisini artırdığı gösterilmiştir. CD59'un kanser tedavisinde umut verici bir biyobelirteç olduğu birçok çalışmada öne sürülmüştür (187,188).

CD59'un CD46 ve CD55 ile birlikte ifade düzeyinin neoplastik kolon dokusunda normale göre arttığı, kolorektal kanser sınıflandırılması ve tedavisinde kullanılabileceği (187), CD59 ifade düzeyinin kolorektal kanserde kötü prognoz ile ilişkili olabileceği (189), kolorektal

kanser hastalarında CD59'un ifadesinin artışı ile CD^{4+} T hücrelerini azalttığı ve bağışıklık sisteminde boşluk yarattığı gösterilmiştir (188).

Tüm bu bilgiler ışığında genotipleme sonucunda p:0.0123 değeri ile belirlenmiş rs635833 değişiminin sporadik KRK ile ilişkili olduğunu işaret ettiği *C8A*, *C8B* genleri literatür eşliğinde kanser ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Buna rağmen, literatürde kanser immünolojisi ve bu genler kapsamında hala aydınlatılamamış birçok nokta bulunmaktadır. Bu iki genin protein ürünlerinin ilişkili olduğu CD59 kompleman proteininin kanser ve kolorektal kanser başlığı altında birçok çalışmada incelenmiştir. Bu bölgede sporadik olarak oluşabilecek bir mutasyonun etkisi kolorektal kanser patogenezinde yer bulabilecektir. MHC oluşumu düzgün oluşmayan bu olası neoplastik hücrelerin immün yanıttan kaçışına zemin hazırlayabilecektir. Ayrıca MHC oluşumu sonrasında hücre içi ve dışına Ca^{2+} akışı, SOCE artışı gözlendiği ve bilinmeyen farklı daha moleküler mekanizmaların aktif olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak kompleman sistemi elemanı olan bu iki gende yer alan değişimler hastalık yatkınlık geliştirilmesinde etken olabilirler.

rs3007737, p=0.0184

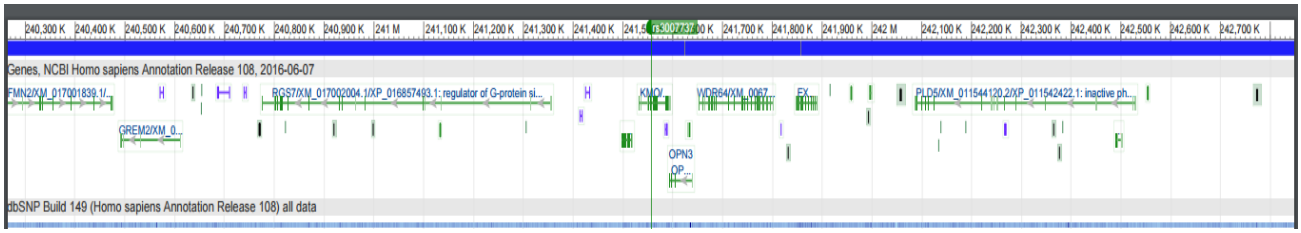
Yapılan genotipleme analizleri sonrasında p: 0.0184 anlamlılık değeri ile hastalık ile ilişkili bulunan KMO geni intronik bölgede bulunan rs3007737 A>G değişim noktası 1q43 lokalizedir. rs3007737 A alelli hastalarda kontrole göre 1.274 kat fazla bulunmuştur. Aşağıdaki çizelgede bu değişim yakın çevresinde yer alan genler verilmiştir (Çizelge 8.4). Gri ile işaretlenmiş genler bu değişimin 5' ve 3' tarafındaki genleri işaret etmektedir.

Çizelge 8.4. rs3007737 A>G değişimi yakın çevresinde yer alan genler

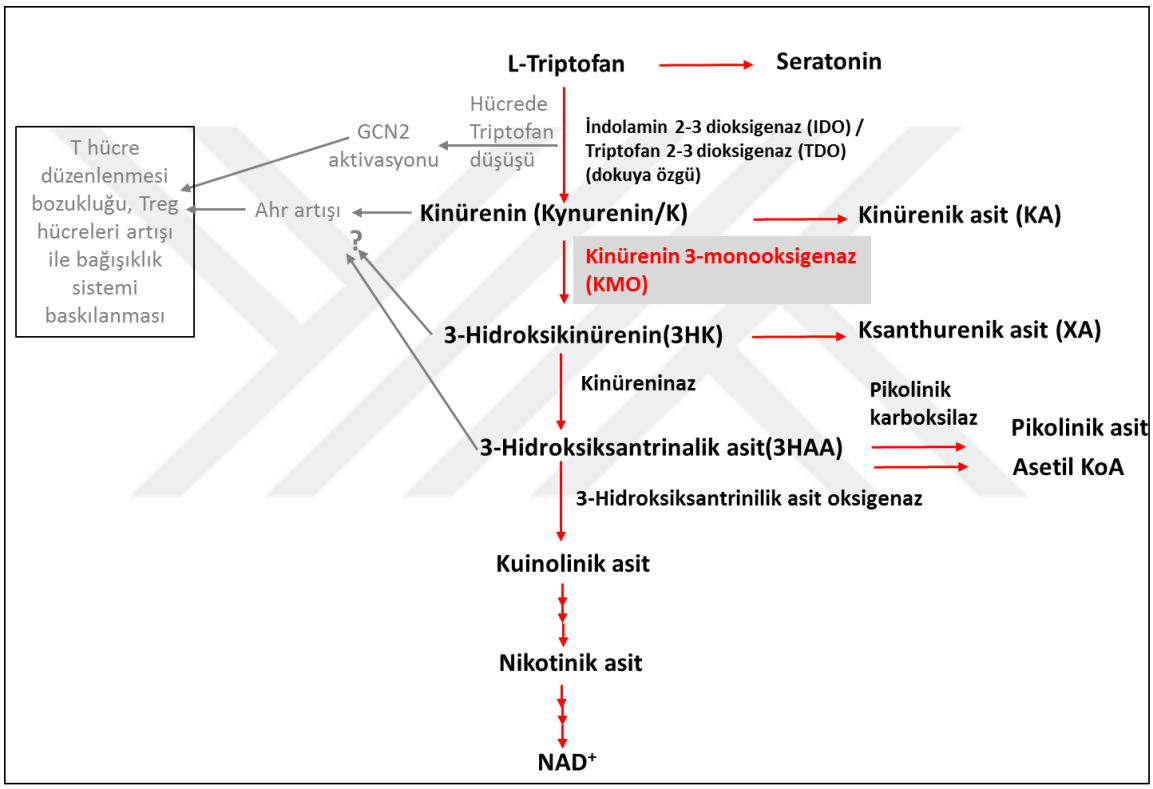
rs3007737 A>G, 1q43, p: 0.0184	
Gen	**Değişime uzaklık (Kb)**
FH	37
KMO	İntron 5-6 içinde
LOC105372223	27
OPN3	35
CHML	72
WDR64	95

Bu değişim dbSNP veritabanına göre herhangi bir hastalık ile ilişkilendirilmemiştir ve *KMO* (kynurenin 3-monooksigenaz) geni intron 5-6 içinde ve ekzon 5'e 1598 bç uzaklıkta bulunmaktadır. Bu genomik bölgede değişim noktasına 37 kb uzaklıkta *FH* (*fumarat hidrataz, "fumarate hydratase"*) geni, 35 kb uzaklıkta OPN3 (*opsin 3*) geni ve 27 kb

uzaklıkta kodlanmayan ve henüz görevi bilinmeyen *LOC105373233* geni bulunmaktadır (Şekil 8.4).



Şekil 8.4. rs3007737 A>G değişimi değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (152)



Şekil 8.5. Triptofan metabolizması genel görünümü, KMO ve bağışıklık sistemine etkisi (190,191)

Triptofan metabolizması kanser gelişimi sırasında hücrelerin bağışıklık yanıtından kurtulmaları için önemli mekanizmalardan biridir. Triptofan-kanser ilişkisi 1950'lerden itibaren farklı kanser türleri ve in vivo çalışmalar ile gösterilmiştir. 1998'de Munn ve arkadaşları günümüzde triptofan metabolizmasında hedef molekül olarak kullanılan 2,3-dioxygenaz enzimi (IDO) ile T hücre inhibisyonunu göstermiştir (192). 2000li yılların ortasından itibaren triptofan metabolizması-kanser bağışıklığı çalışmaları ivme kazanmıştır (Şekil 8.5). 2011 yılında Opitz ve arkadaşlarının yaptığı yayın ile moleküler mekanizmanın bir kısmı ortaya konulmuştur (193).

Triptofan esansiyel aminoasitlerden olup %95'i kynurenin yolağında metabolize edilir (194). Farklı dokularda sentezlenen ancak metabolizmada aynı basamakta görev yapan IDO1, IDO2 (2,3-dioxygenaz enzim 1/2), TDO (Triptofan 2,3-dioksigenaz) bu yolağın başlangıcındaki ilk enzimlerdir. Bu enzimler sonradan kazanılmış bağışıklık yanıtın, inflamasyonun ve malignansilerin sınırlandırılmasında ilk etkili basamaktır. Bu nedenle, IDO1 başta olmak üzere IDO2 ve TDO triptofan metabolizması-kanser çalışmalarında çokça çalışılmıştır. Kanser araştırmaları sonrası ilk öne sürülmüş yolak kanser hücresinde, triptofanın IDO enzimi ile kynurenine (kyn) dönüştürülmesi ile başlar (194). Ardından kynurenin hücre dışına sentezlenerek T ve B hücrelerininde, dentritik hücrelerde, makrofajlarda AHR (aril hidrokarbon reseptörü, "aryl hydrocarbon receptor") ligandı gibi davranarak bu reseptöre bağlanır (195). mTOR yolağı uyarılır, inflamasyon sitokinleri olan IL-12, IL-10, TGFβ sentezlenir. B, T hücre farklılaşmaları, dentritik hücre aktivasyonu vb. bağışıklık sistemi baskılanır. Böylece inflamasyon ve bağışıklık tolerans sağlanır (193,195,196). Bu tez çalışmasında hastalık ile ilişkili gösterilen *KMO* geni protein ürünü ise triptofan metabolizmasında 2. basamaktaki kynurenin'in, 3-Hidroksi-kynurenine (3HK) çevrilmesini sağlayan enzimdir.

Sağlıklı hücrelerde kynurenin yolağının, hamilelik sırasında fetüsün korunması, beslenme/solunum sırasında mukozal immün tolarensın sağlanması veya apoptoz sırasında tolerans sağlanması için baskılandığı bilinmektedir (195). Ancak kanser hücrelerinde artan triptofan kullanımı ile bu denge birçok yönden değişmektedir.

Bu değişimlerden birincisi kynurenin metabolizması son ürünlerinden olan NAD^+ artışı ile hücrede proliferasyonun uyarılmasıdır. İkincisi kynurenin yolağında yer alan ara ürünlerin ve enzimlerin artışı ile neoplastik gelişim gösteren hücrelerin bağışıklık sisteminden kaçışı artarak devam edebilir. Bu kaçışın en önemli elemanlarından birisi IDO enzimidir. Kanser gelişiminde en fazla çalışılmış olan IDO1 enzimi triptofandan kynurenin sentezlenmesini sağlayan enzimdir. Bu enzim aracılığı ile hücrede doğal AHR ligandı olan kynurenin oluşur.

Kanser hücresinde *BIN1* gibi tümör baskılayıcı genlerin susturulması, *STAT1, STAT3* ifadesinin artışı ve henüz bilinmeyen farklı genlerin değişimi ile triptofan tüketimi artar (197). Triptofan yokluğuna düşen sitotoksik T hücreleri, T yardımcı hücreleri *GCN2* genin aktive olması nedeni ile proliferasyonu azalır. Ayrıca T hücrelerde Fas bağımlı apoptoz uyarılır. Bunun sonunda da Treg (CD4+, CD25+, FoxP3) hücreleri ortamda baskın bir şekilde olgunlaşır. Bu hücreler de doğuştan ve sonradan kazanılmış bağışıklık sisteminde

baskılayıcı özellik sağlar (198). Bir başka öneriye göre ise, kynurenin-AHR reseptör-ligand kompleksi T hücresi veya APC (Antijen sunan hücre, "Antigen presenting cell") içine entegre olarak T hücresinde, APC'de inflamasyona neden olan ve bağışıklık yanıtı baskılayacak interferon, sitokinlerin sentezlenmesini sağlayan mTOR yolağı aktivasyonu, *GCN2* aktivasyonu, CTLA-4, PD1 gibi bağışıklık kontrol noktası proteinleri artışı gibi önemli yolakların aktivasyonunu sağladığı şeklindedir (197).

Ne şekilde olursa olsun kanser hücresinin bağışıklık yanıttan kaçışı sağlanır. AHR-kyn-kanser ilişkisi çok net bir şekilde bilinmektedir. Ancak bu noktada çok iyi bir şekilde bilinmeyen kynurenin dışındaki diğer triptofan metabolitlerinin, AHR ligandına bağlanıp bağlanmadığıdır. Bazı kanser tiplerinde, sadece IDO ifadesinin düzenlenmesi yeterli olmadığından, araştırmacılar diğer metabolitlerin de AHR ligandı gibi davranarak ivmeli bir şekilde bağışıklık yanıtın oluşmasında katkıda bulunduğu düşünülmektedir (197).

Yukarda bahsedildiği üzere "triptofan metabolizması-kanser gelişimi-bağışıklık yanıttan kaçış" üçgeninde yeterince aydınlanmamış noktalar bulunmaktadır. Kynurenin yolağında kanser ile ilişkilendirilmiş hedef molekülü IDO/TDO belirlenmiş olsa da triptofan tüketimi artışının kaynağı, bu yolağın bağışıklık sistemini nasıl etkilediği, farklı dokularda bu sistemin nasıl çalıştığı, çevresel faktörlerden nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir. Bu noktalardan birisi de KMO enzimidir. Daha önce de bahsedildiği üzere bu tez çalışmasında hasta-kontrol çalışması kıyaslandığında anlamlı bulunan TNP KMO (Kynurenin 3 monooksigenaz) geni içinde bulunmaktadır. Hatırlatmak gerekirse KMO, triptofan metabolizmasında kynurenin yolağında kynurenin'in, 3-Hidroksi-kynurenine (3HK) çevrilmesinde görevli bir enzimdir.

KMO, mitokondri dış yüzeyinde transmembran protein olan FAD bağımlı bir enzimdir. KMO ve son ürünü 3HK, nörodejenaratif özelliklerinden dolayı Huntington, Alzheimer, Parkinson gibi nörolojik hastalıklarda hedef molekül olarak incelenmektedir (199).

2015 yılında karaciğer kanseri hastalarında yapılan çalışmaya göre yüksek *KMO* ifade düzeyinin kötü prognoz ile paralel seyrettiği; buna karşın TDO -esas olarak karaciğerde sentezlenen IDO homoloğu- düzeyinin bu durum ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, bu çalışmada tüm popülasyon içinde kanser dokularının kontrol dokularına göre KMO ifade düzeyinin anlamlı derecede yüksek olduğu da gösterilmiştir. Aynı çalışmanın invitro ayağında KMO'nun proliferasyon, invazyon, metastazı artırdığı gösterilmiştir (200).

Bir diğer çalışmada, kynurenin'in KMO ile reaksiyona girmesi ile oluşan 3HK ve ardından gelen basamakta oluşan 3-Hidroksantranik asit (HAA)'in T hücre proliferasyonunu baskıladığı ortaya koyulmuştur (201). Glioma hücre hattı ve beyin kanseri hastalarından alınan plazma örneklerinde makrofaj aktivasyonunda önemli bir sitokin olan interferonγ (IFγ)'nın kynurenin yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (202).

İnvaziv meme kanseri örneklerinde kynurenin yolağı enzimleri ifade düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (203). İnvaziv meme kanseri hastalarında alt tipler arasında kynurenin yolağındaki enzimler olan KMO, TDO, 3 hidroksiksantranilat 2,3 dioksigenaz (3-HAO)'ın agresif alt tiplerde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca Kyn yolağı metabolitlerinin tümünün birden bağışıklık sistemini baskılayılayıcı özelliği olabileceği yeniden dile getirilmiştir (198,204).

Bir başka çalışmada beyin kanseri örneğinde görüldüğü gibi, bağışıklık sistemden kaçış ve tümör gelişmesinin desteklenmesi sadece IDO/TDO enzimleri ile değil tüm Kyn yolağının çalışması ile gerçekleşmektedir. Bu nedenle otoritelerin bir kısmı, kanser gelişimi sınırlandırıcı ilaçların bu yolakta yer alan protein/enzimlerin kombinasyonlarının kullanılması gerektiğinde fikir birliğindedirler (193,198,205).

Bugüne kadar KRK-triptofan metabolizması çalışmaları ağırlıklı olarak IDO1/2 enzimi çevresinde toplanmıştır. Ancak, bu çalışmalarda birbiri ile çelişen sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalara göre IDO1 ifade düzeyinin genel sağ kalım/prognoz ilişkili olduğunu gösteren (206) veya IDO1 ifade düzeyinin bağımsız olduğunu öne süren (207,208) çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca, yapılan in vivo çalışmalar arasında da kynurenin yolağı-KRK gelişimi ve prognozu hakkında birbiri ile çelişen sonuçlar bulunmaktadır (209-212).

Bu durum, hem bağışıklıktan kaçış sırasında birden fazla elemanın olabileceğini hem de homojen bir grup üzerinde yapılması gereken incelemenin önemini göstermiştir. Ayrıca KRK gibi beslenme şekli, sirkadiyen ritim, stres faktörleri, günlük fiziksel aktivite, kolon florası, otoimmün hastalıklar vb. gibi farklı etkenlerden çok fazla etkilenen kanser türü olduğundan moleküler mekanizmasının ortaya çıkarılmasında ayrıca zorluk yaşanmaktadır. Örneğin, 2013'de Zelante ve arkadaşları barsak florasında yer alan Laktobasil türleri tarafından oluşturulan triptofan mekanizması yıkım ürünlerinin, mukozal toleransı sağladığı göstermiştir. Bu katabolitlerin AHR ligandı gibi davranarak doğal bağışıklık sistemi lenfoit hücrelerince lokal IL-22 üretimi sağladığı intestinal homeostasisi koruduğu gösterilmiştir (213).

Yine de T hücre yeniden düzenlenmesi, tümör hücresi yakınında bağışıklık tolerant lenfosit infiltrasyonu, bu durumun kanser gelişiminde etkili olduğu, bahsedilen bu değişimlerin Kyn yolağı ilişkili olduğu konusunda fikir birliği vardır (205,209-212).

Vücutta triptofan homeostasisinin sağlanmasında çok önemli olan bu yolakta daha önce bahsedildiği üzere sıklıkla hedef molekülü olarak çalışılan IDO1, antagonisti klinikte beyin, lenfoma, lösemi, akciğer gibi kanserlerde olumlu sonuçlar alınmıştır. Ancak bu ilacın kolorektal kanserde sentezi değişen sitokinler, dentritik hücre infiltrasyonu gibi bağışıklık sisteminde immün yanıtın geri kazanılması konusunda tedavinin yeterli olmadığını düşündüren sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle IDO antagonisti ile kombine farklı monoklonal antikorlar, kontrol noktası bağışıklık sistemi ajanları (CTLA-4, PD1 vb.) veya bu yolakta yer alan KMO gibi farklı enzimlerin hedef alınabilir. Bizim çalışmamız da literatür verilerini desteklemekte ve sporadik KRK gelişiminde *KMO* geninin etkili olduğunu göstermektedir.

Literatür araştırması yapıldığında kanser-1q42 lokasyonu ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan birisi, 2003 yılında yapılan çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada 9 HNPCC hastasında çalışmamızda ilişkili bulunan TNP lokasyonu yakınında yer alan *KMO* ve *OPN3* genlerini içeren 1q42.3-1q43 gen bölgesinin delesyona uğradığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da işaret ettiğimiz bu iki genin hastalık ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (214).

Bir başka çalışmada, küçük hücreli akciğer kanser hattında Paklitaksel isimli tübülin gelişimini hedefleyen kemoterapi ilacının *KMO* ve *OPN3* (*Opsin3*) genlerinin susuturulması sonrasında $p<0.05$ anlamlılık değeri ile yaşayan hücre sayısının arttığı gösterilmiştir. Yine bu çalışmada Paklitaksel tedavisi uygulanan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında *KMO* susturulması ile $p<0.05$ anlamlılık değeri ile genel sağ kalım miktarının yüksek olduğu gösterilmiştir (215).

KMO geni 35 kb mesafede bulunan *OPN3* (*Opsin3)* geninin karaciğer kanserinde 5-florourasil tedavisine karşı hassasiyet geliştirerek apoptotik yoları düzenlediği yani ilaç direncine karşı hassasiyet gelişmesini sağladığı gösterilmiştir. (216).

Önceden bahsedilen bizim toplumumuzda kanser ile ilişkili bulunmuş kompleman sisteminin sadece bir çalışmada kynurenin yolağının beyin kanseri hastalarında kemoterapi-radyoterapi-IDO inhibisyonu kombinasyonunun kompleman sistemi elemanlarının tümör bölgesine toplanmasını artırdığı gösteriliştir. Bu ilişki kompleman sisteminin IDO

inhibisyonu ile aktive olması ve tümör bölgesinde tümör nekrozu ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışma bizim bilgimize göre Kynurenin yolağının kompleman sistemi ile ilişkili olduğunun gösterildiği tek çalışmadır. Bağımsız bir şekilde yapılan bu çalışma, analiz sonuçlarımızda belirlediğimiz genlerin ilişkili olabileceğini bir kez daha göstermiştir (217).

Son olarak hastalık ile ilişkili bulunan TNP'ye 37 kb uzaklıktaki *FH* (Fumarat Hidrataz) geni Krebs döngüsünde L-malata'dan Fumarat oluşumunu sağlayan önemli bir enzimdir. *KMO* genine uzaklığı 12 kb'dır. Uzun yıllardır "kalıtımsal leimiyamatozis ve renal kanser" (HLRCC) ve "uterine leimiyamatozis" ile germline *FH* mutasyonları ilişkilendirilmiştir (218-223). Yapılan in vivo çalışmalarda *FH* genin bir tümör baskılayıcı gen olduğu, *FH* susturulması ile hipoksi uyarılmış protein (HIF, "hypoxi induced protein")1α ifade düzeyini artırarak ROS düzeyini artırdığı, SRF-FOS-JUNB yolağını baskıladığı, ölümsüz hücre hattı oluşmasını ve warburg etkisini somutlaştırıldığı, , HIF2α birikimini artırarak metastaz, invazyona neden olduğu gösterilmiştir.(224-227). Bu anlamda kalıtımsal kanserlerde de olsa 2013 yılına kadar FH enzimi etkisi gösterilmişti. 2013 yılında sporadik renal kanser (228) ve 2015 yılında ise KRK'de *FH* geni içinde yer alan bir TNP'nin (rs12071124) resesif allelinin nüks etmeksizin hayatta kalma süresini artırdığı gösterilmiştir (229). Bu durumda göre olası bir *FH* geni susturulması veya protein yapısında meydana gelen bir değişiklik yine HIF1/2 üzerinden immün bağışıklığı değiştirerek, apoptoza yönelimi değiştirerek veya vaskülerizasyonu değiştirerek KRK gelişimi veya metastaz sırasında etkili olabilir.

Tüm bu bilgiler eşliğinde bahsedilen genlerin yer aldığı yolaklarda minimal düzeydeki değişiklikler birbirlerini etkileyerek kanser gelişimine yatkınlıkta bulunabilirler. Buna ek olarak bu bölgede yer alan henüz karakterize edilmemiş genler de göz önünde bulundurulmalıdır. 1045 uterine leimiyamatozis hastasında yapılan çalışmada 1q43 lokasyonunda yer alan bir lncRNA'nin ifade düzeyi hastalıkla ilişkili bulunmuş ancak bu konuda ileri analizler gerekmektedir (222). Sporadik KRK gelişiminde yatkınlık oluşturduğunu düşündüğümüz KMO ve diğer kynurenin yolağı elemanları özellikle kanser bağışıklığında etkili olabilir, *OPN3* geni *KMO* ile birlikte apoptotik yolakları etkiliyor olabilirler. Son olarak *FH* geni kanser enerji metabolizmasını etkileyen tümör baskılayıcı gen olarak düşünülmektedir. Bu bölgede ifade edildiği bilinen ancak hangi mekanizmalarda nasıl çalıştığı bilinmeyen lncRNAlar da göz önünde bulundurulmalıdır.

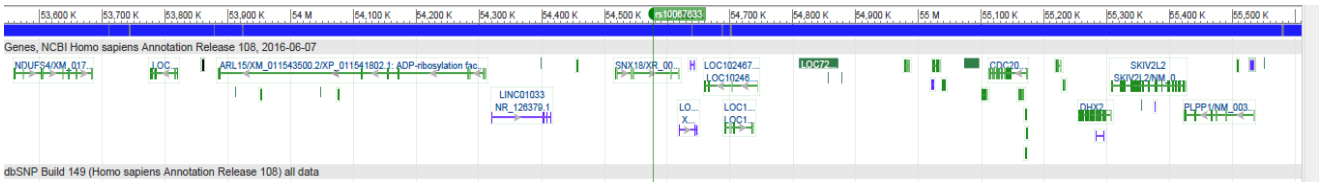
rs10067633, p=0.0181

Yapılan genotipleme analizleri sonrasında 5q11.2 lokalize olan SNX18 geni 3' UTR'de yer alan rs10067633 C>T değişiminin p:0.0181 anlamlılık değeriyle hastalık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. rs10067633 T alelli hastalarda kontrole göre 1.2 kat fazla bulunmuştur. Aşağıdaki çizelgede bu değişim yakın çevresinde yer alan genler verilmiştir (Çizelge 8.5). Gri ile işaretlenmiş genler bu değişimin 5' ve 3' tarafındaki genleri işaret etmektedir.

Çizelge 8.5. rs10067633 C>T değişimi yakın çevresinde yer alan genler

rs10067633 C>T, 5q11.2, p:0.0181	
Gen	**Değişime uzaklık (Kb)**
LINC01033	343
RPL37P25	178
HSPB3	121
SNX18	3'UTR
LOC105378968	58
LOC102467080	81
LOC105378969	138

Bu değişim dbSNP veritabanına göre herhangi bir hastalık ile ilişkilendirilmemiştir ve *SNX18* (*Tasnif neksin 18, "sorting nexin 18"*) gen bölgesi 3'UTR regülatör bölgesinde, ikinci ekzona 31 kb uzaklıkta bulunmaktadır. Buna ek olarak bu TNP'nin 121 kb uzaklığında *HSPB3("heat shock protein family B (small)")* geni bulunmaktadır. Ayrıca bu TNP'ye yakın henüz karakterize edilmemiş birçok gen olduğu belirlenmiştir (*LOC105378967* 41 kb, *LOC105378968* 58 kb, *LOC102467080* 81 kb, *LOC105378969* 138 kb) (Şekil 8.6).



Şekil 8.6. rs10067633 C>T değişimi değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (152)

SNX18 geni 5p11.2'de lokalize SNX protein ailesinin üyesi olan bir gendir. 1996 yılında ilk memeli SNX proteini SNX1-EGFR ilişkisi belirlendiğinden beri günümüzde bu ailenin farklı domain kompozisyonu içeren birçok protein üyesi olduğu gösterilmiştir (230). Evrimsel olarak korunmuş bu aile fosfotidilinosit bağlanma proteinidir ve hücre içinde kargoların tasnif edilmesi, endozomal trafiğin düzenlenmesinde esas proteinlerdendir. SNX ailesi proteinleri, hücre içi vezikül taşınmasında, vezikül şekillendirilmesinde, "ER-golgi

aygıtı-lizozom-plazma memranı" arasındaki haberleşmenin sağlanmasında, mitoz bölünme, sitokinez, otofaji gibi hücre yaşamının önemli aşamalarında, hücreler arası iletişimin sağlanmasında lipit-protein, protein-protein etkileşimlerini sağlayarak kilit noktada bulunmaktadır (231,232). SNX ailesinin tümünde bulunan PX domaini fosfotidil inositler ile bağlanarak protein-lipit etkileşimini sağlamaktadırlar. Fosfotidil inositler hücre içi lipit mesajcısı olarak görev yapmaktadır. Bu lipit mesajcılardan plazma membranında yoğunlukla bulunan fosfotidilinositol (4,5) bifosfat endositoz, ekzositoz, aktin polimerizasyonu, fokal adezyonda yer almaktadır. Ayrıca son yapılan çalışmalara göre hücre içi alt birimlerde endozom, lizozom, nükleus, otofajik öncü memranlar, otolizozom, ER, mitokondri, golgi kompleksi membranlarında da bulunmakta ve endozomal trafik, endozomal geri-dönüşüm, otofagozomal yolakta protein-lipit etkileşiminde hücresel mesajcı olarak görev yapmaktadır (233).

Farklı SNX proteinleri farklı hücresel işlevlerde bulunmaktadır. Örneğin SNX1, SNX2, SNX5, SNX 6 retromer kompleksi içinde yer alarak hücre dışından reseptör bağımlı seçici kargo taşınmasında görev almaktadır (234). SNX9 retromer bağımsız klatrin bağımlı, klatrin bağımsız veya aktin bağımlı hücre dışından kargo taşınmasında esas elemanlardandır (235).

SNX18 proteini SNX9 alt ailesinde bulunmaktadır. Bu ailede sınıflandırılmış SNX9, SNX33 (SNX30) ve SNX18 proteinlerinin "PX-BAR-SH3-LC" domainlerini içererek yapısal olarak benzedikleri gösterilmiştir. Bu proteinler domain bakımından %70 oranında benzeseler de aminoasit dizisi bazında %40 kadar benzemektedirler (236). Bu proteinlerin aynı yolakta birbirlerini tamamlayarak görev aldıklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (235). Ancak endozomal iletişim ağı içinde tüm bu proteinlerin etkileşimi tam olarak ortaya konulmamıştır.

SNX18, PX domaini ile membran yüzeylerinde bulunan fosfotidilinositlere bağlanarak - SNX18 fosfotidil inositol (4,5) bifosfat ile etkileşimdedir- lipit-protein etkileşimini sağlamaktadır. Bu özellik ile SNX proteinleri diğer proteinlerden ayrılmakta ve önem kazanmaktadırlar. BAR domaini membran üzerinde dışarıya doğru çıkıntı yapmış yüzeylere, konkav yapısı ile bağlanır ve genelde küçük veziküller, dar tübüler yapılar üzerinde bulunmaktadır. Bu domaini bükülmez sabit yapısıyla membran tübüler yapısının formunu korumasını sağlar. SH3, LC domainleri de endositik iletişim ağı arasında GTPase, motor proteinleri gibi protein-protein etkileşimini sağlayarak tübüler yapının oluşmasını ve bu endozomun hücre içinde hareket etmesini sağlayacak proteinlere bağlanmasını sağlar (231,234).

2008 yılında Haberg ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre, SNX9, SNX18, SNX33 proteinleri arasında LC domaini en fazla farklılığın gözlendiği domaindir. SNX18 LC domaininden veziküler taşınımda (lizozom) adaptör proteini olan AP-1, PACS-1, dinamin ile kompleks oluşturduğu gösterilmiştir ve plazma membranında gösterilmemiştir (237). Bu durum SNX9'un plazma membranında klatrin bağımlı ve aktin bağımlı endositozda kilit noktada olması nedeni ile şaşırtıcı olmuştur. Ancak 2010 yılında farklı doku/hücre hatlarında yapılan başka bir çalışmada SNX18 plazma membranında da gösterilmiştir. Bu çalışmada açık bir şekilde SNX18 ve SNX9 birbirlerinin yerini doldurduğu, farklı dokularda ifade düzeylerinin değiştiği, aktin polimerizasyonunu sağlayan N-WASP ile birlikte aktin bağımlı pinositozda yer aldıkları gösterilmiştir. SNX18 en fazla beyinde dokusunda gösterilmiştir (238).

Maggie ve arkadaşlarının "SNX9 ailesini" incelediği çalışmada SNX18 de dâhil olmak üzere bu ailenin mitoz bölünme sırasında sitokinezde hücreler arası köprüde doğru proteinleri taşıyan geri-dönüşümlü endozomların doğru yerde olmasını sağladığı gösterilmiştir (239). Sitokinez sırasında apikal membran inisiyasyon bölgesine göçü sağlayan aktivasyonun Rab11FIP5'in glikojen sentez kinaz 3 (GSK-3) fosforillenmesi ile aktive olur. Telofazda gerçekleşen bu modifikasyon ile SNX18-FIP5 etkileşimi sağlanır. Böylece geç telofazda sitokinez boğumlanma noktasında apikal protein taşıyan endozomlar mikrotübüller vasıtası ile ulaşırlar (240). Dolayısı ile SNX18 sitokinezin başlatılması ve boğumlanması (sonlanmasında) sırasında endozomal trafiğin düzenlenmesinde çok önemli proteinlerdendir (239).

Bir diğer önemli çalışmada ise SNX18'in epitel hücre lümen morfogenezi sırasında hücre polarizasyonunda yer aldığı gösterilmiştir. Epitel hücre polarizasyonu glikoprotein yapıda olan müsin gibi apikal bölge proteinlerinin taşınması bu yolla sağlanmaktadır. SNX18'in Rab11FIP5 proteini önderliğinde apikal bölge proteinlerini içeren geri-dönüşümlü endozomların oluşturulmasında aktin bağımlı proteinler ile kompleks oluşturarak (N-WASP, Arp2/3) görev aldığı gösterilmiştir (240,241). Neoplastik hücre gelişimi sırasında hücresel asimetrinin önemi ve epitelyal mezenkimal geçiş sırasında ilk kaybolan özelliğin polarite olduğu çok net bir şekilde bilinmektedir (242,243). Bu bakımdan hücre polaritesinin sağlanması için görev yapan proteinlerin taşınması hayati önem taşımaktadır. Bu yolak içinde SNX18'in başrol oyuncusu olduğu vezikül oluşturulmasının kesilmesi bu yolağın kesilmesine neden olacaktır. Bu açıdan bakıldığında kolorektal kanser grubumuzda anlamlı bulunan bu protein literatür ile çakışmaktadır.

2012 ve 2013 yıllarında yapılan çalışmalarda ise SNX18'in otofagozom oluşturulmasında yer alan proteinlerden biri olduğu gösterilmiştir. SNX18'in erken otofaji vezikülleri olan fagofor gelişiminde diğer otofaji kompleksleri ile birlikte membran yapısının yönlendirmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Buna göre, SNX18 normal hücresel durumda endozomal trafikte AP-1'e bağlanarak –bu etkileşim literatürde olası senaryo olarak geçmektedir- endozomal yolaklarda görev alırken hücresel açlık veya herhangi bir tehlike durumunda otofaji ilişkili proteinlerden olan LC3 ile bağlanarak otofagozomun genişletilmesinde yer almaktadırlar. SNX18 Rab11, ATG16L1, LC3/GABARAB ile kompleks oluşturarak geri dönüşümlü endozomların fagofora katılmasını sonuçta da otofagozomun genişletilmesini sağladığı düşünülmektedir. Ancak bu yeni mekanizmanın ayrıntıları tam olarak bilinmemektedir. Yine de SNX18'in otofaji yolağında yer aldığı açıktır (244-246).

İnvivo çalışmalar, hücrede otofajinin arttırılması veya azaltılması tümör başlangıcı ve gelişmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu dengenin bozulması ile oluşan fazla veya hasarlı organellerin uzaklaştırılamaması, oksidatif stres artışı, p62 ve p53 normal ifade düzeylerinin değişmesi nedeni ile neoplastik hücre gelişimine neden olmaktadır (247). Bu açıdan bakıldığında da SNX18 geninin otofajideki yeri yine kritiktir.

Otofaji-KRK ilişkisi ilk kez 2004 yılında LC3 ifadesinin artışı ile gösterilmiştir. Buna ek olarak Beklin1, ATG5 proteinleri de yoğun olarak çalışılmıştır. Erken dönem kanser gelişiminde etkili olan DNA hasarı, reaktif oksijen türevleri birikimi, hasarlı organeller gibi hücre içindeki anomalilerin giderilmesi ile otofajinin baskılayıcı etkisi olduğu geç dönemde ise tümör hücrelerinin büyümesi, apoptozun inhibisyonu ve ilaç direncinin artırılması ile otofajinin kanser gelişimini artırdığı bilinmektedir. Ekstrem koşullarda normal hücrelerde mTOR bağımlı veya hipoksi bağımlı otofaji aktivasyonu, ile hücre büyümesi sekteye uğrayarak otofajiye yönelim gerçekleşir. Ancak kanser hücrelerinde bu dengeler değişmiştir. Nakagawa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada A grubu streptokoklara karşı otofaji ile hücrelerin korunduğu gösterilmiştir. Normal bağırsak florasında otofajinin proinflamasyonda görev aldığı, özellikle otofaji proteinlerinden ATG16L1'in inflamatuar kolon hastalıkları ile ilişkisi açık bir şekilde gösterilmiştir (248).

2016 yılında yapılan çalışmada metastatik meme kanseri hücre hattında *SNX18* veya *SNX9* susturulmasının metastaz göstergesi olan matriks degredasyonunu sırasıyla azalmasına ve artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Yüksek homoloji gösteren ve literatürde bir arada

aynı yolaklar içinde yer aldığı düşünülen bu proteinlerin birbirlerine zıt etki gösteriyor olması literatürde ilk kez gösterilmiştir. Yine aynı grubun yaptığı çalışmada primer meme kanseri hücrelerinde *SNX9*'un ifadesinin azaldığı, protein seviyesinin düştüğünü ancak metastatik hücrelere bakıldığında ifade düzeyinin arttığı ve metastaz gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir. SNX9 proteini hücresel duruma göre farklı proteinler ile kompleks oluşturmaktadır. Bu proteinin primer meme kanseri hücrelerinde düşük ifade düzeyi ile RhoA/CDC42 aktivasyonunu sağlayarak hücre bölünmesini artırdığı, metastatik hücrelerde ise N-WASP, aktin ile etkileşerek metastatik yayılımı tetiklediği düşünülmektedir (249). SNX18-Kanser ilişkisi güncel bir araştırma konusu olmakla beraber henüz birçok soru işareti barındırmaktadır.

Gen bölgesinde bir diğer gen *HSPB3* genidir. Hücre içinde şaperon olarak görev yapan ısı şok protein B ailesi 3 ("*heat shock protein family B (small) member 3*", *HSPB3*) değişim noktasının yaklaşık 121 kb uzağında bulunmaktadır. Bu protein literatürde çok fazla incelenmemiş ve SNX ailesi ile etkileşimi gösterilmemiştir. *HSPB3* ifadesinin özellikle kas, beyin, kalp, fetal dokularda ifade olduğu (250) ve kalıtımsal motor nöropatilerde (251-253) bu gendeki ilişkilendirilmiştir. Sadece bir çalışmada kanser dokularında arttığı –hepatit B virüs kaynaklı karaciğer kanseri- ifade düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Sınırlı sayıdaki yayınlar incelendiğinde paraloglarından olan *HSPB8*'in, makrootofajide BAG3 şaperonu olarak yer aldığı ve meme kanseri ile ilişkilendirildiği gözlenmiştir. (254-256).

Sporadik KRK gelişiminde yatkınlığa neden olduğunu düşündüğümüz bu TNP ile ilişkilendirilmiş genlerden özellikle SNX18'in otofaji, mitoz bölünme, epitel hücre polarizasyonunda –ve dolayısı ile EMT geçişinde yer alabilir- bulunması ile bu tezimizi desteklemektedir. Buna ek olarak HSPB3 geni sadece bir çalışmada kanserde gösterilmiş olsa da şaperon olarak paralogları gibi hücrede işlev gösterip yatkınlık gelişmesinde etkili olabilir.

rs16829831, p=0.047

Yapılan analizler sonrasında intergenik olan rs16829831 C>G değişim noktası p: 0.047 anlamlılık değeri ile sporadik kolorektal kanser ile ilişkili bulunmuştur. rs16829831 C alelli hastalarda kontrole göre 1.667 kat fazla bulunmuştur. Aşağıdaki çizelgede bu değişim yakın çevresinde yer alan genler verilmiştir (Çizelge 8.6). Gri ile işaretlenmiş genler bu değişimin 5' ve 3' tarafındaki genleri işaret etmektedir.

Çizelge 8.6. rs16829831 C>G değişimi yakın çevresinde yer alan genler

rs16829831 C>G, 3q25.32, p: 0.047	
Gen	**Değişime uzaklık (Kb)**
LOC105375181	185
IQCJ-SCHIP1	11
IQCJ	11
SCHIP1	215
hsa-mir-3919	224
RPS2P19	328
LOC100420738	663
IQCJ-SCHIP1-A	707
LOC101928351	740

Bu değişim dbSNP veritabanına göre herhangi bir hastalık ile ilişkilendirilmemiş ve 3q25.32'de lokalizedir. TNP çevresinde bulunan genler 3q25.32-3q25.33'de toplanmıştır. Bu bölgede özellikle 11 kb uzaklıkta *IQCJ* (*IQ domaini içeren protein J, "IQ motif containing J*") geni ve 215 kb uzaklıkta bulunan *SCHIP1* (*Şvannomin etkileşim proteini*, "*schwannomin interacting protein 1*") bulunmaktadır. Bu gen bölgesinde ilginç olan durum bu iki genin protein ürünlerinin oluşturduğu bir füzyon proteini de içermesidir. Bu füzyon proteini gen bankasında IQCJ-SCHIP1 olarak isimlendirilmiş 2 izoformu olan bir proteindir ve değişim noktasında 11 kb uzaklıkta bulunmaktadır. Ayrıca *SCHIP1* 1-2 intronik gen bölgesinde ve *IQCJ-SCHIP1* 4-5 intronik gen bölgesinde lokalize olan, daha önce sadece insan üreme sisteminde gösterilmiş *hsa-mir3919* miRNA geni bulunmaktadır. Bu miRNA geni değişim noktasına 224 kb uzaklıktadır. *SCHIP1* 2-3 intronik gen bölgesinde ve *IQCJ-SCHIP1* 5-6 intronik gen bölgesinde lokalize olan, TNP noktasından 707 kb uzaklıkta bulunan *IQCJ-SCHIP1-AS1* antisens geni bulunmaktadır. Bunlara ek olarak bu bölgede birçok kodlanmayan gen bulunmaktadır (*RPS2P19, LOC100420738, LOC101928351, LOC105374181*) (Şekil 8.7).



Şekil 8.7. rs16829831 C>G değişimi değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (152)

Günümüzdeki literatüre göre, SCHIP1, IQCJ, IQCJ- SCHIP1 proteinlerinin daha çok glioblastoma ve nöronal gelişim konusunda incelendiği gözlenmiştir (257-261). Ancak veri tabanları incelendiğinde bu proteinlerin daha az çalışılmış olan kolorektal dokuları da dâhil olmak üzere vücudun diğer dokularında ifadesi gösterilmiştir (262). Sadece IQCJ- SCHIP1 proteini veri tabanında insan dokusunda çalışılmamış, Papio anubis (Babun) dokularında gösterilmiştir. IQCJ-SCHIP1 ve SCHIP1 proteinleri içinde CpG adacıkları ve farklı promotorlar sayesinde dokular arasındaki ifade farkının oluştuğu düşünülmüştür (257). SCHIP1 proteinin prostat, hepatoselüler, meme, oral kanserler, kolon adenoma, glioblastoma'da ifade düzeyinin değiştiği, IQCJ proteinin prostat kanseri, lenfoma ve glioblastomada ifade düzeyinin değiştiği gösterilmiştir (262). Bu kabataslak analiz sonrasında literatürde beyin dokusu ile ilişkilendirilmiş bu proteinlerin ifade düzeyindeki değişimlerin farklı dokularda da etkisi olacağı kanısına varılabilir.

IQ motifi içeren Ca^{+2} bağımsız kalmodulin ile bağlanabilen J proteini biyoinformatik analizler ile incelendiğinde evrimsel olarak korunduğu, farklı organizmalarda bulunduğu ve sadece füzyon protein ile homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Hücrede aynı işlevde görev alan farklı IQ motifi içeren proteinler bulunmaktadır. Bu proteinler sözü geçen protein ile veri tabanları tarandığında tam olarak homoloji gösterilememiştir (263-265). Ancak Bahler ve arkadaşlarının çalışması birçok yayında da refere edilerek IQCJ proteini IQ motifi içeren proteinler ile birlikte sınıflandırılmıştır (266). Yapılan çalışmalarda bu proteinlerin işlevsel ve yapısal olarak benzer oldukları düşünülmüştür. Özellikle IQCJ proteininde yer alan IQ motifi Ca^{+2} bağımsız kalmodulin bağlanma domainidir ve Myo1C, Nörogranin, Nöromodulin içinde de yer alan IQ motifine benzemektedir (257,258). IQ motifi içeren bu proteinler hücre büyümesi, aktin ile etkileşerek hücre iskeleti yapısında, ökaryotik hareketin

sağlanmasında, nöronal büyümede, voltaj bağımlı kanallarda, RAS aracı proteinlerinde, iğ ipliği bağımlı proteinlerde, sperm yüzey proteinlerinde yer almaktadırlar (266). Burada vurgulanması gereken IQCJ proteinin yapılan çalışmalarda IQCJ- SCHIP1 füzyon proteini şeklinde gösterilmiş olduğudur.

2006 yılında SCHIP1 proteinin Ca^{+2} bağımsız kalmodulin ile bağlanabilen IQCJ proteini ile füzyon proteini gösterilmiştir. Genom üzerine %4-5 oranında füzyon protein kodlanmaktadır. IQCJ-SCHIP1 proteini de kimerik proteindir ve iki izoformu, 2 farklı transkript ile ifade edilmektedir. Hastalık ile ilişkili bulunan bu gen bölgesi TNP'ye 10 kb uzaklıkta kodlanmaktadır. Kwasnicka ve arkadaşlarının çalışmasında füzyon protein ilk kez belirlenmiş ve konuşma bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada, .füzyon protein erişkin/fetal dokularda ve PC12 dokularında incelenmiş. Erişkin beyin, kalp, böbrek dokusunda, fetal beyin, böbrek, dalak dokusunda yüksek düzeyde ifadelendiği belirlenmiştir. Ayrıca fetal akciğer, kalp, kas dokusunda daha az olacak şekilde ifadelendiği gösterilmiş. Bu protein loblara göre ifade düzeyi değişmekle beraber beyin dokusunda yoğun olarak ifade olmaktadır. Fetal dokuda anlamlı düzeyde fazla ifade olması, büyüme konisi, nöronal dokuda yoğunlaşması büyüme ve farklılaşma ile ilişkili olduğu kanısını oluşturmuştur (257). Veri tabanlarında yaptığımız analizler sonunda bu füzyon proteinin insan dokularında ifade düzeyinin belirlenmediği ancak babunda kolon dokusu da dâhil olmak üzere beyin dokusuna kıyasla az olmakla beraber gen ifadesinin olduğu gösterilmiştir (262). Ancak ilişkili olduğu düşünülen merlin proteini bu çalışmaların hiç birinde bire bir gösterilmemiştir. Sadece 2000 yılında SCHIP proteinin ilk kez belirlendiği çalışmada merlin-schip bağlanması gösterilmiştir (260).

2017 yılına kadar beyin dokusunda aksonal başlangıç bölgesi ve ranvier boğumunu hedef alan çalışmalar sonunda IQCJ-SCHIP1 füzyon proteinin hücre iskeleti, aksonal polarizasyonun sağlanması, bu hücrelerin sürekliliğinin sağlanmasında oluşturulan kompleks için dimerize şekilde bulunduğu gösterilmiştir (267). Goutebroze'nin grubunun 2008 yılından beri yaptığı çalışmalarda, IQCJ-SCHIP1 proteinin nodal ve özellikle hücre-hücre bağlanmasında etkili olan proteinler AnkG, βıv-spektrin, K^+ kanal proteinleri Kv7.2/7.3 kompleks oluşturduğu, membran stabilizasyonu ve polarizasyonda yer aldığı gösterilmiştir (258,259,267). Bu füzyon proteinin, N terminal ucunda yer alan IQCJ'nin daha önce de bahsedildiği gibi Ca^{+2} bağımsız kalmodiline bağlandığı ve muhtemel hücre içi kalsiyum düzeyinin düzenlenmesinde görev aldığı düşünülmüştür. Füzyon proteinin C-terminal ucunda SCHIP1 proteini serin-treonince zengin ucunun kazein kinaz 2 (CK2)

tarafından fosforillendiği ve aktive edildiği gösterilmiştir (258,259,268). Sonuçta bu füzyon protein yoğunlukla beyin dokusunda çalışılmış olsa da hücre iskelet yapısının koruması, hücre içi iyon dengesinin, hücre-hücre bağlanmanın ve dokusal bütünlüğün sağlanmasında yer alması, doku farklılaşmasında olası etkisi nedeni ile kanser gelişiminde etkisi olabilir. Bu olasılığın aydınlatılması için ek çalışmalar gerekmektedir. Etkileşim içinde bulunduğu proteinler göz önünde bulunduğunda bu proteinde gerçekleşecek herhangi bir bozukluk hücre/doku bütünlüğünü bozabileceğinden kansere yatkınlık sebebi olabilir.

2000 yılında SCHIP1 maya ikili hibrit analizi ile tümör baskılayıcı gen protein ürünü NF2/merlin ile bağlandığı gösterilmiş ve SCHIP1 protein ile beyin dokusunda zenginleştiği gösterilmiştir. Bu çalışmada in vitro çalışmalarda merlin proteini doğal mutant varyantı ile SCHIP1 proteinin bağlandığı gösterilmiştir. Ancak aynı durum yabanıl tip merlin- SCHIP1 proteini arasında gösterilememiştir. Bu durum deney kaynaklı olabilir veya normal hücresel dengenin sağlanması için olabilir. İkinci olasılık göz önünde bulundurulursa bu iki varyant merlin proteininin uygun proteinler ile bağlanması ile hücresel homeostasisi sağladığı varsayılabilir (260). Yine de SCHIP1 proteini tümör baskılayıcı merlin etkileşimi- özellikle ERM domaini ile- göz ardı edilemez. ERM proteinlerine yüksek homoloji gösteren sitoplazmada lokalize olan merlin proteini defosforilasyonu hücre-hücre adezyon kaybına neden olduğu, büyüme faktörleri ile hücre dışından alınan uyarımlar ile aktive olduğu ve hücre bölünmesine etkisinin olduğu deneysel çalışmalar ile açıkça gösterilmiştir (269,270). Sonuçta hücre-hücre etkileşimi, proliferasyon, hücresel şeklin sağlanmasında yer alan merlin proteinin olası SCHIP1 etkileşimi bu çalışma ile vurgulanmıştır (260). SCHIP1 proteini ve önceden bahsedilen füzyon protein nörofibramatozis tip 2 ile ilişkilendirilmiştir. *SCHIP* ifade düzeyinin özellikle beyinde ve daha az olmak üzere kolon dâhil vücudun farklı dokularında gösterilmiştir.

Bu protein ile ilgili beyin dışında çok fazla fonksiyonel çalışma olmasa da yüksek örnek hacimli çalışmalarda farklı fenotipler ile SCHIP proteini ilişkilendirilmiştir.SCHIP1 proteini Avrupa toplumunda 28.000 bireyde yapılmış GWAS sonucunda *SCHIP/IL12a* işaret eden TNP'ler 3q25–26 lokasyonunun çölyak hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (271,272). Yine bu proteinin fonksiyonel çalışmalar ile aktin iskeletini düzenleyerek böbrekte glomerular dokuda podosit oluşumunda etkili olduğu, merlin gibi ERM domaini içeren ezrin ve ezrin yüzey lokalizasyonunu aktin etkileşimini sağlayan SLC9A3R2 (NHE-RF2, "*SLC9A3 regulator 2*") proteinlerine bağlandığı gösterilmiştir. Burada vurgulanması gereken ezrin proteinin mikrovillüs hücre iskelet yapısının şeklinin sağlanmasında etken

protein olduğudur. Yani SCHIP proteini ile kompleks halinde bulunan bu proteinler mikrovillüs yapısında da bulunuyor olabilirler. Ayrıca yine bu çalışmada hücre bölünmesi, anjiogenez, embriyolojik gelişim, hücre göçü gibi pro-onkogenik yolaklarda yer alan PDGF tirozin kinaz tarafından uyarıldığı gösterilmiştir (273). Renal hücre karsinomada ve meme kanserinde sitotoksik ilaç uygulamalarında ifade düzeyinin anlamlı derecede değiştiği gösterilmiştir. SCHIP1 proteini bulunduğu lokasyon otizm ile de ilişkilendirilmiştir (274).

2016 yılında Drosophilada yapılan çalışmada Schip-1 proteininin hippo yolağında yer aldığı gösterilmiştir (275). Hippo yolağı elemanlarından WTS ve LATS proteinleri ilk kez 1995 yılında D. melanogaster'de gösterilmiştir. Son 15 yılda bu yolağın diğer elemanları ve birbirleri, diğer yolaklar ile etkileşimleri gösterilmiş, hala yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Hippo yolağı ve bu yolakta olan proteinlerinin hücre büyümesi, hücre polaritesi, kontak inhibisyon, doku rejenerasyonu, metastaz, çevresel faktörlere hücre yanıtına etkisi çarpıcı bir şekilde gösterilmiştir. İlişkili olduğu hücresel fonksiyonlar göz önünde bulundurulduğunda kanser ile ilişkisi şaşırtıcı değildir. Bu konuda birçok çalışma olmakla beraber kolorektal kanser özelinde odaklandığımızda hippo yolağında yer alan bazı proteinler ve protein etkileşimleri ön plana çıkmaktadır. Kolorektal kanser hastalarında çekirdek protein olarak isimlendirilmiş tümör baskılayıcı proteinler MST1/2, LATS1/2 düzeyinin azaldığı gösterilmiş ve prognostik biyobelirteç olabileceği işaret edilmiştir (276).

Kolorektal Hippo-WNT yolaklarının karşılıklı etkileşim içinde olduğu, normal hücrede hippo yolağının WNT yolağını baskılayarak kontrolsüz büyümeyi engellemektedir. Kolorektal kanserde WNT yolağı mutasyonu çok sık gözlendiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda *MST1/2* delesyonunu nükleer YAP1 birikimine neden olarak WNT/β katenin sinyal yolağının aktif olmasına neden olmaktadır (277-279). *KRAS* mutasyonu taşıyan kolorektal kanser hastalarında LATS'in p53 tetrameri oluşumunda inhibitör olan MDM2 proteinini inhibe ederek apoptozu uyarabildiği gösterilmiştir (280). Bir tür kaderin proteini kodlayan *FAT* homoloğu tümör baskılayıcı *DCHS1/2* geninin kolorektal kanserde mutant olduğu gösterilmiştir (281). Yine bu mekanizma içinde yer alan, kolorektal kanser dokusunda gösterilmiş kötü prognoz ile ilişkilendirilmiş LATS2 inhibitörü mikroRNAlar da belirlenmiştir (282). Ayrıca bu mekanizmada epigenetik değişimler olduğu da düşünülmektedir (283).

Bizim çalışmamamızda sporadik KRK ilişkili olan *SCHIP1* 2016 yılında Ching ve arkadaşları Drosphila'da yaptığı çalışmada homoloğu olan *Schip1*'i protein ürünü Hippo

sinyalizasyon yolağında yeni düzenleyici eleman olarak göstermiştir. Bu çalışmaya göre, apikal bölge proteinlerinden FRMD6 homoloğu Ex Tao-1 kinaz proteini arasında köprü oluşturarak Yki (YAP) proteininin inaktivasyonunu sağlayan Hpo (MST) proteinini fosforillediği gösterilmiştir. Buna ek olarak daha önceden bahsedildiği üzere etkileşimin mümkün olduğu Schip-Merlin proteinlerinin yine Tao-1 ile Wts (LATS) fosforilasyonu sağlayarak Yki (YAP) proteini inaktivasyonu ve sonuç olarak da hücre döngüsüne giriş ve apoptozdan kaçışı engellediği düşünülmektedir. (275). Yapılan bu çalışmalar öncü konumunda olan araştırmalardır ve ileri analizler gerektirmektedir. Sonuç olarak Schip1 proteininin Hippo yolağındaki yeri ve kanser gelişimine etkisi aşikardır.

rs16829831'nin işaret ettiği genlerin kanser gelişiminde etkili olduğu literatür bilgisi ile yukarıda anlatılmıştır. Özellikle SCHIP1 proteininin WNT yolağı ile etkileşim içinde olan ve hücre büyümesini kontrol eden hippo yolağında çok önemli kilit proteinlerden olması bu genin sporadik KRK yatkınlık gelişmesinde etkili olabildiğini açık bir şekilde göstermektedir. IQCJ-SCHIP1 membran stabilizasyonundaki yeri hücre-hücre etkileşimini, doku farklılaşmasında yer alıyor olması yine sporadik KRK yatkınlık gelişmesinde etkili olabildiğini göstermiştir. Hastalık ile ilişkili bulduğumuz bu genlerin yine literatür bilgileri eşliğinde rastlantısal olmadığını, ileri analiz yapılmasına değer olduğunu işaret etmektedir.

Aile temelli GWAS sonrasında belirlenen 5 TNP hakkında son olarak,

Analizlerimiz sonucunda intragenik veya intergenik TNP'lerin işaret ettiğini düşündüğümüz genler ve literatüre göre yer aldıkları yolaklar aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir. Buna göre farklı yolaklarda olsa da benzer fonksiyonda yer alan bağışıklık yanıtın oluşumunda 2 gen belirlenmiştir. Diğer genler farklı yolaklarda bulunmakla beraber yolakların biyolojik metabolizma dahilinde etkileşim içinde olabileceği düşünülebilir. Sonuç olarak daraltılmış analizlermize göre belirlenen genlerin yer aldığı yolakların kanser ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu konuda ileri analizler yapılması gerekmektedir.

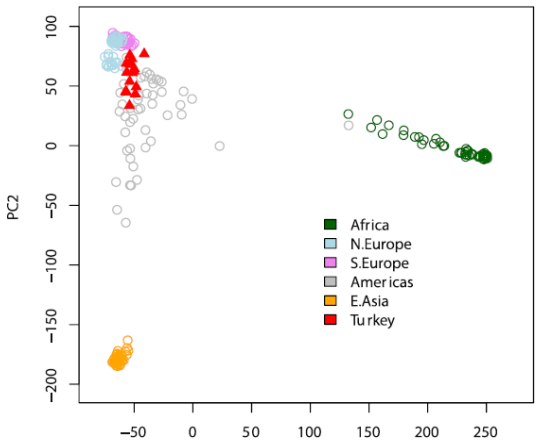
Çizelge 8.7. 75 TNP arasından geniş popülasyonda valide edilen genler ve ilişkili yolaklar

Genin yer aldığı yolak	**Gen İsmi**
Bağışıklık yanıt oluşumu	C8 (p=0.0123), KMO(p=0.0184)
Otofaji	SNX18 (p=0.0181)
Hippo yolağı	SCHIP1 (p=0.047)
Hücre içi kalsiyum homoestasisi	*STIM2* (p:0.0004*)*

Avrupa KRK İlişkili TNP'ler

Daha önce de bahsedildiği üzere bu tez kapsamına Avrupa popülasyonlarında KRK ile ilişkilendirilmiş TNP'ler çalışılmıştır. Bu TNP'ler "rs1035209, rs6691170, rs11169552, rs7136702, rs4925386, rs6983267" şeklinde sıralanabilir. Seçilen bu TNP'lerin neden Avrupa popülasyonlarından seçildiğini izah edebilmek için Türk popülasyonunun günümüz literatürüne göre yerini anlatmak gerekmektedir.

Günümüze kadar Türk popülasyonunda mitokondrial DNA, Y kromozomu veya otozomal kalıtım belirteçleri kullanılarak filocoğrafik popülasyon genetiği analizleri yapılmıştır. Literatürü incelediğimizde bu analizler sonunda oluşan genel yargı Anadolu Türklerinin ve Azeri Türklerinin, Asya popülasyonuna kıyasla Avrupa popülasyonuna daha çok benzediği şeklindedir (284-288). Bu çalışmalara ek olarak genomik düzeyde mikrodizin teknolojisi kullanılarak yapılan 2012'de yayınlanmış bir diğer çalışmada ise PC analizi (PCA) sonunda Türk toplumunun Avrupa ve Orta Doğu'ya benzediği ancak yine de tüm gruplardan ayrıştığı gösterilmiştir (289). Türk toplumunda 90'lı yıllardan beri yapılan bu tip çalışmalardan sonra 2014 yılında ilk kez tüm genom boyu DNA dizi analizi 16 sağlıklı bireyde yapılmıştır ve sonuçları yayınlanmıştır. Bu sonuçlar 1000 genom projesinde yer alan 14 popülasyon ile kıyaslandığında PC analizlerine göre Türk popülasyonunun Avrupa'ya özellikle İtalyan ve İspanyol popülasyonuna benzediği gösterilmiştir (290) (Şekil 8.8).



Şekil 8.8. Alkan ve arkadaşlarının ilk kez Türk toplumunda yaptığı yeni nesil analiz PCA sonuçları (290)

Bu tez çalışmasında incelenen ve daha önceden de bahsedilen Avrupa KRK ile ilişkilendirilen TNP'ler "rs1035209, rs6691170, rs11169552, rs7136702, rs4925386, rs6983267" (291-293) şeklinde sıralanabilir (Çizelge 8.2). rs1035209 C>T değişimi *NKX2-3, SLC25A28* genleri arasında bulunmaktadır. rs3217810 C>T değişimi *CCND2* geni 3-4. intron içinde bulunmaktadır. rs6691170 G>T değişimi henüz görevi belirlenmemiş *LOC105372950* geni içinde bulunmaktadır. Kodlanan en yakın gen -130kbp- *DUSP10* geni bulunmaktadır. rs11169552 C>T değişimi *ATF1* ve *DIP2B* genleri arasında bulunmaktadır. rs7136702 C>T değişimi *LARP4* ve *DIP2B* genleri arasında bulunmaktadır. rs4925386 C>T değişimi *LAMA5* geni 10-11. intron içinde bulunmaktadır. Son olarak yaptığımız genotipleme analizleri sonrasında 7 TNP arasında Türk toplumu ve sporadik KRK ile ilişkili bulduğumuz tek TNP rs6983267 G>T değişimi *CCAT2* uzun kodlanmayan RNA içinde bulunmaktadır.

Çizelge 8.8.Avrupa toplumlarında KRK ile ilişkilendirilmiş bu tez çalışmasına dâhil edilmiş TNP'ler

Kromozom Lokusu	Yakın Gen(ler)	TNP rs numarası	p değeri	Hasta/Kontrol Sayısı	Lokasyon	Referans	PMID ID
1q41	DUSP10	rs6691170	$9.55x10^{-10}$	18.095/20.197	intronik	Houlston vd. 2010	20972440
8q24	CCAT2/CASC8	rs6983267*	$3.16x10^{-11}$	7.480/7.779	gen içi/intronik	Zanke vd. 2007	17618283
			$1.27X10^{-14}$	4.361/3.752		Tomlinson vd. 2007	17618284
10q24.2	ABCC2, MRP2	rs1035209	$4.54x10^{-11}$	5.626/ 7817	5' intergenik	Whiffin vd. 2014	24737748
12p13.32	CCND2	rs3217810	$2.16x10^{-10}$	5.626/ 7817	intronik	Whiffin vd. 2014	24737748
12q13	DIP2B, ATF1	rs11169552	$1.89x10^{-10}$	18.095/ 20.197	5' intergenik	Houlston vd. 2010	20972440
12q13	DIP2B, ATF1	rs7136702	$4.02x10^{-8}$	18.095/ 20.197	5' intergenik	Houlston vd. 2010	20972440
20q13.33	LAMA5	rs4925386	$1.89x10^{-10}$	18.095/ 20.197	intronik	Houlston vd. 2010	20972440

**çalışma grubumuzda genotipleme analizi sonrasında p<0.05 bulunan TNP*

rs6983267, p=0.0018

CCAT2 geni ekzon 1'de, CASC8 geni intronik bölgede yer alan 6983267 G>T değişimi 8q24.21'de lokalizedir ve p=0.0018 anlamlılık değeri ile çalışma grubumuzda ilişkili bulunmuştur. rs6983267 G alelli hastalarda kontrole göre 1.225 kat fazla bulunmuştur. dbSNP veritabanına göre klinik olarak kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiştir. Aşağıda bu değişim noktası yakın çevresinde bulunan genler verilmiştir. Gri ile işaretlenmiş genler bu değişimin 5' ve 3' tarafındaki genleri işaret etmektedir (Çizelge 8.9).

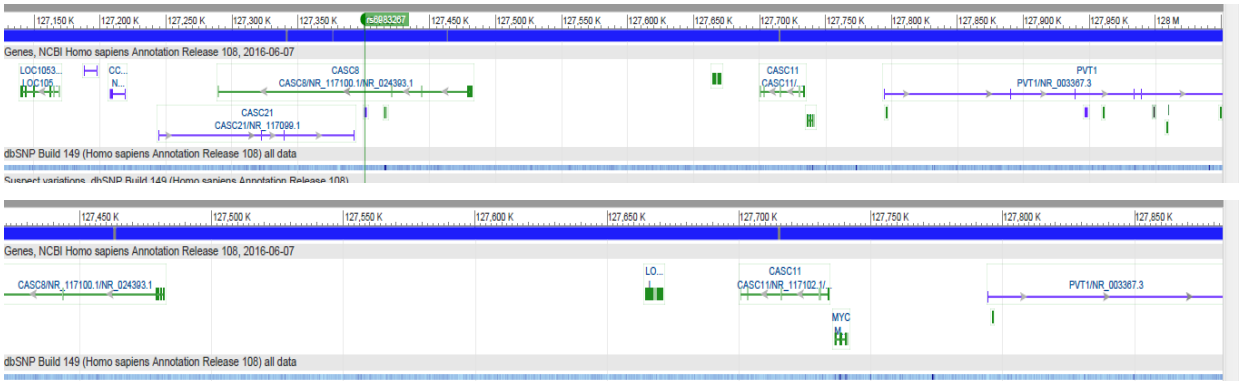
Çizelge 8.9. rs6983267 G>T değişimi yakın çevresinde yer alan genler

rs6983267 G>T, 8q24.21, p=0.0018	
Gen	**Değişime uzaklık (Kb)**
CASC8	intron 5-4 içinde
CCAT2	ekzon1
CASC21	71
POU5F1B	14
CCAT1	182
CASC19	204
LOC105375752	231
PRNCR1	308
SRRM1P1	313
PCAT2	318
LOC105375754	263
CASC11	299
MYC	355

Literatüre göre rs6983267 değişimi farklı toplumlarda prostat, mide, pankreas, endometriyum, meme, kolorektal kanseri ile ilişkili bulunmuştur (294-300). GWAS veya

metaanaliz çalışmaları sonrasında bu TNP'nin Avrupa, Asya, Amerikan toplumlarında kolorektal kanser ile çok anlamlı p değeri eşliğinde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu değişim çevresinde protein ürünü olmayan ancak moleküler mekanizmalarda düzenleyici olarak görev yapan birçok kodlanmayan RNA yer aldığı düşünülmektedir. rs6983267 değişimi uzun genler arası kodlanmayan RNAlar/uzun kodlanmayan RNAlar (sırasıyla lincRNA/lncRNA) *CCAT2* ve *CASC8* genleri içinde bulunmaktadır. Özellikle vurgulanması gereken bu değişim noktasının *CCAT2* geni ekzonik bölgede lokalize olduğudur. Bu nedenle literatürde rs6983267 değişimi özellikle *CCAT2* geni ile ilişkilendirilmiştir. Aşağıda genomik bölge ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Bu genomik bölgeyi incelediğimizde kolayca anlatılabilmesi için TNP'yi içeren yaklaşık 1500 kb'lık alan 4 gen toplanma alanına bölünmüştür. Bu genomik alanda ilk bölge, özellikle prostat kanseri ile ilişkilendirilmiş TNP'den 308 kb uzaklıkta bulunan kodlanmayan lncRNA'lar *PRNCR1, PCAT2* ve pseudogen *SRRM1P1* bulunmaktadır. Bu genler sırası ile TNP'ye 308 kb, 318 kb, 313 kb uzaklıktadır. İkinci bölgede, lncRNAlar *CASC19* ve özellikle KRK prognozu ile ilişkilendirilmiş *CCAT1* geni bulunmaktadır. Bu genler değişim noktasına sırası ile 204 kb, 182 kb uzaklıktadır. Üçüncü bölge TNP'nin de lokalize olduğu bölgedir. Bu bölgede yer alan *CASC8* ve *CCAT2* genleri zıt yönlerde ifadelenmekle beraber TNP'nin lokalize olduğu genlerdir. rs6983267 *CASC8* geni içinde intron 5-6'da, *CCAT2* geninde ise tek ekzonla kodlanan gen içinde 662. nükleotitte lokalizedir. Bu genlere ek olarak, lncRNA *CASC21* ve pseudogen *POU5F1*(*OCT4 pseudogen*) genleri değişim noktasına sırası ile 71 kb, 14 kb uzaklıktadır. Son olarak dördüncü bölgede TNP'ye 299 kb uzaklıkta toplanmış lncRNA *CASC11* ve onkogen *MYC* bulunmaktadır. Bu genler değişim noktasına sırası ile 299 kb, 335 kb uzaklıktadır. Ayrıca bu genomik bölgede henüz karakterize edilmemiş genler de bulunmaktadır *(LOC105375752, LOC105375754*) (Şekil 8.9).



Şekil 8.9. rs6983267 G>T değişimi değişimini içeren 1500 kb genomik bölge genel görüntüsü (152)

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda rs6983267 değişimini içeren genomik bölgenin kanser gelişiminde uzun yıllardır araştırılan onkogenlerden *MYC* genini etkilediği gösterilmiştir. *MYC* geni enhanser bölgesinde yer alan rs6983267değişimi G allelinin T alleline göre WNT sinyaline daha hızlı yanıt verilmesinde avantaj sağladığı ve bu değişimi içeren regülatör bölgenin *MYC* onkogeni promotoru ile etkileşime girdiği, buna ek olarak da birçok tümörde ifade düzeyi bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir. Pomerants ve arkadaşları ENCODE sonuçlarına göre, rs6983267 enhanser motiflerin olduğu bölgede bulunmaktadır (301,302). Bu değişimi içeren bölgenin WNT yolağı TF'lerinden, DNA bağlanma proteini, TCF4 ve yine WNT yolağının aktivasyonunda yer alan beta katenini etkilediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda TCF4 bağlanmasını etkileyerek rs6983267 G allelinin WNT sinyalizasyonu düzenlenmesi ile KRK gelişiminde etkili olabileceği gösterilmiştir (302-304). 2007 yılından beri yapılan çalışmalarda rs6983267 değişiminin kolorektal kanser ile ilişkili olduğu farklı toplumlarda popülasyon temelli GWASlar, fonksiyonel çalışmalar, primer hücre kültürlerinde gösterilmiştir. rs6983267 değişim noktası ilk sırada KRK ile ikinci sırada ise prostat kanseri gelişimi, prognozu veya alt tipi ile ilişkilendirilmiştir. (293,299,301,302,304-306). Hayvan modelinde enhanser bölgenin delesyonları sonrasında intestinal tümörlerin baskılanması bölgenin tümörigenik fonksiyonu olduğunu desteklemiştir (307). Sonuç olarak rs6983267 değişimini içeren bölgenin WNT yolağı ve dolayısıyla KRK gelişimine katkıda bulunduğu birçok grup tarafından gösterilmiştir.

2000'li yılların başında miRNAların keşfi ile post transkripsyonel gen düzenlenmesi konusunda devrim niteliğinde değişimlere neden olmuştur. Bu durum tüm hastalıklarda olduğu gibi kanserin moleküler patogenezinin incelenmesinde de bilinen mekanizmaların yeniden gözden geçirilmesine, yeni başlıklar oluşmasına neden olmuştur. Kodlanmayan miRNAlara ek olarak uzun genler arası kodlanmayan RNAlar (lncRNA) da moleküler biyoloji literatürüne eklenmiştir. Uzun genler arası kodlanmayan RNAlar transkript uzunluğu 200bç'den uzun nükleotitlerdir ve son ürünleri proteine dönüşmeden RNA olarak görev yapmaktadırlar. Protein ürünü olmayan bu genlerin çoğu RNA Polimeraz II ile kodlanarak splise olur ve poliadenin kuyruğu eklenirler. Önceden "Junk" DNA olarak adlandırılan genomik bölge içinde yer alan bu genlerin. insan genomunda 15.000 lncRNA kodladığı düşünülmektedir (308). Son yapılan çalışmalarda lncRNAların gene özgü transkripsiyon aktivasyonunda, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda, direkt RNA polimeraz ile etkileşime geçerek, post trankripsyonel düzenlenmede, splising işleminde, tranlasyonda, epigenetik düzenlenmede görev aldığı gösterilmiştir. Özellikle KRK gelişimi

ile ilişkili bulunmuş lncRNA belirlenmiştir. KRK gelişimi, farklılaşma, proliferasyon, apoptoz, farklılaşma, metastaz, invazyonu düzenlediği düşünülen bu kodlanmayan RNAların genel anlamda hücrede epigenetik mekanizmaları, miRNA düzeyini, protein aktivitesini veya hücresel lokasyonunu düzenleyerek ve öncü miRNA/pseudogen gibi davranarak görevlerini yerine getirmektedirler (309). LncRNAdb veritabanında insan genomunda fonksiyonel olarak belirlenmiş 184 lncRNA bulunmaktadır (310).

CCAT2 geni ilk kez 2013 yılında gösterilmiş ve KRK dokularında yüksek, normal kolon dokusunda çok düşük ifade düzeyi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca MSS KRK'de MSI-H tümörlere ve normal dokulara göre yüksek *CCAT2* ifadesi gösterilmiştir. *CCAT2* ifade düzeyinin CIN skoru ile pozitif olarak korele olduğu da gösterilmiştir. CCAT2'nin, *MYC* tarafından aktive edilen miR-17-5p, miR-20 ile etkilenerek invazyon ve metastazı etkilediği belirlenmiştir. Hem miRNA hem de protein etkileşimleri ile WNT yolağı aktivasyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır. Kolon dokusunda bu lncRNA'nın TCF7L2 ile etkileşerek *MYC* ifade düzeyini regüle ettiği düşünülmektedir (311,312). Linz ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada CCAT2 rs6983267 G alleli ifade düzeyinin İtalyan kohortlarda anlamlı düzeyde yüksek iken İngiltere örneklerinde bu durum gözlenmemiştir. Yine GG genotipinin KRK hastalarında CCAT2-MYC düzeyi korele olduğu gösterilmiştir. MSS KRK'de CCAT2 rs6983267 G allelin sık gözlendiği belirlenmiştir (313). *CCAT2* geni karaciğer, mide, endometriyal kanseri, kolorektal kanser hastalarında hastalık gelişiminde ilişkili olduğu ve son ürününün WNT yolağını etkilediği fonksiyonel çalışmalar ile gösterilmiştir (301).

2016 yılında Redis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CCAT2'nin glutamin metabolizmasında düzenleyici olarak yer aldığı, kanser hücrelerinde enerji metabolizmasını etkilediği gösterilmiştir. *CCAT2* rs6983267 G/T değişiminin bu iki yolak arasında allel spesifik regülatör olduğu, allele özgü olarak glutamin-enerji metabolizma düzeyinin değiştiği, kanser hücrelerinde bu mekanizmanın bozulduğu gösterilmiştir (314). Glutamin esansiyel aminoasitlerden olmakla beraber lipit metabolizmasında, TCA döngüsünde enerji metabolizmasında, amino asit biyosentezinde kilit noktada yer aldığı için kanser gelişiminde de etkili olduğu bilinmektedir. Glutamin yukarda bahsedilen döngülere katılabilmesi için glutaminaz (GLS) enzimi ile glutamata dönüştürülmelidir (315). Bu noktada, CCAT2 lncRNAsı, GLS protein düzeyi ve izoformun belirlenmesinde yer almaktadır (314). Normal hücrelerde iki farklı izoforma –GAC, KGA- dönüşebilen pre-mRNA glutaminaz, ileri memelilerde bulunan 3' post transkripsyonel ve pre-mrna splays regülatör kompleksi

Kesilme faktörü I (“Cleavage Factor I”, CFIm) aracılığı ile hücresel duruma göre işlenmektedir (316). CCAT2 hem pre-mRNA’ya hem de protein kompleksine bağlanarak düzenleyici görev yapmaktadır. CCAT2 “rs6983267 G” allelik izoformunun katalitik aktivitesi yüksek düzeydeki mitokondriyal GAC enzimi ifadesini artırdığı, bu sebeple enerji metabolizmasını hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada KRK kanser hücrelerinde CCAT2 ve GAC düzeyinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca CFım alt birimi CFım25’in CCAT2 ile GAC düzeyini artırıp KGA düzeyini azalttığı belirlenmiştir. CFım25 geni *NUDT21* ifade düzeyinin MYC TF ile düzenlendiği gösterilmiştir (314). Ayrıca KGA transkripsiyon düzeyinin MYC bağımlı hsa-mir-23 ile düzenlenmesi ile azaldığı düşünülmektedir (317). Metabolik olarak bu kadar önemli olduğu gösterilen hücresel elemanların kanser hücreleri üzerine etkisi de şaşırtıcı değildir. GLS düzeyi bozukluğu birçok kanserde olduğu gibi KRK’de de gösterilmiştir (318-320).

CASC8 geni mide, akciğer kanseri, kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiştir (321-323). *CASC8* geninde yer alan rs6983267 değişiminin insilico analizler sonunda gen ürününde değişimlere neden olduğu gösterilmiştir (323). Ancak CCAT2’de olduğu gibi ileri analizler yapılmamıştır. CASC21 de bu bölgede yer alan henüz araştırılmamış lncRNAlardandır.

2013 yılında yapılan bir diğer çalışmada *MYC* geni 400 kb uzağında yer alan *CCAT1* lncRNA promotor bölgesinin *MYC* enhanser bölgesinin fiziksel olarak etkileşime girdiği ve ifade düzeyini değiştirdiği belirlenmiştir. rs6983267 G değişimini içeren dokularda *CCAT1* ifadesinin T alleli taşıyanlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. CCAT1 düzeyinin KRK hücre kültürü ve primer dokularında yüksek olduğu da gösterilmiştir (301).

8q24 kromozomal bölgede *MYC* genine yaklaşık 2.1 kb uzaklıkta bulunan CASC11 rs16902359 değişimi ile de ilişkili bulunmuştur. Zhang ve arkadaşlarının 2016’da yapmış olduğu çalışmada CASC11 lncRNA’sının KRK dokuları ve hücre kültürlerinde ifade düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada CASC11 ifade düzeyinin tümör boyutu, tipi, TNM sınıflandırması gibi fenotipik değişimlerde etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca CASC11’in pre-mRNA yeniden düzenlenmesinde görev alan hnRNP-K nükleoprotein ile etkileşime girerek protein stabilitesini, KRK dokularında normal dokulara kıyasla hnRNP-K düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Yapılan invivo fonksiyonel analizler ile *CASC11* düzeyinin artış/azalışının WNT yolağı hedef moleküllerini -β-katenin, SiklinD1, MMP7- paralel şekilde etkilediği gösterilmiştir. CASC11- hnRNP-K etkileşimi ile nükleer β-katenin birikiminin arttığını ve WNT yolağı aktivasyonunun sağlandığı belirlenmiştir. Bu durum

özellikle hnRNP-K öncülüğünde gerçekleşmektedir. Myc TF'nün *CASC11* promotor bölgesine bağlanarak histon asetilasyonunu yönlendirerek *CASC11* ifadesini artırdığı gösterilmiştir. Sonuçta, KRK patogenezi sırasında CASC11- hnRNP-K etkileşimi ile WNT sinyalizasyonu dolayısı ile hücre büyümesine, metastaza yönlendirdiği, farklı alt tiplerin oluşumunda etkisi olduğu gösterilmiştir (324). Bu konuda allele özgü fonksiyonel çalışmalar yapılmamıştır.

Prostat kanser ilişkili bölge yer alan lncRNAlardan PRNCR1 androjen reseptöre bağlanarak prostat kanserini artırdığı gösterilmiştir (325,326). 2013 yılında yapılan çalışmada bu bölge KRK ile ilişkilendirilmiş ancak moleküler mekanizma belirlenmemiştir (327).

Bu gen bölgesinde yer alan *POU5F1B* (*POU sınıf 5 homebox 1B "POU class 5 homeobox 1B"*) geninin ifadesi sırasında promotor bölgeye bağlanan genel TFlerin yönlendirilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. *POU5F1B* (*OCT4-PG1, POU5F1P1*) geni özellikle prostat kanserinde hastalık ile ilişkili bulunmuştur (328-330). Bu gen pseudogen olarak sınıflandırılmış olsa da protein kodladığı ve embriyonik kök hücrede en önemli TFlerinden olan OCT4 proteinine çok benzediği gösterilmiştir (328). Tek farkı transkripsiyonel aktivasyonda daha az etkili olmasıdır (331). Bu proteinin göz gelişimi ve karsinogenezde rol alabileceği düşünülmektedir.

Sonuçta rs6983267 değişiminin işaret ettiği, yüzlerce GWAS çalışmasının kanser ile ilişkili bulunmuş 8q24 genomik lokasyonunda kodlanan gen bulunmasa da transkripsiyon sonrası düzenlenmede görev aldığı düşünülen/gösterilmiş uzun kodlanmayan RNA genleri bulunmaktadır. Bu lncRNA genleri *CCAT1, CCAT2, CASC11* gibi bazılarının moleküler etkileşimleri fonksiyonel olarak gösterilmiş olsa da büyük çoğunluğu henüz aydınlatılmamıştır. Sporadik KRK ile ilişkili olduğunu belirlediğimiz TNP CCAT2 geni içinde bir varyasyon oluşturmakla beraber, bu değişim tüm bölgeyi ifade etmektedir. Genomik olarak yakın olan bu genler birbirlerini etkiliyor olabilir ve bağlantı eşitsizliği ile birlikte kalıtılıyor olabilirler. Araştırdığımız 7 Avrupa KRK ilişkili TNP'lerinden sadece rs6983267 değişiminin bizim popülasyonumuzda ilişkili bulunması, toplum temelli çalışmaların ve bu lokasyonun önemini vurgulamakta, ileri analizlerin yapılmasını gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca kodlanmayan genlerin önemini çarpıcı bir şekilde ortaya koymaktadır.

Kurucu Etkisi Tartışma ve Sonuç,

Kurucu etkisi belirlendiği düşünülen 4 örnekte yeni nesil DNA dizi analizi hizmet alımı ile yaptırılmıştır. Yapılan analizler sonunda özellikle 1 değişim noktası belirlenmiştir. dbSNP veritabanına göre rs6783546 olarak isimlendirilen bu TNP 1 hastada heterozigot (AC), 3 hastada ise homozigot mutant (CC) olarak gösterilmiştir. ARPP21 geni intronik bölgede lokalize olan bu değişim rs6783546 A>C olarak isimlendirilmiştir.

Yeni nesil DNA dizi analizi sonrasında örneklerin kalite kontrol analizlerine göre Q (quality) değerleri 10 olarak belirlenmiştir. Bu değer 30 ile 50 arasında optimal olarak kabul edilmektedir. Buna göre bizim örneklerimizde yanlış baz okuma değeri 10 bazdan 1'inde olacak şekilde sınıflandırılmaktadır (332). Ayrıca 4 örnekte novel mutasyon belirlenmiş değişim noktası okunan dizi tekrarı ("sequence of depth") 19 ile 35 arasında değişmektedir. Literatürde 35 ve üstü optimal olduğu bilinen bu değerler de güvenilirliği düşürmektedir (333). Buna ek olarak literatürde yapılan karşılaştırmalarda yeni nesil dizi analizi sonrasında istatistiksel olarak TNP'lerin kontrolünde kullanılan GATK (The genome analysis toolkit) aracının Varscan-cons gibi programlara göre yanlış pozitif sonuç verebildiği gösterilmiştir (334,335). KASP analizi ile bu değişimin valide olamamasının nedeni yukarıda bahsedilen sebeplerden dolayı olabilir.

Çizelge 8.10. Yeni nesil dizi analizi Kalite kontrol analiz değerleri

Kalite Skoru (PQ)	**Hatalı baz olasılığı**	**Baz okuma güvenilirliği**
10	10'da 1	90%
20	100'de 1	99%
30	1000'de 1	99.90%
40	10.000'de 1	99.99%
50	100.000'de 1	100.00%

Tez kapsamında yer alan diğer bir iş paketi olan bu bölgede bulunan genlerin ifade düzeyinin belirlenmesidir. Bu amaçla örneklerin RNA İzolasyonu yapılmış ancak qRT-PCR analizleri bütçe nedeni ile yapılamamıştır. Bu analizler tez savunması sonrasında yapılarak dizi analizi verisi ile kıyaslanacaktır.

Sonuç ve Öneriler,

- Sistematik bir şekilde yapılmış bu araştırma sonucunda ilk kez Türk toplumunda sporadik KRK ilişkili gen veya TNP'ler ortaya konulmuştur.
- Bu TNP'lerden 3 tanesi intragenik, 2 tanesi ise intergenik olarak bulunmaktadır.
- Türk toplumunda aile temelli genom boyu asosiyasyon çalışması sonunda sporadik KRK ile ilişkilendirilmiş genomik bölgeler "1p32.2, 1q43, 4p15.2, 5q11.2, 3q25.32" olarak belirlenmiştir.
- Tüm Anadolu popülasyonunu temsil ettiğini düşündüğümüz çalışma grubumuzda anlamlı bulunan TNP'lerden ikisi "*C8A, KMO, SNX18"* genleri içinde lokalizedir. Hastalık ile ilişkili bulunan diğer iki TNP'ler "IQCJ, IQCJ-SCHIP, SCHIP*", "STIM2-LOC101929199"* genleri yakınında lokalizedir.
- Avrupa popülasyonlarında büyük gruplar ile yapılmış analizler sonunda belirlenen 7 TNP'yi kendi hasta-kontrol grubumuzda incelediğimizde rs6983267 numaralı TNP dışında geriye kalan 6 TNP'nin hastalığa herhangi bir risk getirmediği veya koruyucu etki sağlamadığı belirlenmiştir.
- rs6983267 değişiminin işaret ettiği gen bölgesi kodlanmayan genlerin kanser ve KRK gelişiminde allelik değişime etki gösterdiği literatürde fonksiyonel olarak gösterilmiştir.
- Bu da hastalık ile ilişkili bulunan değişim noktası yakın lokasyonunda bulunan işlevi bilinmeyen genlerin önemini artırmaktadır.
- Yapılan bu analizler kendi toplumumuzda hastalık moleküler patolojisinin ortaya çıkarılmasında, hastalığa yatkınlığın belirlenmesinde kullanılmak üzere GWAS analizleri sonuçlarının önemini göstermiştir.
- Literatür eşliğinde işaret edilen bu genomik bölgelerde yer alan genlerin kanser veya KRK patogenezinde yeri olduğu gösterilmiştir.
  - Kurucu etkisi belirlendiği düşünülen gen bölgesinde yeni nesil DNA dizi analizi ve validasyonlar sonunda 4 hasta arasında korele anlamlı bir değişime rastlanmamıştır. Ancak genomik bölgede yer alan *has-mir-128-2* ve *ARPP21,ARPP21-AS* genleri ifade düzeyine bakılarak bu çalışma tamamlanacaktır.
  - TNP'lerin işaret ettiği bölgelerde bu çalışmada gösteremediğimiz olası fenotipe yansıyabilen haplotipler olabilir. İleriki çalışmalarda, aile temelli GWAS verileri yeniden analiz edilerek anlamlı bulun 5 TNP çevresinde haplotip bloklarının varlığı kontrol edilecektir.

- TNP-fenotip analizi için proje dahilinde topladığımız demografik-klinik bilgiler karşılaştırılacaktır.
- Çalışma sonuçlarımız uygun araçlar kullanılarak eQTL analizi ile yeniden değerlendirilecektir.
- Genom regülatör bölgeleri, cis-trans etkileşimleri ortaya koyan "Chromosome conformation capture" (3C) teknolojisi temelli yöntemler ile -4C, 5C- anlamlı bulunan genomik bölgelerde ileri analiz yapılabilir.

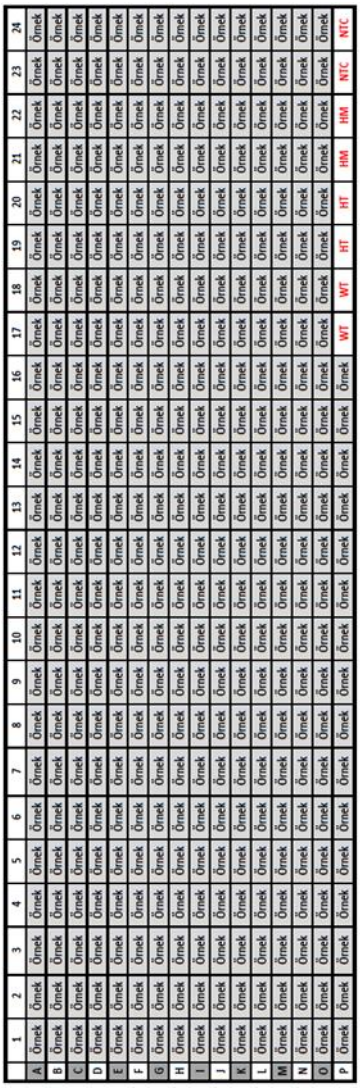
Sonuç olarak bu çalışma ile sporadik KRK kanser ile ilişkili olduğu düşünülen genomik bölgeler farklı analizler ile araştırılarak 6 farklı anlamlı gen bölgesi belirlenmiştir. Böylece Türk toplumunda ilk kez aile temelli genom boyu asosiyasyon çalışması tamamlanmıştır. Bu aşamadan sonra bu bölgelere odaklanarak ileri analizlere geçilmesi gerekmektedir.

EK 1: 112S634 -Proje dahilinde Örnek Akışını Sağlandığı Merkezler

İç Anadolu	
Ankara	Ankara Üniversitesi İbni Sina Hastanesi
Ankara	Ankara Üniversitesi Cebeci Hastanesi
Ankara	Akay Hastanesi
Ankara	Gata Hastanesi
Ankara	Ankara Onkoloji Hastanesi
Ankara	TOBB ETU Hastanesi
Ankara	Abdurrahman Yurtalan Hastanesi
Ankara	Ankara Dışkapı Hastanesi
Ankara	Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Ankara	Ankara Numune Hastanesi
Kayseri	Kayseri EAH
Eskişehir	ESOGÜ Tıp Fakültesi Hastanesi
Akdeniz	
Adana	Ç.Ü.T.F Hastanesi
Adana	Adana Numune Hastanesi
Hatay	Hatay Devlet Hastanesi
Hatay	İskenderun Devlet Hastanesi
Hatay	Özel Antakya Akademi Hastanesi
Antalya	Antalya Eğitim Ve Araştırma Hastanesi
K.Maraş	Kahraman Maraş Sütçü İmam Üniversitesi Hastanesi
Ege	
Denizli	Pamukkale Üni. Tıp Fakültesi Hastanesi
İzmir	Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Hastanesi
İzmir	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Aydın	Aydın Atatürk Devlet Hastanesi
Karadeniz	
Trabzon	KTÜ Farabi Hastanesi
Bolu	A.İ.B.U Tıp Fakültesi Genel Cerrahi
Zonguldak	Zonguldak Atatürk Devlet Hastanesi
Zonguldak	Özel Level Hastanesi
Zonguldak	B.E.Ü. Genel Cerrahi
Tokat	G.O.P Üniversitesi Hastanesi

Ordu	Ordu Kumru Hastanesi
Samsun	Samsun Eğitim Araştırma Hastanesi
Marmara	
İstanbul	İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi
İstanbul	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi
İstanbul	Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi
İstanbul	Acıbadem Fulya Hastanesi
İstanbul	Acıbadem Maslak Hastanesi
İstanbul	LIV Hastanesi
İstanbul	İstanbul Özel Hastanesi
Bursa	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
İstanbul	Ümraniye EAH
Doğu Anadolu	
Erzurum	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Van	Muradiye Devlet Hastanesi
G doğu Anadolu	
Diyarbakır	Diyarbakır Memorial Hastanesi
Diyarbakır	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
G.Antep	Şehit Kamil Devlet Hastanesi

EK 2: 112S634-KASP Çalışma Plaka Düzeni



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
B	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
C	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
D	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
E	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
F	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
G	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
H	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
I	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
J	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
K	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
L	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
M	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
N	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
O	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek
P	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	Örnek	WT	WT	HT	HT	HM	HM	NTC	NTC

EK 3: KASP Deneylerinde kullanılmış TNP isimlendirme, rs numarası ve allel bilgileri

NO	rs ID	AlleleFAM	AlleleHEX
TNP 1	rs7535497	G	T
TNP2	rs7523855	C	T
TNP 3	rs635833	A	G
TNP 4	rs582435	C	T
TNP 5	rs17038218	G	T
TNP 6	rs7368345	A	G
TNP 7	rs1359059	C	T
TNP 8	rs7516468	A	T
TNP 9	rs3007737	A	G
TNP 10	rs7589253	A	G
TNP 11	rs858942	C	G
TNP 12	rs765336	A	C
TNP 13	rs7590275	A	G
TNP 14	rs9310445	C	T
TNP 15	rs1608314	A	G
TNP 16	rs4678850	C	T
TNP 17	rs1967416	A	T
TNP 18	rs6784978	A	G
TNP 19	rs6826441	A	G
TNP 20	rs13127425	C	T
TNP 21	rs688551	A	G
TNP 22	rs10067633	C	T
TNP 23	rs1820132	C	T
TNP 24	rs12654624	C	T
TNP 25	rs7705454	A	G
TNP 26	rs6928177	C	T
TNP 27	rs3798721	A	C
TNP 28	rs2500080	A	G
TNP 29	rs2495244	A	G
TNP 30	rs6917841	C	T
TNP 31	rs1393776	A	C
TNP 32	rs12212601	C	T
TNP 33	rs6463159	C	T
TNP 34	rs872218	C	T
TNP 35	rs1005685	C	T
TNP 36	rs10101055	A	G
TNP 37	rs11777669	A	G

TNP 38	rs41470645	C	T
TNP 39	rs7858815	A	G
TNP 40	rs1324186	C	T
TNP 41	rs4879785	A	G
TNP 42	rs17082506	A	C
TNP 43	rs11256318	C	G
TNP 44	rs1891565	A	G
TNP 45	rs10884686	C	T
TNP 46	rs7931749	A	C
TNP 47	rs4939052	A	G
TNP 48	rs7107562	C	T
TNP 49	rs10891331	C	G
TNP 50	rs1941850	C	T
TNP 51	rs1941846	C	T
TNP 52	rs1941861	C	T
TNP 53	rs11215223	A	G
TNP 54	rs1797710	A	G
TNP 55	rs17289784	C	T
TNP 56	rs16954516	A	G
TNP 57	rs1295782	C	T
TNP 58	rs2597093	C	T
TNP 59	rs1242118	C	G
TNP 60	rs4923876	A	G
TNP 61	rs2507373	C	T
TNP 62	rs4792074	A	C
TNP 63	rs4283324	A	G
TNP 64	rs878250	C	G
TNP 65	rs16998727	A	G
TNP 66	rs6034740	C	T
TNP 67	rs6123547	G	T
TNP 68	rs996632	A	G
TNP 69	rs13049440	C	T
TNP 70	rs2833551	A	T
TNP 71	rs5915502	C	T
TNP 72	rs2495678	A	G
TNP 73	rs16829831	C	G
TNP 74	rs4769957	A	G
TNP 75	rs1863467	A	G
TNP 76	rs6983267	G	T
TNP 77	rs1035209	C	T
TNP 78	rs3217810	C	T

TNP 79	rs6691170	G	T
TNP 80	rs11169552	C	T
TNP 81	rs7136702	C	T
TNP 82	rs4925386	T	C

EK 4. Genotip analizi sonrasında elde edilen verilerin Ki kare testi sonrasında istatistiksel analiz sonuçları büyük veri içerdiği için ayrıca verilmiştir.

EK 5. Aile Temelli GWAS ile belirlenen 75 TNP içinden anlamlı bulunan 5 TNP ve Avrupa popülasyonunda ilişkilendirilmiş 7 TNP içinden anlamlı buunan 1 TNP HaploReg v4.1 aracı sonuç verisi ayrıca verilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Cancer IAfRo. *World cancer factsheet.* İngiltere2014.

2. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology.* 2011;6:479-507.

3. Hardy J, Singleton A. Genomewide association studies and human disease. *The New England journal of medicine.* 2009;360(17):1759-1768.

4. Leland Hartwell LH, Michael Goldberg, Ann E. Reynolds , Lee Silver. *Genetics: From Genes to Genomes (Hartwell, Genetics).* 2004.

5. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England journal of medicine.* 2000;343(2):78-85.

6. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine.* 2000;21(6):167-223.

7. Oláh E. Basic Concepts of Cancer:Genomic Determination. The Journal of The *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2005; 16(2).

8. Martinez JD, Parker MT, Fultz KE, Ignatenko NA, Gerner EW, eds. *Molecular Biology of Cancer.* 2003. Chapter One.

9. Kleinsmith LJ. *Principles of Cancer Biology.* University of Michigan: Benjamin Cummings; 2004.

10. Weinberg RA. *The Biology of Cancer.* 2 ed2014.

11. Garcea G, Sharma RA, Dennison A, Steward WP, Gescher A, Berry DP. Molecular biomarkers of colorectal carcinogenesis and their role in surveillance and early intervention. *Eur J Cancer.* 2003;39(8):1041-1052.

12. Naccarati A, Pardini B, Hemminki K, Vodicka P. Sporadic colorectal cancer and individual susceptibility: a review of the association studies investigating the role of DNA repair genetic polymorphisms. *Mutat Res.* 2007;635(2-3):118-145.

13. Mutch MG. Molecular profiling and risk stratification of adenocarcinoma of the colon. *Journal of surgical oncology.* 2007;96(8):693-703.

14. Ashktorab H, Schaffer AA, Daremipouran M, Smoot DT, Lee E, Brim H. Distinct genetic alterations in colorectal cancer. *PloS one.* 2010;5(1):e8879.

15. Ashktorab H, Schaffer AA, Daremipouran M, Smoot DT, Lee E, Brim H. Distinct genetic alterations in colorectal cancer. *PLoS One*.5(1):e8879.

16. Lynch HT, Boland CR, Gong G, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(4):390-402.

17. Lynch HT, Shaw TG. Practical genetics of colorectal cancer. *Chin Clin Oncol.* 2013;2(2):12.

18. G. HN. 2010; http://www.slideshare.net/patrick89/colorectal-cancer-screening-update.

19. Clinic M. Colon Cancer. 2016; http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/home/ovc-20188216.

20. Li FY, Lai MD. Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009;10(3):219-229.

21. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer metastasis reviews.* 2004;23(1-2):11-27.

22. Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology.* 2002;123(3):862-876.

23. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *The British journal of surgery.* 2002;89(7):845-860.

24. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine.* 1988;319(9):525-532.

25. Bevan S, Woodford-Richens K, Rozen P, et al. Screening SMAD1, SMAD2, SMAD3, and SMAD5 for germline mutations in juvenile polyposis syndrome. *Gut.* 1999;45(3):406-408.

26. Mills AA. p53: link to the past, bridge to the future. *Genes & development.* 2005;19(18):2091-2099.

27. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature reviews Cancer.* 2009;9(7):489-499.

28. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2005;23(3):609-618.

29. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut.* 2009;58(1):90-96.

30. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature genetics.* 2006;38(7):787-793.

31. Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, et al. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer research.* 2008;68(20):8541-8546.

32. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology.* 2005;129(3):837-845.

33. Cheng YW, Pincas H, Bacolod MD, et al. CpG island methylator phenotype associates with low-degree chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2008;14(19):6005-6013.

34. Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature.* 2004;432(7015):338-341.

35. Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, et al. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation.* 2001;103(3):357-362.

36. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology.* 2001;121(3):599-611.

37. Smith G, Carey FA, Beattie J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99(14):9433-9438.

38. Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World journal of gastroenterology.* 2003;9(12):2642-2649.

39. Shen L, Toyota M, Kondo Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(47):18654-18659.

40. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001;411(6835):366-374.

41. Bresalier RS FM, Friedman LS, Sleisenger MH, . Malignant neoplasms of the large intestine. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management* 2002:2215–2261.

42. Issa JP. Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2008;14(19):5939-5940.

43. Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut.* 2004;53(8):1137-1144.

44. Young J, Jenkins M, Parry S, et al. Serrated pathway colorectal cancer in the population: genetic consideration. *Gut.* 2007;56(10):1453-1459.

45. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007;50(1):113-130.

46. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists.* 2010;31(2):31-38.

47. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer research.* 1998;58(22):5248-5257.

48. Iino H, Jass JR, Simms LA, et al. DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? *Journal of clinical pathology.* 1999;52(1):5-9.

49. Muller A, Beckmann C, Westphal G, et al. Prevalence of the mismatch-repair-deficient phenotype in colonic adenomas arising in HNPCC patients: results of a 5-year follow-up study. *International journal of colorectal disease.* 2006;21(7):632-641.

50. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature medicine.* 2015;21(11):1350-1356.

51. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nature reviews Cancer.* 2017;17(2):79-92.

52. Burt RW, Bishop DT, Lynch HT, Rozen P, Winawer SJ. Risk and surveillance of individuals with heritable factors for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bulletin of the World Health Organization.* 1990;68(5):655-665.

53. Robbins SR. *Temel Patoloji.* ABD2003.

54. Petersen GM, Brensinger JD, Johnson KA, Giardiello FM. Genetic testing and counseling for hereditary forms of colorectal cancer. *Cancer.* 1999;86(11 Suppl):2540-2550.

55. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature reviews Cancer.* 2004;4(10):769-780.

56. Filipe B, Baltazar C, Albuquerque C, et al. APC or MUTYH mutations account for the majority of clinically well-characterized families with FAP and AFAP phenotype and patients with more than 30 adenomas. *Clinical genetics.* 2009;76(3):242-255.

57. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *The American journal of gastroenterology.* 2006;101(2):385-398.

58. Byfield SA, Syngal S. Clinical guidelines versus universal molecular testing: are we ready to choose an optimal strategy for Lynch syndrome identification? *The American journal of gastroenterology.* 2008;103(11):2837-2840.

59. Toland AE. Germline Genetics in Colorectal Cancer Susceptibility and Prognosis. In: Ettarh R, ed. *Colorectal Cancer Biology - From Genes to Tumor*: InTech; 2012:446.

60. AS W. Heredity with reference to carcinoma. *Arch Intern Med.* 1913;12:546–555.

61. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Archives of internal medicine.* 1966;117(2):206-212.

62. Messerini L, Mori S, Zampi G. Pathologic features of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Tumori.* 1996;82(2):114-116.

63. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology.* 2007;133(1):48-56.

64. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *The New England journal of medicine.* 2003;348(10):919-932.

65. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes & development.* 2007;21(20):2525-2538.

66. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993;260(5109):816-819.

67. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993;363(6429):558-561.

68. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nature reviews Clinical oncology.* 2010;7(3):153-162.

69. Lindor NM. Familial colorectal cancer type X: the other half of hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome. *Surgical oncology clinics of North America.* 2009;18(4):637-645.

70. Dove-Edwin I, de Jong AE, Adams J, et al. Prospective results of surveillance colonoscopy in dominant familial colorectal cancer with and without Lynch syndrome. *Gastroenterology.* 2006;130(7):1995-2000.

71. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2015;149(5):1177-1190 e1173.

72. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013;339(6127):1546-1558.

73. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *The Journal of molecular diagnostics : JMD.* 2008;10(1):13-27.

74. Genomes Project C, Abecasis GR, Auton A, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature.* 2012;491(7422):56-65.

75. NIH-Genomic Researchs. 2016; https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/snp.

76. Miller RD, Kwok PY. The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine. *Human molecular genetics.* 2001;10(20):2195-2198.

77. www.ornl.gov.

78. Single Nucleotit Polymorphisms. 2015; https://en.wikipedia.org/wiki/Single-nucleotide_polymorphism.

79. Gupta PK, Rustgi S, Mir RR. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity.* 2008;101(1):5-18.

80. Ott J, Kamatani Y, Lathrop M. Family-based designs for genome-wide association studies. *Nature reviews Genetics.* 2011;12(7):465-474.

81. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science.* 1996;273(5281):1516-1517.

82. Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science.* 2002;296(5568):695-698.

83. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nature genetics.* 2008;40(11):1319-1323.

84. Yende S, Kammerer CM, Angus DC. Genetics and proteomics: deciphering gene association studies in critical illness. *Crit Care.* 2006;10(4):227.

85. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *The Journal of clinical investigation.* 2008;118(5):1590-1605.

86. The International HapMap Project. *Nature.* 2003;426(6968):789-796.

87. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005;308(5720):385-389.

88. GWAS. 2016; https://www.ebi.ac.uk/gwas/docs/about.

89. Moore JH, Asselbergs FW, Williams SM. Bioinformatics challenges for genome-wide association studies. *Bioinformatics.* 2010;26(4):445-455.

90. Cichon S, Craddock N, Daly M, et al. Genomewide association studies: history, rationale, and prospects for psychiatric disorders. *Am J Psychiatry.* 2009;166(5):540-556.

91. Webb EL, Houlston RS. Association studies using familial cases: an efficient strategy for identifying low-penetrance disease alleles. *Methods Mol Biol.* 2007;376:151-159.

92. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet.* 2008;9(5):356-369.

93. Toland AE. Germline Genetics in Colorectal Cancer Susceptibility and Prognosis. 2012; http://www.intechopen.com/download/pdf/28088.

94. Le Marchand L. Genome-wide association studies and colorectal cancer. *Surgical oncology clinics of North America.* 2009;18(4):663-668.

95. Tomlinson IP, Dunlop M, Campbell H, et al. COGENT (COlorectal cancer GENeTics): an international consortium to study the role of polymorphic variation on the risk of colorectal cancer. *Br J Cancer.*102(2):447-454.

96. Galvan A, Ioannidis JP, Dragani TA. Beyond genome-wide association studies: genetic heterogeneity and individual predisposition to cancer. *Trends in genetics : TIG.* 2010;26(3):132-141.

97. Ilk O, Rajabli F, Dungul DC, Ozdag H, Ilk HG. A novel approach for small sample size family-based association studies: sequential tests. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(8):915-920.

98. Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet.* 2000;67(1):170-181.

99. Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet.* 1999;65(1):220-228.

100. Detlev Ganten KR, Walter Birchmeier, Jörg T. Epplen, Klaus Genser, Manfred Gossen, Birgit Kersten, Hans Lehrach, Hartmut Oschkinat, Patrizia Ruiz, Peter Schmieder, Erich Wanker, Christiane Nolte. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine.* 2006.

101. Price AL, Zaitlen NA, Reich D, Patterson N. New approaches to population stratification in genome-wide association studies. *Nature reviews Genetics.* 2010;11(7):459-463.

102. Jakobsson M, Edge MD, Rosenberg NA. The Relationship Between FST and the Frequency of the Most Frequent Allele. 2013;193:515-528.

103. Ding L, Wiener H, Abebe T, et al. Comparison of measures of marker informativeness for ancestry and admixture mapping. 2011;12((622)).

104. Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution.* 1984;38((6)):1358-1370.

105. Holsinger KE, Weir BS. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. 2009.

106. Fst Index. https://en.wikipedia.org/wiki/Fixation_index.

107. 3_Genetic Distance Values – Fstanswers.

108. Bahassi el M, Stambrook PJ. Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis.* 2014;29(5):303-310.

109. Illumina. Illumina sequence information manuel. 770-2012-0082016.

110. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005;437(7057):376-380.

111. GS-FLX Manuel. 2009; http://454.com/downloads/my454/documentation/gs-flx/method-manuals/GS-FLX-Titanium-emPCR-Method-Manual-(Apr2009).

112. Duran Üstek NA, Sema Sırma, Aris Çakiris. Yeni Nesil DNA Dizileme New Generation DNA Sequencing. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi.* 2011;1(1):1.

113. Provine WB. Ernst Mayr: Genetics and speciation. *Genetics.* 2004;167(3):1041-1046.

114. Templeton AR. The theory of speciation via the founder principle. *Genetics.* 1980;94(4):1011-1038.

115. Özge Cumaogulları HÖ. *Türk Popülasyonunda Aile Temelli Genom Boyu Asosiyasyon Çalışması Sonucunda Sporadik Kolorektal Kanser ile İlişkilendirilmiş 75 TNP'nin Geniş Bir Popülasyon Çalışması ile Doğrulanması.* Ankara Universitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü; 2016 2016.

116. Nora Ellen Groce JWMW. *Everyone Here Spoke Sign Language: Hereditary Deafness on Martha's Vineyard* 1985.

117. Zaidi SK, Young DW, Montecino M, et al. Architectural epigenetics: mitotic retention of mammalian transcriptional regulatory information. *Molecular and cellular biology.* 2010;30(20):4758-4766.

118. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-233.

119. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2009;10(2):126-139.

120. Karp X, Ambros V. Developmental biology. Encountering microRNAs in cell fate signaling. *Science.* 2005;310(5752):1288-1289.

121. Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society.* 2009;84(1):55-71.

122. Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs as a potential magic bullet in cancer. *Future Oncol.* 2006;2(1):73-82.

123. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 2005;435(7043):828-833.

124. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular cancer research : MCR.* 2003;1(12):882-891.

125. Evangelisti C, Florian MC, Massimi I, et al. MiR-128 up-regulation inhibits Reelin and DCX expression and reduces neuroblastoma cell motility and invasiveness. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2009;23(12):4276-4287.

126. Zhang Y, Chao T, Li R, et al. MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(1):43-51.

127. Khan AP, Poisson LM, Bhat VB, et al. Quantitative proteomic profiling of prostate cancer reveals a role for miR-128 in prostate cancer. *Molecular & cellular proteomics : MCP.* 2010;9(2):298-312.

128. Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E, et al. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2008;19(6):1053-1059.

129. Kotani A, Ha D, Schotte D, den Boer ML, Armstrong SA, Lodish HF. A novel mutation in the miR-128b gene reduces miRNA processing and leads to glucocorticoid resistance of MLL-AF4 acute lymphocytic leukemia cells. *Cell Cycle.* 2010;9(6):1037-1042.

130. Adlakha YK, Saini N. miR-128 exerts pro-apoptotic effect in a p53 transcription-dependent and -independent manner via PUMA-Bak axis. *Cell death & disease.* 2013;4:e542.

131. Monteys AM, Spengler RM, Wan J, et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA.* 2010;16(3):495-505.

132. Donzelli S, Fontemaggi G, Fazi F, et al. MicroRNA-128-2 targets the transcriptional repressor E2F5 enhancing mutant p53 gain of function. *Cell death and differentiation.* 2012;19(6):1038-1048.

133. Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(45):17719-17724.

134. Rakhilin SV, Olson PA, Nishi A, et al. A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling. *Science.* 2004;306(5696):698-701.

135. Harrison PM, Hegyi H, Balasubramanian S, et al. Molecular fossils in the human genome: identification and analysis of the pseudogenes in chromosomes 21 and 22. *Genome research.* 2002;12(2):272-280.

136. Kalyana-Sundaram S, Kumar-Sinha C, Shankar S, et al. Expressed pseudogenes in the transcriptional landscape of human cancers. *Cell.* 2012;149(7):1622-1634.

137. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011;72(2):245-256.

138. Renton AE, Majounie E, Waite A, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron.* 2011;72(2):257-268.

139. Knuppel S, Rohde K, Meidtner K, et al. Evaluation of 41 candidate gene variants for obesity in the EPIC-Potsdam cohort by multi-locus stepwise regression. *PloS one.* 2013;8(7):e68941.

140. Knueppel KRaS, ed *HapEstXXR: Multi-locus stepwise regression (MSR). R package version 0.1-7.* 2014.

141. History AMoN. Genetic Distance Values – Fst answers. http://www.amnh.org/explore/curriculum-collections/ecology-disrupted/bighorn-sheep/lesson-plans/investigating-and-representing-genetic-data/extension-genetic-distance-values.

142. Broadinstitute. Picard. 2016; http://picard.sourceforge.net.

143. Broadinstitute. GATK. 2016; https://www.broadinstitute.org/gatk/.

144. Ensembl. 2016; http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index.

145. David Delano ME, Luana Galver, Carlsten Rosenow. Array Differences in Genomic Coverage and Data Quality Impact GWAS Succsess. *İllimuna Inc.* 2010.

146. Kim KK, Won HH, Cho SS, et al. Comparison of identical single nucleotide polymorphisms genotyped by the GeneChip Targeted Genotyping 25K, Affymetrix 500K and Illumina 550K platforms. *Genomics.* 2009;94(2):89-93.

147. Jiang L, Willner D, Danoy P, Xu H, Brown MA. Comparison of the performance of two commercial genome-wide association study genotyping platforms in Han Chinese samples. *G3 (Bethesda).* 2013;3(1):23-29.

148. Kantor ED, Hutter CM, Minnier J, et al. Gene-environment interaction involving recently identified colorectal cancer susceptibility Loci. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(9):1824-1833.

149. Carvajal-Carmona LG, Zauber AG, Jones AM, et al. Much of the genetic risk of colorectal cancer is likely to be mediated through susceptibility to adenomas. *Gastroenterology.* 2013;144(1):53-55.

150. Spain SL, Carvajal-Carmona LG, Howarth KM, et al. Refinement of the associations between risk of colorectal cancer and polymorphisms on chromosomes 1q41 and 12q13.13. *Human molecular genetics.* 2012;21(4):934-946.

151. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D877-881.

152. NCBI. GenBank Database, dbSNP-NCBI variation viewer. 2017; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP.

153. Karolchik D HA, Furey TS, Roskin KM, Sugnet CW, Haussler D, Kent WJ. . The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Res* 2004(Jan):1.

154. Popovic D, Akutsu M, Novak I, Harper JW, Behrends C, Dikic I. Rab GTPase-activating proteins in autophagy: regulation of endocytic and autophagy pathways by direct binding to human ATG8 modifiers. *Molecular and cellular biology.* 2012;32(9):1733-1744.

155. Ishibashi K, Kanno E, Itoh T, Fukuda M. Identification and characterization of a novel Tre-2/Bub2/Cdc16 (TBC) protein that possesses Rab3A-GAP activity. *Genes Cells.* 2009;14(1):41-52.

156. Fardilha M, Esteves SL, Korrodi-Gregorio L, et al. Identification of the human testis protein phosphatase 1 interactome. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(10):1403-1415.

157. Sobradillo D, Hernandez-Morales M, Ubierna D, Moyer MP, Nunez L, Villalobos C. A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca2+ remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry.* 2014;289(42):28765-28782.

158. Stanisz H, Saul S, Muller CS, et al. Inverse regulation of melanoma growth and migration by Orai1/STIM2-dependent calcium entry. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27(3):442-453.

159. Moccia F, Zuccolo E, Poletto V, et al. Targeting Stim and Orai Proteins as an Alternative Approach in Anticancer Therapy. *Curr Med Chem.* 2016;23(30):3450-3480.

160. Berna-Erro A, Jardin I, Salido GM, Rosado JA. Role of STIM2 in cell function and physiopathology. *J Physiol.* 2017.

161. Villalobos C, Sobradillo D, Hernandez-Morales M, Nunez L. Calcium remodeling in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2017.

162. Lopez E, Salido GM, Rosado JA, Berna-Erro A. Unraveling STIM2 function. *J Physiol Biochem.* 2012;68(4):619-633.

163. Wang X, Wang Y, Zhou Y, et al. Distinct Orai-coupling domains in STIM1 and STIM2 define the Orai-activating site. *Nat Commun.* 2014;5:3183.

164. Parvez S, Beck A, Peinelt C, et al. STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2008;22(3):752-761.

165. Miederer AM, Alansary D, Schwar G, et al. A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry. *Nat Commun.* 2015;6:6899.

166. Adkins CE, Morris SA, De Smedt H, Sienaert I, Torok K, Taylor CW. Ca2+-calmodulin inhibits Ca2+ release mediated by type-1, -2 and -3 inositol trisphosphate receptors. *Biochem J.* 2000;345 Pt 2:357-363.

167. Rana A, Yen M, Sadaghiani AM, et al. Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *The Journal of cell biology.* 2015;209(5):653-669.

168. Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2012;13(9):549-565.

169. Aytes A, Mollevi DG, Martinez-Iniesta M, et al. Stromal interaction molecule 2 (STIM2) is frequently overexpressed in colorectal tumors and confers a tumor cell growth suppressor phenotype. *Mol Carcinog.* 2012;51(9):746-753.

170. Vaeth M, Zee I, Concepcion AR, et al. Ca2+ Signaling but Not Store-Operated Ca2+ Entry Is Required for the Function of Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol.* 2015;195(3):1202-1217.

171. Gueguinou M, Harnois T, Crottes D, et al. SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmline. *Oncotarget.* 2016;7(24):36168-36184.

172. Zhang Z, Liu X, Feng B, et al. STIM1, a direct target of microRNA-185, promotes tumor metastasis and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Oncogene.* 2015;34(37):4808-4820.

173. Hoth M. CRAC channels, calcium, and cancer in light of the driver and passenger concept. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(6 Pt B):1408-1417.

174. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Ahn BJ, Fang S, Parsa AT. The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration. *Inflamm Res.* 2010;59(11):897-905.

175. Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. Innate immune recognition of cancer. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:445-474.

176. Charles A Janeway J, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik. *Immunobiology.* 5th ed. New York: Garland Science; 2001.

177. Serna M, Giles JL, Morgan BP, Bubeck D. Structural basis of complement membrane attack complex formation. *Nat Commun.* 2016;7:10587.

178. Lovelace LL, Cooper CL, Sodetz JM, Lebioda L. Structure of human C8 protein provides mechanistic insight into membrane pore formation by complement. *The Journal of biological chemistry.* 2011;286(20):17585-17592.

179. Weiland MH, Qian Y, Sodetz JM. Membrane pore formation by human complement: functional importance of the transmembrane beta-hairpin (TMH) segments of C8alpha and C9. *Molecular immunology.* 2014;57(2):310-316.

180. Parker CL, Sodetz JM. Role of the human C8 subunits in complement-mediated bacterial killing: evidence that C8 gamma is not essential. *Molecular immunology.* 2002;39(7-8):453-458.

181. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2015;6:262.

182. Fritz H. Kayser KaB, Johannes Eckert, Rolf M. Zinkernagel. *Tıbbi Mikrobiyoloji.* Nobel Tıp Kitabevi; 2002.

183. Chung KY, Gore I, Fong L, et al. Phase II study of the anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody, tremelimumab, in patients with refractory metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2010;28(21):3485-3490.

184. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2010;28(19):3167-3175.

185. Lichtenfeld JL, Wiernik PH, Mardiney MR, Jr., Zarco RM. Abnormalities of complement and its components in patients with acute leukemia, Hodgkin's disease, and sarcoma. *Cancer research.* 1976;36(10):3678-3680.

186. Nasim FU, Ejaz S, Ashraf M, et al. Potential biomarkers in the sera of breast cancer patients from bahawalpur, pakistan. *Biomark Cancer.* 2012;4:19-34.

187. Shang Y, Chai N, Gu Y, et al. Systematic immunohistochemical analysis of the expression of CD46, CD55, and CD59 in colon cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(7):910-919.

188. Sivasankar B, Longhi MP, Gallagher KM, et al. CD59 blockade enhances antigen-specific CD4+ T cell responses in humans: a new target for cancer immunotherapy? *J Immunol.* 2009;182(9):5203-5207.

189. Watson NF, Durrant LG, Madjd Z, Ellis IO, Scholefield JH, Spendlove I. Expression of the membrane complement regulatory protein CD59 (protectin) is associated with reduced survival in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55(8):973-980.

190. Badawy AA. Tryptophan metabolism in alcoholism. *Nutr Res Rev.* 2002;15(1):123-152.

191. Routy JP, Routy B, Graziani GM, Mehraj V. The Kynurenine Pathway Is a Double-Edged Sword in Immune-Privileged Sites and in Cancer: Implications for Immunotherapy. *Int J Tryptophan Res.* 2016;9:67-77.

192. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* 1998;281(5380):1191-1193.

193. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* 2011;478(7368):197-203.

194. Santhanam S, Alvarado DM, Ciorba MA. Therapeutic targeting of inflammation and tryptophan metabolism in colon and gastrointestinal cancer. *Transl Res.* 2016;167(1):67-79.

195. Munn DH, Mellor AL. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends in immunology.* 2016;37(3):193-207.

196. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol.* 2010;185(6):3190-3198.

197. Platten M, von Knebel Doeberitz N, Oezen I, Wick W, Ochs K. Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors. *Front Immunol.* 2014;5:673.

198. Heng B, Lim CK, Lovejoy DB, Bessede A, Gluch L, Guillemin GJ. Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology. *Oncotarget.* 2016;7(6):6506-6520.

199. Smith JR, Jamie JF, Guillemin GJ. Kynurenine-3-monooxygenase: a review of structure, mechanism, and inhibitors. *Drug Discov Today.* 2016;21(2):315-324.

200. Jin H, Zhang Y, You H, et al. Prognostic significance of kynurenine 3-monooxygenase and effects on proliferation, migration, and invasion of human hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2015;5:10466.

201. Terness P, Bauer TM, Rose L, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med.* 2002;196(4):447-457.

202. Adams S, Teo C, McDonald KL, et al. Involvement of the kynurenine pathway in human glioma pathophysiology. *PloS one.* 2014;9(11):e112945.

203. Mosca E, Alfieri R, Merelli I, Viti F, Calabria A, Milanesi L. A multilevel data integration resource for breast cancer study. *BMC Syst Biol.* 2010;4:76.

204. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling.* 2013;6(269):pl1.

205. Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression alters immune response in colon tumor microenvironment in mice. *Cancer Sci.* 2015;106(8):1008-1015.

206. Ferdinande L, Decaestecker C, Verset L, et al. Clinicopathological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression in colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2012;106(1):141-147.

207. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2006;12(4):1144-1151.

208. Gao YF, Peng RQ, Li J, et al. The paradoxical patterns of expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in colon cancer. *J Transl Med.* 2009;7:71.

209. Gurtner GJ, Newberry RD, Schloemann SR, McDonald KG, Stenson WF. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology.* 2003;125(6):1762-1773.

210. Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, et al. IDO1 plays an immunosuppressive role in 2,4,6-trinitrobenzene sulfate-induced colitis in mice. *J Immunol.* 2013;191(6):3057-3064.

211. Ciorba MA, Bettonville EE, McDonald KG, et al. Induction of IDO-1 by immunostimulatory DNA limits severity of experimental colitis. *J Immunol.* 2010;184(7):3907-3916.

212. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut.* 2010;59(5):595-604.

213. Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity.* 2013;39(2):372-385.

214. Alam NA, Gorman P, Jaeger EE, et al. Germline deletions of EXO1 do not cause colorectal tumors and lesions which are null for EXO1 do not have microsatellite instability. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;147(2):121-127.

215. Niu N, Schaid DJ, Abo RP, et al. Genetic association with overall survival of taxane-treated lung cancer patients - a genome-wide association study in human lymphoblastoid cell lines followed by a clinical association study. *BMC Cancer.* 2012;12:422.

216. Jiao J, Hong S, Zhang J, et al. Opsin3 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to 5-fluorouracil treatment by regulating the apoptotic pathway. *Cancer Lett.* 2012;320(1):96-103.

217. Li M, Bolduc AR, Hoda MN, et al. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway controls complement-dependent enhancement of chemo-radiation therapy against murine glioblastoma. *J Immunother Cancer.* 2014;2:21.

218. Pithukpakorn M, Toro JR. Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., eds. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.

219. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nature genetics.* 2002;30(4):406-410.

220. Alam NA, Barclay E, Rowan AJ, et al. Clinical features of multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis: an underdiagnosed tumor syndrome. *Arch Dermatol.* 2005;141(2):199-206.

221. Ylisaukko-oja SK, Cybulski C, Lehtonen R, et al. Germline fumarate hydratase mutations in patients with ovarian mucinous cystadenoma. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(7):880-883.

222. Aissani B, Zhang K, Mensenkamp AR, Menko FH, Wiener HW. Fine mapping of the uterine leiomyoma locus on 1q43 close to a lncRNA in the RGS7-FH interval. *Endocr Relat Cancer.* 2015;22(4):633-643.

223. Llamas-Velasco M, Requena L, Adam J, Frizzell N, Hartmann A, Mentzel T. Loss of Fumarate Hydratase and Aberrant Protein Succination Detected With S-(2-Succino)-Cysteine Staining to Identify Patients With Multiple Cutaneous and Uterine Leiomyomatosis and Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer Syndrome. *Am J Dermatopathol.* 2016;38(12):887-891.

224. Sudarshan S, Sourbier C, Kong HS, et al. Fumarate hydratase deficiency in renal cancer induces glycolytic addiction and hypoxia-inducible transcription factor 1alpha stabilization by glucose-dependent generation of reactive oxygen species. *Molecular and cellular biology.* 2009;29(15):4080-4090.

225. Raimundo N, Vanharanta S, Aaltonen LA, Hovatta I, Suomalainen A. Downregulation of SRF-FOS-JUNB pathway in fumarate hydratase deficiency and in uterine leiomyomas. *Oncogene.* 2009;28(9):1261-1273.

226. Yang Y, Valera VA, Padilla-Nash HM, et al. UOK 262 cell line, fumarate hydratase deficient (FH-/FH-) hereditary leiomyomatosis renal cell carcinoma: in vitro and in vivo model of an aberrant energy metabolic pathway in human cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;196(1):45-55.

227. Sudarshan S, Shanmugasundaram K, Naylor SL, et al. Reduced expression of fumarate hydratase in clear cell renal cancer mediates HIF-2alpha accumulation and promotes migration and invasion. *PloS one.* 2011;6(6):e21037.

228. Ha YS, Chihara Y, Yoon HY, et al. Downregulation of fumarate hydratase is related to tumorigenesis in sporadic renal cell cancer. *Urol Int.* 2013;90(2):233-239.

229. Dong G, He X, Chen Y, et al. Genetic variations in genes of metabolic enzymes predict postoperational prognosis of patients with colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2015;14:171.

230. Kurten RC, Cadena DL, Gill GN. Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science.* 1996;272(5264):1008-1010.

231. Cullen PJ. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2008;9(7):574-582.

232. Worby CA, Dixon JE. Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2002;3(12):919-931.

233. Tan X, Thapa N, Choi S, Anderson RA. Emerging roles of PtdIns(4,5)P2--beyond the plasma membrane. *J Cell Sci.* 2015;128(22):4047-4056.

234. Chi RJ, Harrison MS, Burd CG. Biogenesis of endosome-derived transport carriers. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2015;72(18):3441-3455.

235. Bendris N, Schmid SL. Endocytosis, Metastasis and Beyond: Multiple Facets of SNX9. *Trends Cell Biol.* 2017;27(3):189-200.

236. Schobel S, Neumann S, Hertweck M, et al. A novel sorting nexin modulates endocytic trafficking and alpha-secretase cleavage of the amyloid precursor protein. *The Journal of biological chemistry.* 2008;283(21):14257-14268.

237. Haberg K, Lundmark R, Carlsson SR. SNX18 is an SNX9 paralog that acts as a membrane tubulator in AP-1-positive endosomal trafficking. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 9):1495-1505.

238. Park J, Kim Y, Lee S, et al. SNX18 shares a redundant role with SNX9 and modulates endocytic trafficking at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 10):1742-1750.

239. Ma MP, Chircop M. SNX9, SNX18 and SNX33 are required for progression through and completion of mitosis. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 18):4372-4382.

240. Li D, Mangan A, Cicchini L, Margolis B, Prekeris R. FIP5 phosphorylation during mitosis regulates apical trafficking and lumenogenesis. *EMBO Rep.* 2014;15(4):428-437.

241. Willenborg C, Jing J, Wu C, et al. Interaction between FIP5 and SNX18 regulates epithelial lumen formation. *The Journal of cell biology.* 2011;195(1):71-86.

242. Wang Q, Kaan HY, Hooda RN, Goh SL, Sondermann H. Structure and plasticity of Endophilin and Sorting Nexin 9. *Structure.* 2008;16(10):1574-1587.

243. Townsend TA, Wrana JL, Davis GE, Barnett JV. Transforming growth factor-beta-stimulated endocardial cell transformation is dependent on Par6c regulation of RhoA. *The Journal of biological chemistry.* 2008;283(20):13834-13841.

244. Knaevelsrud H, Carlsson SR, Simonsen A. SNX18 tubulates recycling endosomes for autophagosome biogenesis. *Autophagy.* 2013;9(10):1639-1641.

245. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2013;14(12):759-774.

246. Knaevelsrud H, Soreng K, Raiborg C, et al. Membrane remodeling by the PX-BAR protein SNX18 promotes autophagosome formation. *The Journal of cell biology.* 2013;202(2):331-349.

247. White E. The role for autophagy in cancer. *The Journal of clinical investigation.* 2015;125(1):42-46.

248. Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, et al. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science.* 2004;306(5698):1037-1040.

249. Bendris N, Williams KC, Reis CR, et al. SNX9 promotes metastasis by enhancing cancer cell invasion via differential regulation of RhoGTPases. *Mol Biol Cell.* 2016.

250. Asthana A, Raman B, Ramakrishna T, Rao Ch M. Structural aspects and chaperone activity of human HspB3: role of the "C-terminal extension". *Cell Biochem Biophys.* 2012;64(1):61-72.

251. Drew AP, Blair IP, Nicholson GA. Molecular genetics and mechanisms of disease in distal hereditary motor neuropathies: insights directing future genetic studies. *Current molecular medicine.* 2011;11(8):650-665.

252. Lupo V, Aguado C, Knecht E, Espinos C. Chaperonopathies: Spotlight on Hereditary Motor Neuropathies. *Front Mol Biosci.* 2016;3:81.

253. Nefedova VV, Muranova LK, Sudnitsyna MV, Ryzhavskaya AS, Gusev NB. Small Heat Shock Proteins and Distal Hereditary Neuropathies. *Biochemistry (Mosc).* 2015;80(13):1734-1747.

254. Piccolella M, Crippa V, Cristofani R, et al. The small heat shock protein B8 (HSPB8) modulates proliferation and migration of breast cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8(6):10400-10415.

255. Dressing GE, Knutson TP, Schiewer MJ, et al. Progesterone receptor-cyclin D1 complexes induce cell cycle-dependent transcriptional programs in breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2014;28(4):442-457.

256. Sun X, Fontaine JM, Bartl I, Behnam B, Welsh MJ, Benndorf R. Induction of Hsp22 (HspB8) by estrogen and the metalloestrogen cadmium in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cell Stress Chaperones.* 2007;12(4):307-319.

257. Kwasnicka-Crawford DA, Carson AR, Scherer SW. IQCJ-SCHIP1, a novel fusion transcript encoding a calmodulin-binding IQ motif protein. *Biochemical and biophysical research communications.* 2006;350(4):890-899.

258. Martin PM, Carnaud M, Garcia del Cano G, et al. Schwannomin-interacting protein-1 isoform IQCJ-SCHIP-1 is a late component of nodes of Ranvier and axon initial segments. *J Neurosci.* 2008;28(24):6111-6117.

259. Papandreou MJ, Vacher H, Fache MP, et al. CK2-regulated schwannomin-interacting protein IQCJ-SCHIP-1 association with AnkG contributes to the maintenance of the axon initial segment. *J Neurochem.* 2015;134(3):527-537.

260. Goutebroze L, Brault E, Muchardt C, Camonis J, Thomas G. Cloning and characterization of SCHIP-1, a novel protein interacting specifically with spliced isoforms and naturally occurring mutant NF2 proteins. *Molecular and cellular biology.* 2000;20(5):1699-1712.

261. Gerendasy D. Homeostatic tuning of Ca2+ signal transduction by members of the calpacitin protein family. *J Neurosci Res.* 1999;58(1):107-119.

262. EMBL-EBI. Expression Atlas. http://www.ebi.ac.uk/gxa/gene.

263. Blast. Protein Blast. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

264. InterPro. EBI-InterPro. http://www.ebi.ac.uk/interpro.

265. UniProt. Protein Database.

266. Bahler M, Rhoads A. Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett.* 2002;513(1):107-113.

267. Martin PM, Cifuentes-Diaz C, Devaux J, et al. Schwannomin-interacting Protein 1 Isoform IQCJ-SCHIP1 Is a Multipartner Ankyrin- and Spectrin-binding Protein Involved in the Organization of Nodes of Ranvier. *The Journal of biological chemistry.* 2017;292(6):2441-2456.

268. Dobrowolska G, Lozeman FJ, Li D, Krebs EG. CK2, a protein kinase of the next millennium. *Mol Cell Biochem.* 1999;191(1-2):3-12.

269. Shaw RJ, McClatchey AI, Jacks T. Regulation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor protein, merlin, by adhesion and growth arrest stimuli. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(13):7757-7764.

270. Takeshima H, Izawa I, Lee PS, Safdar N, Levin VA, Saya H. Detection of cellular proteins that interact with the NF2 tumor suppressor gene product. *Oncogene.* 1994;9(8):2135-2144.

271. Plaza-Izurieta L, Castellanos-Rubio A, Irastorza I, et al. Revisiting genome wide association studies (GWAS) in coeliac disease: replication study in Spanish population and expression analysis of candidate genes. *Journal of medical genetics.* 2011;48(7):493-496.

272. Amundsen SS, Rundberg J, Adamovic S, et al. Four novel coeliac disease regions replicated in an association study of a Swedish-Norwegian family cohort. *Genes Immun.* 2010;11(1):79-86.

273. Perisic L, Rodriguez PQ, Hultenby K, et al. Schip1 is a novel podocyte foot process protein that mediates actin cytoskeleton rearrangements and forms a complex with Nherf2 and ezrin. *PloS one.* 2015;10(3):e0122067.

274. Auranen M, Varilo T, Alen R, et al. Evidence for allelic association on chromosome 3q25-27 in families with autism spectrum disorders originating from a subisolate of Finland. *Mol Psychiatry.* 2003;8(10):879-884.

275. Chung HL, Augustine GJ, Choi KW. Drosophila Schip1 Links Expanded and Tao-1 to Regulate Hippo Signaling. *Dev Cell.* 2016;36(5):511-524.

276. Minoo P, Zlobec I, Baker K, et al. Prognostic significance of mammalian sterile20-like kinase 1 in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2007;20(3):331-338.

277. Imajo M, Miyatake K, Iimura A, Miyamoto A, Nishida E. A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J.* 2012;31(5):1109-1122.

278. Zhou D, Zhang Y, Wu H, et al. Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(49):E1312-1320.

279. Heallen T, Zhang M, Wang J, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science.* 2011;332(6028):458-461.

280. Matallanas D, Romano D, Al-Mulla F, et al. Mutant K-Ras activation of the proapoptotic MST2 pathway is antagonized by wild-type K-Ras. *Mol Cell.* 2011;44(6):893-906.

281. Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nature reviews Cancer.* 2013;13(4):246-257.

282. Yamashita S, Yamamoto H, Mimori K, et al. MicroRNA-372 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Oncology.* 2012;82(4):205-212.

283. Moshe Oren YA. *The Hippo Signaling Pathway and Cancer.* Springer; 2013.

284. Berkman CC, Dinc H, Sekeryapan C, Togan I. Alu insertion polymorphisms and an assessment of the genetic contribution of Central Asia to Anatolia with respect to the Balkans. *Am J Phys Anthropol.* 2008;136(1):11-18.

285. Cinnioglu C, King R, Kivisild T, et al. Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia. *Human genetics.* 2004;114(2):127-148.

286. Calafell F, Underhill P, Tolun A, Angelicheva D, Kalaydjieva L. From Asia to Europe: mitochondrial DNA sequence variability in Bulgarians and Turks. *Annals of human genetics.* 1996;60(Pt 1):35-49.

287. Schonberg A, Theunert C, Li M, Stoneking M, Nasidze I. High-throughput sequencing of complete human mtDNA genomes from the Caucasus and West Asia: high diversity and demographic inferences. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(9):988-994.

288. Asicioglu F, Akyuz F, Cetinkaya U, Canli MA. Allele and haplotype frequencies of Y-short tandem repeat loci in Turkey. *Croat Med J.* 2003;44(3):310-314.

289. Hodoglugil U, Mahley RW. Turkish population structure and genetic ancestry reveal relatedness among Eurasian populations. *Annals of human genetics.* 2012;76(2):128-141.

290. Alkan C, Kavak P, Somel M, et al. Whole genome sequencing of Turkish genomes reveals functional private alleles and impact of genetic interactions with Europe, Asia and Africa. *BMC Genomics.* 2014;15:963.

291. Whiffin N, Hosking FJ, Farrington SM, et al. Identification of susceptibility loci for colorectal cancer in a genome-wide meta-analysis. *Human molecular genetics.* 2014;23(17):4729-4737.

292. Houlston RS, Cheadle J, Dobbins SE, et al. Meta-analysis of three genome-wide association studies identifies susceptibility loci for colorectal cancer at 1q41, 3q26.2, 12q13.13 and 20q13.33. *Nature genetics.* 2010;42(11):973-977.

293. Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nature genetics.* 2007;39(8):989-994.

294. Panic N, Larghi A, Amore R, et al. Single Nucleotide Polymorphisms within the 8Q24 Region are Not Associated with the Risk of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2016;25(3):311-315.

295. Zhang Y, Zeng X, Lu H, Ji H, Zhao E, Li Y. Association between 8q24 (rs13281615 and rs6983267) polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 117,355 subjects. *Oncotarget.* 2016;7(42):68002-68011.

296. Zhao X, Wei X, Zhao L, et al. The rs6983267 SNP and long non-coding RNA CARLo-5 are associated with endometrial carcinoma. *Environ Mol Mutagen.* 2016;57(7):508-515.

297. Knipe DW, Evans DM, Kemp JP, et al. Genetic variation in prostate-specific antigen-detected prostate cancer and the effect of control selection on genetic association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(7):1356-1365.

298. Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, et al. Genome-wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility. *Nature genetics.* 2009;41(10):1122-1126.

299. Yeager M, Orr N, Hayes RB, et al. Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nature genetics.* 2007;39(5):645-649.

300. Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nature genetics.* 2006;38(6):652-658.

301. Kim T, Cui R, Jeon YJ, et al. Long-range interaction and correlation between MYC enhancer and oncogenic long noncoding RNA CARLo-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(11):4173-4178.

302. Pomerantz MM, Ahmadiyeh N, Jia L, et al. The 8q24 cancer risk variant rs6983267 shows long-range interaction with MYC in colorectal cancer. *Nature genetics.* 2009;41(8):882-884.

303. Harismendy O, Frazer KA. Elucidating the role of 8q24 in colorectal cancer. *Nature genetics.* 2009;41(8):868-869.

304. Tuupanen S, Turunen M, Lehtonen R, et al. The common colorectal cancer predisposition SNP rs6983267 at chromosome 8q24 confers potential to enhanced Wnt signaling. *Nature genetics.* 2009;41(8):885-890.

305. Ahmadiyeh N, Pomerantz MM, Grisanzio C, et al. 8q24 prostate, breast, and colon cancer risk loci show tissue-specific long-range interaction with MYC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(21):9742-9746.

306. Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, et al. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nature genetics.* 2007;39(8):984-988.

307. Sur IK, Hallikas O, Vaharautio A, et al. Mice lacking a Myc enhancer that includes human SNP rs6983267 are resistant to intestinal tumors. *Science.* 2012;338(6112):1360-1363.

308. Deniz E, Erman B. Long noncoding RNA (lincRNA), a new paradigm in gene expression control. *Functional & integrative genomics.* 2016.

309. Xie X, Tang B, Xiao YF, et al. Long non-coding RNAs in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016;7(5):5226-5239.

310. LncRNAdb. http://www.lncrnadb.org/.

311. Ling H, Spizzo R, Atlasi Y, et al. CCAT2, a novel noncoding RNA mapping to 8q24, underlies metastatic progression and chromosomal instability in colon cancer. *Genome research.* 2013;23(9):1446-1461.

312. Takatsuno Y, Mimori K, Yamamoto K, et al. The rs6983267 SNP is associated with MYC transcription efficiency, which promotes progression and worsens prognosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(4):1395-1402.

313. Kaldma A, Klepinin A, Chekulayev V, et al. An in situ study of bioenergetic properties of human colorectal cancer: the regulation of mitochondrial respiration and distribution of flux control among the components of ATP synthasome. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;55:171-186.

314. Redis RS, Vela LE, Lu W, et al. Allele-Specific Reprogramming of Cancer Metabolism by the Long Non-coding RNA CCAT2. *Mol Cell.* 2016;61(4):520-534.

315. Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nature reviews Cancer.* 2016;16(10):619-634.

316. Brown KM, Gilmartin GM. A mechanism for the regulation of pre-mRNA 3' processing by human cleavage factor Im. *Mol Cell.* 2003;12(6):1467-1476.

317. Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature.* 2009;458(7239):762-765.

318. Jacque N, Ronchetti AM, Larrue C, et al. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood.* 2015;126(11):1346-1356.

319. Huang F, Zhang Q, Ma H, Lv Q, Zhang T. Expression of glutaminase is upregulated in colorectal cancer and of clinical significance. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(3):1093-1100.

320. van den Heuvel AP, Jing J, Wooster RF, Bachman KE. Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth. *Cancer Biol Ther.* 2012;13(12):1185-1194.

321. Hu L, Chen SH, Lv QL, et al. Clinical Significance of Long Non-Coding RNA CASC8 rs10505477 Polymorphism in Lung Cancer Susceptibility, Platinum-Based Chemotherapy Response, and Toxicity. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(6).

322. Yao K, Hua L, Wei L, Meng J, Hu J. Correlation Between CASC8, SMAD7 Polymorphisms and the Susceptibility to Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis Based on GWAS Results. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(46):e1884.

323. Ma G, Gu D, Lv C, et al. Genetic variant in 8q24 is associated with prognosis for gastric cancer in a Chinese population. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015;30(4):689-695.

324. Zhang Z, Zhou C, Chang Y, et al. Long non-coding RNA CASC11 interacts with hnRNP-K and activates the WNT/beta-catenin pathway to promote growth and metastasis in colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2016;376(1):62-73.

325. Pestell RG, Yu Z. Long and noncoding RNAs (lnc-RNAs) determine androgen receptor dependent gene expression in prostate cancer growth in vivo. *Asian J Androl.* 2014;16(2):268-269.

326. Yang L, Lin C, Jin C, et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs. *Nature.* 2013;500(7464):598-602.

327. Li L, Sun R, Liang Y, et al. Association between polymorphisms in long non-coding RNA PRNCR1 in 8q24 and risk of colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2013;32:104.

328. Breyer JP, Dorset DC, Clark TA, et al. An expressed retrogene of the master embryonic stem cell gene POU5F1 is associated with prostate cancer susceptibility. *Am J Hum Genet.* 2014;94(3):395-404.

329. Ciampa J, Yeager M, Amundadottir L, et al. Large-scale exploration of gene-gene interactions in prostate cancer using a multistage genome-wide association study. *Cancer research.* 2011;71(9):3287-3295.

330. Kastler S, Honold L, Luedeke M, et al. POU5F1P1, a putative cancer susceptibility gene, is overexpressed in prostatic carcinoma. *Prostate.* 2010;70(6):666-674.

331. Panagopoulos I, Moller E, Collin A, Mertens F. The POU5F1P1 pseudogene encodes a putative protein similar to POU5F1 isoform 1. *Oncol Rep.* 2008;20(5):1029-1033.

332. Illumina. *Quality Scores for Next-Generation Sequencing.* 2011. 770-2011-030.

333. Sims D, Sudbery I, Ilott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature reviews Genetics.* 2014;15(2):121-132.

334. Yu X, Sun S. Comparing a few SNP calling algorithms using low-coverage sequencing data. *BMC Bioinformatics.* 2013;14:274.

335. Warden CD, Adamson AW, Neuhausen SL, Wu X. Detailed comparison of two popular variant calling packages for exome and targeted exon studies. *PeerJ.* 2014;2:e600.

ÖZGEÇMİŞ

Curriculum Vitae

Unvanı, Adı Soyadı: Ms. Özge Cumaoğulları Eker

Kişisel Bilgiler

Doğum Tarihi/ Doğum yeri: 04.09.1984 / Mağusa / K.K.T.C.

Medeni Durum: Evli

Telefon: 0392-365-2152

E-mail: ozgecuma@gmail.com

Yabancı Dil: İngilizce

- Üniversiteler arası Dil Sınavı (ÜDS): 85 (Sağlık, Aralık 2010)
- Yüksek Öğretim Kurumlar Dil Sınavı (Yökdil): 70 (Sağlık, Mart 2017)

Eğitimi:

Lise

Gazimağusa Türk Maarif Koleji

Lisans

Biyoloji

Çukurova Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Adana, Türkiye, 2002-2006

Derecesi: GPA 3.54/ 4.00

Yüksek Lisans

Moleküler Genetik Üzerine Yüksek Lisans (Master, MS)

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Ankara, Türkiye, 2009

Tez Konusu: Faktör VII Promotor Bölge Polimorfizmlerinin Aterosklerozlu Hastalarda Haplotip Gruplandırılmasıyla Tromboz Oluşumunda Rolünün Araştırılması

Danışmanı: Prof. Dr. Nejat Akar

Derecesi: GPA 3.28/ 4.00

Doktora

Moleküler Genetik Üzerine Yüksek Lisans (Doktora, PhD)

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye, 2009-2017

Tez Konusu: Sporadik Kolorektal Kanser İle İlişkilendirilmiş Aday Genlerin İncelenmesi

Danışmanı: Prof. Dr. Hilal Özdağ

Tübitak-112S634, BAP-14L0415003, BAP-16H0415001 nolu projeler tarafından desteklenmiştir. Bu proje COST action BM1206 dahil olmuştur.

Derecesi: GPA 4.00/ 4.00

İlgi Alanları

Kanser Genetiği

Kolorektal Kanser Yatkınlık Genleri

Genom Boyu Asosiyasyon Çalışmaları (GWAS)

Omik Teknolojileri

Laboratuvar Deneyimleri

Moleküler Genetik Laboratuvarı Teknikler

- Sanger DNA Dizi Analizi
- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- Poliakrilamid Jel Elektroforezi–Tek İplikçikli Konformasyon Polimorfizmi
- Restriksyon Enzim İle Kesim (Restriction Fragments Length Polymorphisms-RFLP)
- qRT-PCR
- KASP teknolojisi
- Yeni Nesil DNA dizi analizi

Sitogenetik Laboratuvarı Teknikler

- Soğan Kök Hücresi Mitoz Bölünmesi

Bilgisayar Programları

- Perl Primer (Primer Dizayn Programı)
- D-r (İstatistik Programı)
- Sequencher (DNA dizi analizi programı)
- CEQ Analyser (DNA dizi analizi programı)
- Chromos Lite (DNA dizi analizi programı)
- Kluster Caller
- BrB Aracı
- Omega
- End-Note
- Adobe Photoshop
- Lightroom 1.4

- Microsoft Ofis Paketi

Akademik Eğitmenlik Deneyimi

- AB V. Hibe Programı- Göller için El Ele - Mağusalılar Temiz Sulak Alanları Savunuyor- Seminerleri- 1-2 Nisan 2016, Mağusa, KKTC
- Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Merkez Laboratuvarı Resmi Stajyer Eğitimi, 2007-2016
- Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Merkez Laboratuvarı PCR temelli genetik yaklaşımlar Kursu, 16-17 Haziran 2014
- Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Laboratuvarı Erasmus Öğrencilerine Laboratuvar Teknikleri Eğitimi, 2007-2009

Profesyonel Deneyim

Moleküler Genetik Laboratuvarı

Sporadik Kolorektak Kanser gelişiminde etkili genlerin araştırılması, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü (2012-2017)

FMF Hastalarında MEFV Gen mutasyonlarının taranması, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Laboratuvarı (2009-2012)

FVII Promotor Bölge Polimorfizmlerinin Türk Toplumunda İncelenmesi, Tromboza Etkisinin Belirlenmesi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Laboratuvarı, (2007-2009)

Ribozomal Protein S19 Genindeki 4 bç'lik İnsersiyonun İncelenmesi, (2007-2009)

Sitogenetik Laboratuvarı

Araştırma Öğrencisi, Soğan Kök Hücresinde Cyfluthrin Pestisitinin Etkisi, Çukurova Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Adana, Türkiye, (2005-2006)

Profesyonel Gelişimi

- Management Committee And Working Groups Joint Meeting 21 Ekim 2016
- Cancer Somatic Profiling- Workshop Dubrovnik, Hırvatistan, 20 Ekim 2016
- Proje hazırlama, yazma ve yürütme eğitimi, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 23 Şubat 2015.
- Deney hayvanları kullanım sertifikası*, ANKUSEM, Ankara, Türkiye, 03-12 Kasım 2014*
- Cytoscape 2.8 ile network analiz kursu, Ankara, Türkiye, 15 Kasım 2014
- Management Committee and Working Group 3 Joint Meeting, Leiden, Hollanda 4 Eylül 2014.
- Next Generation Sequencing And Cancer Predisposition Symposium, Leiden, Hollanda, 3 Eylül 2014.
- Next Generation Sequencing (NGS) Data Analysis, Training school, Leiden, Hollanda, 1-3 Eylül 2014.
- Biyogüvenlik eğitimi, Ankara, Turkey, 28 March 2014.

- Translational Genomics In Biomedicine, Workshops and Conferences, , Barselona, İspanya, 13-14 Mart 2014
- Management Committee and Working Groups Joint Meeting, Meetings, Barselona, İspanya, 12 Mart 2014.
- Cerrahi Araştırma Kongresi, Ankara, 2011
- Cerrahi Araştırma Kongresi, Gerçek Veriler Üzerine SPSS Uygulamalı Temel Biyoistatistik Kursu, Ankara, 2011
- Ankara Biyoteknoloji Günleri, Ankara, 2011
- 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya, 2011
- 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Moleküler Biyolojide Yeni Teknolojiler Kursu, Antalya, 2011
- Prof. Dr. Orhan Ulutin Tromboz Sempozyumu, Ankara, 2010
- Avrupa Biyoteknoloji Kongresi, İstanbul, 2011
- Uluslararası İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, İstanbul, 2011
- 21. Uluslararası Tromboz Kongresi, Milano, Italya, 2010
- Prof. Dr. Orhan Ulutin Tromboz Sempozyumu, Ankara, 2010
- Ankara Biyoteknoloji Günleri, Ankara, 2010
- 35. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, 2009
- Prof. Dr. Orhan Ulutin Tromboz Sempozyumu, İstanbul, Marmara Üniversitesi, 25 Mart 2010
- 34. Ulusal Hematoloji Kongresi, Çesme, Türkiye, 2008
- Dr. Burhan Nalbantoğlu Devlet Hastanesi Laboratuvarında Staj, Lefkoşa, KKTC, 2005
- Biyokimya Laboratuvarı
- Hematoloji Laboratuvarı
- Talasemia Laboratuvarı
- XII. Ulusal Öğrenci Kongresi, Isparta, Türkiye, 2004
- XI. Ulusal Öğrenci Kongresi, Aydın, Türkiye, 2003
- G.Mağusa Devlet Hastanesi Laboratuvarında Staj, G.Mağusa, KKTC, 2001

Ödüller

Genç Katılımcı Ödülü, 34. Ulusal Hematoloji Kongresi, Türkiye, 2008

Burslar

Kıbrıs Eğitim Bursu, 2007-2012, 32.000TL

Yayınları

V. Arıkan, O. Cumaoğulları, B. Memiş, F. T. Oz, **Investigation of SOSTDC1 gene in non-syndromic patients with supernumerary teeth.** Yayın Aşamasında.

Eldem İ, Yavuz D, Cumaoğulları O, İleri D. T., İnce E. U, Erdoğan B. D., Bindak R., Özdağ H., Şatıroğlu L.T., Uysal L.Z, **SLCO1B1 Polymorphisms are Associated with Drug Intolerance in Childhood Leukemia Maintenance Therapy**, Yayın Aşamasında.

O. Cumaoğulları, A. Öztürk, R. Akar, N. Akar. **FVII Promoter Region Polymorphisms -401GT, -402GA, -323ins10 in Coronary Artery Disease.** Yazım aşamasında.

O. Cumaoğulları, A. Esmail, A. Öztürk, N. Akar **MEFV mutation frequency in Turkey, Turkish Cypriot, Iraq Turks.** Yazım aşamasında.

T. Eker, V. Genc, Y. Sevim, O. Cumaogullari, M. Ozcelik, A. F. Kocaay, C. Ö. Ensari, O. T. Pasaoglu, **The Effects of Ventilation with High Density Oxygen on the Strength of Gastrointestinal Anastomosis**. 26131440, Ann Surg Treat Res. 2015 Jul;89(1):17-22.

Ö. Cumaoğulları, A. Öztürk, E. Arjan, Ç. Aslan, N. AKAR, S. Elsayed, E. Elsobky, B. Houcher **Ribosomal protein S19 - 631 insertion is an African-originated mutation.**Turkish Journal of Hematology *2012 pages 123 - 124* doi: 10.5152/tjh.2010.12

Ö. Cumaoğulları, **Kıbrısta Yumurta Donasyonu ve Olası Etkileri**, Kıbrıs Bilim-Kıbrıs Türk Biyologlar Çevre Araştırma ve Koruma Derneği Dergisi, Bahar 2008

Ö. Cumaoğulları, **Caulerpa taxifolia**, Yerel Günlük Kıbrıs Gazetesi, 2004

Kitap Bölüm Yazarlığı

N.Tekin Ö. Cumaoğulları H. Ozdag, Current Applications of Biotechnology, Chapter 21, **Biotechnology and Ethics**., Eylül 2015

Sözlü Sunumlar

Yavuz D., Cumaoğulları O., Yılmaz N.T., Oncu B., Ozdağ H., Tufan Ş. N. L., **Investigation of polymorphic variants of SLC6A4 Tph-l and Tph-2 genes in completed suicide**, 5. International Forensic Research and Technology, San Francisco, ABD, 2016

Cumaoğulları Ö., Çığlıdağ Düngül D., Tekin N., Belder N., İlk Dağ Ö., Rajablı F., Doğan Y., Kuzu M. A., Özdağ H., **Aile Temelli Bir Genom Boyu Asosiyasyon Çalışmasının Validasyonu: Türk Popülasyonunda Sporadik Kolorektal Kanser ile İlişkili 75 Tekli NükleotitPolimorfiziminin İncelenmesi**, 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 2015

T. Eker, V. Genc, Y. Sevim, O. Cumaogulları, M. Ozcelık, A.F. Kocaay, C. Ensarı, O.T. Pasaoglu, **The effects of ventilation with high density oxygen on the strength ofgastrointestinal anastomosis** 2. International Conference on e-Health and Telemedicine, İstanbul, Türkiye, 2014

Ö. Cumaoğulları, N. Akar. **Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) ve FMF Mutasyonlarının Kıbrıslı Türklerde Taranması**. Öğrenci Seminerleri, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 2009

Ö. Cumaoğulları, N. Akar. **Faktör VII Promotor Bölge Polimorfizimlerinin Ateroskerozlu Hastalarda Haplotip Gruplandırılmasıyla Tromboz Oluşumunda Rolünün Araştırılması** Trombogenetik Sempozyumu, Sözlü Sunum, İstanbul, Mart 2009

Ö. Cumaoğulları, N. Akar. **Faktör VII Promotor Bölge Polimorfizimlerinin Ateroskerozlu Hastalarda Haplotip Gruplandırılmasıyla Tromboz Oluşumunda Rolünün Araştırılması**. Öğrenci Seminerleri, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 2008

Ö. Cumaoğulları, **Talasemia Hastalığı**. Öğrenci Sunumları, Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Adana, Türkiye, 2006

Ö. Cumaoğulları, **Limulus polyphemus ve Biyoteknolojide Kullanılması**. XII. Ulusal Öğrenci Kongresi, Isparta, Türkiye, 2003

Poster Sunumları

O. Cumaogullari, N. Tekin, F. Rajabli, Ö. Ilk Dag, M.A. Kuzu, H. Özdag, **Investigation of Four Colorectal Cancer Related Single Nucleotide Polymorphisms in Turkish Sporadic Colorectal Cancer Cases**, 41. FEBS Congrees, İzmir, Türkiye, 2016

O. Cumaogullari, O. Ilk Dag, N. Tekin, F. Rajabli, M. A. Kuzu, D. Ciglidag Dungul1, N. Belder, H. Ozdag**. Second step of genomewide associationstudy: Validation of 50 single nucleotitpolymorphisms associated with sporadic colorectal cancer in Turkish population**, 40. FEBS Congrees, Berlin, Almanya, 2015

Ö. Cumaoğulları, N. Belder_ D. Ç. Düngül, M. A. Kuzu, H. Özdag, **2nd Step of GWAS Study: Validation of 75 SNPs associated with sporadic colorectal cancer in Turkish population.** COST BM 1206- Management Committee and Working Groups Joint Meeting Translational Genomics in Biomedicine workshop, Barselona, İspanya, 13 Mart, 2014

Ö. Cumaoğulları, A. Öztürk, E. Arjan, Ç. Aslan, N. AKAR. **Anadolu, Kıbrıs ve Irak Türklerinde MEFV Mutasyon Frekansı**. 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya, Türkiye, 27-30 Ekim , 2011

Ö. Cumaoğulları, H. Özdağ, N. Akar. **FMF Hastalarında 5' Kodlanmayan Bölgenin Araştırılması**. 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya, Türkiye, Ekim 27-30, 2011

Ö. Cumaoğulları, A. Öztürk, N. Akar. **The role of FVII Promoter Polymorphisms in Turkish Atherosclerosis Patiens ,**21. Uluslararası Tromboz Kongresi, Milano, Italya, 2010

Ö. Cumaoğulları, G. Deda, N. Akar. **Urokortin Promotor Bölgesinin Pediatrik İnme (SVA) Hastalarında İncelenmesi,** 36. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, Kasım 3-6, 2010

A. Öztürk, Ö. Cumaoğulları, Z. Veli ,N. Akar. **Faktör VII Promotor Bölge Polimorfizimlerinin Kanser Hastaları, Ateroskerozlu ve Behçetli Hastalarda Haplotip**

Gruplandırılmasıyla Tromboz Oluşumunda Rolünün Araştırılması, 34. Ulusal Hematoloji Kongresi, Çesme, Türkiye, Ekim 8-11, 2008

Dernek Üyelikleri

Kıbrıs Türk Biyologlar Çevre Araştırma ve Koruma Derneği (Avrupa Ülkeleri Biyologlar Birliği -ECBA)

Türkiye Biyologlar Birliği (Avrupa Ülkeleri Biyologlar Birliği -ECBA)

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

Türk Biyokimya Derneği

Links

http://www.ozdaglab.com/

http://www.linkedin.com/profile/view?id=138783227&trk=nav_responsive_tab_profile

EK 4

Türkiye geneli - 82 TNP - Ki kare testi sonuçları							
n	n.miss	chi-sq	p-value	SNP	p<0.05	p<0.1	p<0.0006 (bonf.)
1967	90	0.292	0.5888	1			
1967	25	0.503	0.4782	2			
1967	33	6.263	0.0123	3	*	*	
1967	75	0.003	0.9532	4			
1967	31	1.023	0.3119	5			
1967	60	0.003	0.9596	6			
1967	36	1.266	0.2605	7			
1967	72	0.191	0.6625	8			
1967	40	5.555	0.0184	9	*	*	
1967	99	0.758	0.3839	10			
1967	74	1.121	0.2897	11			
1967	43	1.792	0.1807	12			
1967	39	0.952	0.3293	13			
1967	53	2.925	0.0872	14		*	
1967	62	0.329	0.5665	15			
1967	39	2.108	0.1465	16			
1967	37	0.054	0.8164	17			
1967	35	0.178	0.6728	18			
1967	49	12.68	4.00E-04	19	*	*	*
1967	35	0.186	0.666	20			
1967	63	0.194	0.6597	21			
1967	56	5.589	0.0181	22	*	*	
1967	79	0.013	0.9087	23			
1967	64	0.11	0.7403	24			
1967	175	2.499	0.1139	25			
1967	88	0.978	0.3227	26			
1967	53	0.001	0.9801	27			
1967	93	0.255	0.6135	28			
1967	44	2.595	0.1072	29			
1967	49	0.335	0.5628	30			
1967	45	0.438	0.5082	31			
1967	100	0.82	0.3652	32			
1967	47	0.172	0.6786	33			
1967	45	0.399	0.5274	34			
1967	84	0.002	0.9672	35			
1967	107	0.854	0.3555	36			
1967	86	1.464	0.2262	37			
1967	83	0.09	0.7636	38			
1967	79	0.115	0.7346	39			
1967	65	0.001	0.9775	40			
1967	74	0.19	0.6627	41			
1967	58	0.427	0.5133	42			
1967	85	2.567	0.1091	43			
1967	89	0.187	0.6656	44			
1967	110	0.769	0.3807	45			
1967	65	0.078	0.78	46			

1967	125	0.481	0.4878	47			
1967	68	0.293	0.5885	48			
1967	64	0.001	0.9709	49			
1967	94	0	0.9997	50			
1967	49	0.225	0.635	51			
1967	47	0.033	0.8551	52			
1967	33	0.851	0.3563	53			
1967	54	0.14	0.7084	54			
1967	63	2.506	0.1134	55			
1967	56	0.096	0.7573	56			
1967	104	0.313	0.5761	57			
1967	49	0.094	0.7588	58			
1967	54	0.065	0.7989	59			
1967	84	1.158	0.282	60			
1967	43	0.146	0.7026	61			
1967	53	0.16	0.6893	62			
1967	80	1.263	0.261	63			
1967	59	0.025	0.8738	64			
1967	87	0.512	0.4742	65			
1967	55	0.764	0.3822	66			
1967	41	0.002	0.9656	67			
1967	41	0.002	0.9675	68			
1967	53	0.564	0.4528	69			
1967	90	0.198	0.6564	70			
1967	48	3.79	0.0515	71		*	
1967	45	2.907	0.0882	72		*	
1967	56	3.946	0.047	73	*	*	
1967	70	0.001	0.9813	74			
1967	44	0.179	0.6721	75			
1967	65	9.757	0.0018	76	*	*	
1967	59	0.045	0.8315	77			
1967	93	3.172	0.0749	78		*	
1967	88	0.036	0.8498	79			
1967	110	0.097	0.7549	80			
1967	96	0.823	0.3643	81			
1967	827	1.506	0.2197	82			

güvenilir olmayan sonuç

stratifikasyon nedeni ile dışlandı.

p değeri anlamlı sonuç

Doğum yeri 7 Coğrafik Bölge - 82 TNP - Ki kare testi sonuçları						
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	14	0.006	0.9403	1	
Ege	102	3	0.813	0.3671	1	
Akdeniz	289	14	0.073	0.7866	1	
Doğu Anadolu	240	15	3.26	0.071	1	
Güney Doğu Anadolu	118	7	0.566	0.4521	1	
Karadeniz	491	25	0.802	0.3704	1	
Marmara	263	11	1.04	0.3077	1	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	3	0.001	0.9735	2	
Ege	102	0	1.589	0.2075	2	
Akdeniz	289	7	0.121	0.7282	2	
Doğu Anadolu	240	5	4.668	0.0307	2	*
Güney Doğu Anadolu	118	0	0.305	0.5807	2	
Karadeniz	491	6	2.118	0.1455	2	
Marmara	263	3	1.301	0.254	2	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	9	3.337	0.0678	3	
Ege	102	0	0	0.9846	3	
Akdeniz	289	6	0.669	0.4135	3	
Doğu Anadolu	240	2	0.032	0.8582	3	
Güney Doğu Anadolu	118	3	1.677	0.1954	3	
Karadeniz	491	4	5.669	0.0173	3	*
Marmara	263	9	0.037	0.847	3	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	9	0.002	0.9636	4	
Ege	102	3	0.169	0.6811	4	
Akdeniz	289	16	0.05	0.8236	4	
Doğu Anadolu	240	14	0.006	0.9387	4	
Güney Doğu Anadolu	118	4	0.834	0.3611	4	
Karadeniz	491	19	0.227	0.6336	4	
Marmara	263	5	0.355	0.5515	4	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	5	2.317	0.128	5	
Ege	102	1	0.73	0.3929	5	
Akdeniz	289	7	0.594	0.441	5	
Doğu Anadolu	240	4	0.437	0.5086	5	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.132	0.7164	5	
Karadeniz	491	7	0.006	0.9405	5	
Marmara	263	4	2.178	0.14	5	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	12	0.576	0.4478	6	
Ege	102	1	0.397	0.5286	6	
Akdeniz	289	10	1.745	0.1866	6	
Doğu Anadolu	240	6	0.009	0.9242	6	
Güney Doğu Anadolu	118	3	1.804	0.1792	6	
Karadeniz	491	16	0.523	0.4694	6	
Marmara	263	9	0.129	0.7193	6	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**

İç Anadolu	349	6	0.636	0.4251	7	
Ege	102	1	0.287	0.5919	7	
Akdeniz	289	9	0.307	0.5796	7	
Doğu Anadolu	240	7	0.119	0.7304	7	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.061	0.8057	7	
Karadeniz	491	3	0.065	0.7981	7	
Marmara	263	6	3.053	0.0806	7	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	17	0.222	0.6373	8	
Ege	102	4	0.195	0.6591	8	
Akdeniz	289	11	2.397	0.1215	8	
Doğu Anadolu	240	6	1.256	0.2623	8	
Güney Doğu Anadolu	118	4	0.619	0.4313	8	
Karadeniz	491	21	0.028	0.867	8	
Marmara	263	5	0.116	0.7333	8	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	10	0.841	0.3592	9	
Ege	102	5	1.09	0.2965	9	
Akdeniz	289	7	0.456	0.4995	9	
Doğu Anadolu	240	5	0.38	0.5378	9	
Güney Doğu Anadolu	118	3	1.815	0.1779	9	
Karadeniz	491	5	0.009	0.9259	9	
Marmara	263	4	5.417	0.0199	9	*
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	18	0.641	0.4235	10	
Ege	102	6	0.715	0.3978	10	
Akdeniz	289	11	0.012	0.9136	10	
Doğu Anadolu	240	15	0.051	0.8212	10	
Güney Doğu Anadolu	118	4	0	1	10	
Karadeniz	491	33	0.95	0.3297	10	
Marmara	263	10	1.002	0.3169	10	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	13	0.545	0.4603	11	
Ege	102	4	0.127	0.7214	11	
Akdeniz	289	12	0.448	0.5034	11	
Doğu Anadolu	240	8	0.12	0.7292	11	
Güney Doğu Anadolu	118	5	0.197	0.657	11	
Karadeniz	491	20	0.459	0.4983	11	
Marmara	263	8	0.682	0.4089	11	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	9	0.067	0.7962	12	
Ege	102	2	0.722	0.3954	12	
Akdeniz	289	6	3.904	0.0482	12	*
Doğu Anadolu	240	3	0.02	0.8887	12	
Güney Doğu Anadolu	118	2	0.838	0.36	12	
Karadeniz	491	11	0.189	0.6634	12	
Marmara	263	6	3.359	0.0668	12	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	10	0.005	0.942	13	
Ege	102	0	0.481	0.4878	13	

Akdeniz	289	7	0.517	0.4723	13	
Doğu Anadolu	240	3	1.753	0.1854	13	
Güney Doğu Anadolu	118	0	4.039	0.0445	13	*
Karadeniz	491	8	6.108	0.0135	13	*
Marmara	263	10	0.26	0.6103	13	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	15	0	0.9958	14	
Ege	102	0	0.097	0.7555	14	
Akdeniz	289	9	0.038	0.8464	14	
Doğu Anadolu	240	5	2.035	0.1537	14	
Güney Doğu Anadolu	118	0	2.617	0.1057	14	
Karadeniz	491	11	2.116	0.1458	14	
Marmara	263	7	0.655	0.4184	14	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	10	0.382	0.5367	15	
Ege	102	2	0.5	0.4796	15	
Akdeniz	289	11	0.57	0.4503	15	
Doğu Anadolu	240	8	0.032	0.859	15	
Güney Doğu Anadolu	118	3	0.737	0.3907	15	
Karadeniz	491	19	1.272	0.2594	15	
Marmara	263	7	0.235	0.6277	15	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	8	0.058	0.8089	16	
Ege	102	3	4.063	0.0438	16	*
Akdeniz	289	9	0.186	0.6663	16	
Doğu Anadolu	240	4	0.058	0.8093	16	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.49	0.4839	16	
Karadeniz	491	10	2.812	0.0936	16	
Marmara	263	3	4.087	0.0432	16	*
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	8	0.995	0.3185	17	
Ege	102	2	0.335	0.5626	17	
Akdeniz	289	7	0.286	0.5928	17	
Doğu Anadolu	240	4	0.034	0.8528	17	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.003	0.9556	17	
Karadeniz	491	6	3.7	0.0544	17	
Marmara	263	6	0.676	0.4109	17	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	5	0.009	0.9225	18	
Ege	102	0	0.463	0.496	18	
Akdeniz	289	7	0.882	0.3476	18	
Doğu Anadolu	240	4	0.012	0.9124	18	
Güney Doğu Anadolu	118	2	1.66	0.1976	18	
Karadeniz	491	11	0.199	0.6557	18	
Marmara	263	4	0.091	0.7632	18	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	7	0.752	0.3859	19	
Ege	102	3	0.497	0.4808	19	
Akdeniz	289	13	5.804	0.016	19	*
Doğu Anadolu	240	7	5.1	0.0239	19	*

Güney Doğu Anadolu	118	4	0.005	0.9455	19	
Karadeniz	491	9	5.491	0.0191	19	*
Marmara	263	6	1.246	0.2643	19	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	6	0.963	0.3265	20	
Ege	102	3	0.147	0.701	20	
Akdeniz	289	6	0.503	0.4781	20	
Doğu Anadolu	240	3	1.457	0.2275	20	
Güney Doğu Anadolu	118	3	0.031	0.8604	20	
Karadeniz	491	8	2.488	0.1147	20	
Marmara	263	5	1.687	0.194	20	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	12	1.469	0.2255	21	
Ege	102	4	0.727	0.3939	21	
Akdeniz	289	11	0.524	0.4689	21	
Doğu Anadolu	240	12	1.664	0.1971	21	
Güney Doğu Anadolu	118	3	1.142	0.2852	21	
Karadeniz	491	18	0.015	0.9023	21	
Marmara	263	3	0.161	0.6884	21	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	8	5.265	0.0218	22	*
Ege	102	2	0.88	0.3483	22	
Akdeniz	289	15	1.181	0.2771	22	
Doğu Anadolu	240	5	0.58	0.4464	22	
Güney Doğu Anadolu	118	3	1.522	0.2173	22	
Karadeniz	491	13	1.914	0.1665	22	
Marmara	263	7	1.798	0.18	22	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	11	0.027	0.8704	23	
Ege	102	2	0.082	0.7743	23	
Akdeniz	289	16	2.776	0.0957	23	
Doğu Anadolu	240	13	0.056	0.8129	23	
Güney Doğu Anadolu	118	6	3.465	0.0627	23	
Karadeniz	491	10	0.467	0.4943	23	
Marmara	263	13	1.68	0.1949	23	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	18	0.096	0.7569	24	
Ege	102	1	2.181	0.1398	24	
Akdeniz	289	19	0.3	0.5841	24	
Doğu Anadolu	240	4	0.436	0.5092	24	
Güney Doğu Anadolu	118	3	0.001	0.9803	24	
Karadeniz	491	11	2.014	0.1558	24	
Marmara	263	4	0.011	0.9154	24	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	31	0	0.988	25	
Ege	102	10	0.013	0.9099	25	
Akdeniz	289	40	0.597	0.4396	25	
Doğu Anadolu	240	15	0.047	0.8278	25	
Güney Doğu Anadolu	118	10	1.749	0.1859	25	
Karadeniz	491	42	2.718	0.0992	25	

Marmara	263	20	0.102	0.7493	25	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	20	0.23	0.6315	26	
Ege	102	3	0.918	0.338	26	
Akdeniz	289	16	0.787	0.3751	26	
Doğu Anadolu	240	16	0.463	0.4963	26	
Güney Doğu Anadolu	118	4	0.499	0.48	26	
Karadeniz	491	13	2.005	0.1568	26	
Marmara	263	11	0.157	0.6915	26	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	6	2.885	0.0894	27	
Ege	102	2	2.183	0.1396	27	
Akdeniz	289	16	0.02	0.8864	27	
Doğu Anadolu	240	5	0.908	0.3405	27	
Güney Doğu Anadolu	118	4	0.289	0.5908	27	
Karadeniz	491	11	0.207	0.6489	27	
Marmara	263	6	0.051	0.8211	27	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	20	4.947	0.0261	28	*
Ege	102	8	0.194	0.6599	28	
Akdeniz	289	16	3.309	0.0689	28	
Doğu Anadolu	240	14	0.487	0.4854	28	
Güney Doğu Anadolu	118	10	0.58	0.4463	28	
Karadeniz	491	14	0.218	0.6404	28	
Marmara	263	9	0.019	0.8909	28	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	6	0.008	0.9285	29	
Ege	102	2	1.147	0.2842	29	
Akdeniz	289	9	1.136	0.2866	29	
Doğu Anadolu	240	10	1.56	0.2117	29	
Güney Doğu Anadolu	118	4	1.307	0.253	29	
Karadeniz	491	8	0.006	0.9403	29	
Marmara	263	5	0.208	0.6485	29	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	11	2.768	0.0962	30	
Ege	102	3	0.504	0.4777	30	
Akdeniz	289	9	0.495	0.4818	30	
Doğu Anadolu	240	3	1.091	0.2963	30	
Güney Doğu Anadolu	118	0	0.114	0.7355	30	
Karadeniz	491	11	0.016	0.8979	30	
Marmara	263	12	0.045	0.8316	30	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	8	0.002	0.9686	31	
Ege	102	0	0.378	0.5389	31	
Akdeniz	289	10	0.21	0.647	31	
Doğu Anadolu	240	11	1.788	0.1812	31	
Güney Doğu Anadolu	118	2	0.001	0.9746	31	
Karadeniz	491	7	0.891	0.3451	31	
Marmara	263	6	0.724	0.3947	31	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**

İç Anadolu	349	20	0.08	0.7778	32	
Ege	102	6	0.808	0.3687	32	
Akdeniz	289	17	0.002	0.9655	32	
Doğu Anadolu	240	12	0.015	0.9022	32	
Güney Doğu Anadolu	118	3	3.018	0.0824	32	
Karadeniz	491	29	0.761	0.383	32	
Marmara	263	11	0.405	0.5246	32	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	11	0.198	0.6562	33	
Ege	102	2	1.909	0.1671	33	
Akdeniz	289	8	1.379	0.2402	33	
Doğu Anadolu	240	5	0.067	0.7957	33	
Güney Doğu Anadolu	118	2	2.732	0.0984	33	
Karadeniz	491	7	0.013	0.9088	33	
Marmara	263	12	0.713	0.3983	33	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	6	0.281	0.5962	34	
Ege	102	1	0.121	0.7278	34	
Akdeniz	289	9	0.005	0.9438	34	
Doğu Anadolu	240	8	2.024	0.1549	34	
Güney Doğu Anadolu	118	2	2.692	0.1008	34	
Karadeniz	491	10	2.084	0.1489	34	
Marmara	263	7	3.739	0.0532	34	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	19	0.011	0.9168	35	
Ege	102	6	1.029	0.3105	35	
Akdeniz	289	16	0.018	0.8922	35	
Doğu Anadolu	240	9	0.282	0.5955	35	
Güney Doğu Anadolu	118	4	0.85	0.3566	35	
Karadeniz	491	16	0.558	0.4552	35	
Marmara	263	9	2.465	0.1164	35	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	18	0.081	0.7753	36	
Ege	102	8	0.16	0.6887	36	
Akdeniz	289	16	0.044	0.8337	36	
Doğu Anadolu	240	14	5.294	0.0214	36	*
Güney Doğu Anadolu	118	9	0.886	0.3465	36	
Karadeniz	491	21	0.537	0.4638	36	
Marmara	263	12	0	0.9833	36	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	14	0.561	0.454	37	
Ege	102	4	0.056	0.8123	37	
Akdeniz	289	18	0.08	0.778	37	
Doğu Anadolu	240	10	0.011	0.9184	37	
Güney Doğu Anadolu	118	9	0.683	0.4085	37	
Karadeniz	491	20	1.367	0.2423	37	
Marmara	263	8	0.008	0.9282	37	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	13	0.23	0.6318	38	
Ege	102	6	2.903	0.0884	38	

Akdeniz	289	15	0.067	0.7964	38	
Doğu Anadolu	240	10	0.002	0.963	38	
Güney Doğu Anadolu	118	6	8.289	0.004	38	*
Karadeniz	491	21	0.159	0.6896	38	
Marmara	263	10	0.483	0.4869	38	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	11	5.701	0.017	39	*
Ege	102	5	0.031	0.8608	39	
Akdeniz	289	14	0.021	0.8839	39	
Doğu Anadolu	240	12	0.501	0.479	39	
Güney Doğu Anadolu	118	6	4.095	0.043	39	*
Karadeniz	491	16	3.982	0.046	39	*
Marmara	263	10	1.875	0.1709	39	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	15	1.214	0.2706	40	
Ege	102	2	1.724	0.1891	40	
Akdeniz	289	14	0.7	0.4028	40	
Doğu Anadolu	240	5	1.047	0.3062	40	
Güney Doğu Anadolu	118	3	0.726	0.3943	40	
Karadeniz	491	16	0.082	0.7752	40	
Marmara	263	6	4.204	0.0403	40	*
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	20	0.493	0.4826	41	
Ege	102	5	0.15	0.6986	41	
Akdeniz	289	14	0.584	0.4447	41	
Doğu Anadolu	240	12	0.507	0.4764	41	
Güney Doğu Anadolu	118	4	0.094	0.759	41	
Karadeniz	491	14	0.616	0.4324	41	
Marmara	263	3	0.851	0.3562	41	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	11	0.124	0.7252	42	
Ege	102	5	1.982	0.1591	42	
Akdeniz	289	16	1.866	0.172	42	
Doğu Anadolu	240	4	1.095	0.2953	42	
Güney Doğu Anadolu	118	2	0.036	0.8491	42	
Karadeniz	491	14	0.699	0.403	42	
Marmara	263	5	2.293	0.13	42	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	18	0.452	0.5016	43	
Ege	102	5	0.194	0.6599	43	
Akdeniz	289	19	3.76	0.0525	43	
Doğu Anadolu	240	8	1.164	0.2807	43	
Güney Doğu Anadolu	118	4	1.458	0.2273	43	
Karadeniz	491	17	3.187	0.0742	43	
Marmara	263	9	1.467	0.2259	43	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	22	1.256	0.2625	44	
Ege	102	5	0.822	0.3646	44	
Akdeniz	289	18	0.378	0.5386	44	
Doğu Anadolu	240	12	0.105	0.7457	44	

Güney Doğu Anadolu	118	5	0.15	0.6989	44	
Karadeniz	491	11	0.685	0.4077	44	
Marmara	263	11	0.015	0.9033	44	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	23	0.598	0.4395	45	
Ege	102	8	3.452	0.0632	45	
Akdeniz	289	16	0.815	0.3667	45	
Doğu Anadolu	240	9	1.151	0.2834	45	
Güney Doğu Anadolu	118	10	0.238	0.6259	45	
Karadeniz	491	22	0.676	0.4108	45	
Marmara	263	13	0.289	0.5908	45	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	10	1.77	0.1834	46	
Ege	102	6	0.003	0.9584	46	
Akdeniz	289	13	0.247	0.6195	46	
Doğu Anadolu	240	4	0.585	0.4442	46	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.006	0.9396	46	
Karadeniz	491	21	0.166	0.6835	46	
Marmara	263	9	0.168	0.6817	46	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	24	0.001	0.9748	47	
Ege	102	8	0.066	0.7978	47	
Akdeniz	289	25	2.395	0.1217	47	
Doğu Anadolu	240	21	0.359	0.5492	47	
Güney Doğu Anadolu	118	2	0	1	47	
Karadeniz	491	24	0.694	0.4049	47	
Marmara	263	13	0.172	0.6784	47	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	14	0.032	0.8579	48	
Ege	102	4	0.605	0.4366	48	
Akdeniz	289	18	0.608	0.4356	48	
Doğu Anadolu	240	6	0.132	0.7163	48	
Güney Doğu Anadolu	118	4	1.596	0.2065	48	
Karadeniz	491	13	0.452	0.5012	48	
Marmara	263	6	0.018	0.8938	48	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	17	0.006	0.9378	49	
Ege	102	3	0.841	0.359	49	
Akdeniz	289	12	0.349	0.5546	49	
Doğu Anadolu	240	2	0.029	0.8644	49	
Güney Doğu Anadolu	118	5	0.463	0.4961	49	
Karadeniz	491	16	1.342	0.2466	49	
Marmara	263	6	0.377	0.5391	49	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	20	0.017	0.8949	50	
Ege	102	8	1.031	0.3098	50	
Akdeniz	289	20	0.738	0.3903	50	
Doğu Anadolu	240	13	0.175	0.6756	50	
Güney Doğu Anadolu	118	5	0.591	0.4422	50	
Karadeniz	491	13	1.669	0.1963	50	

Marmara	263	10	0.2	0.6551	50	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	4	0.014	0.9048	51	
Ege	102	2	0.311	0.5772	51	
Akdeniz	289	11	0.664	0.4152	51	
Doğu Anadolu	240	6	0.16	0.6893	51	
Güney Doğu Anadolu	118	3	0.426	0.5139	51	
Karadeniz	491	15	0.625	0.4292	51	
Marmara	263	7	0.065	0.799	51	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	12	0.004	0.9478	52	
Ege	102	1	0.354	0.5517	52	
Akdeniz	289	12	1.329	0.249	52	
Doğu Anadolu	240	6	0.14	0.7087	52	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.425	0.5143	52	
Karadeniz	491	5	1.318	0.251	52	
Marmara	263	8	0.738	0.3903	52	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	7	2.976	0.0845	53	
Ege	102	2	4.217	0.04	53	*
Akdeniz	289	7	3.453	0.0631	53	
Doğu Anadolu	240	6	0.076	0.783	53	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.151	0.6978	53	
Karadeniz	491	4	0.131	0.7179	53	
Marmara	263	6	0.132	0.7161	53	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	9	0.953	0.3291	54	
Ege	102	3	1.223	0.2688	54	
Akdeniz	289	9	1.484	0.2231	54	
Doğu Anadolu	240	5	0.524	0.4691	54	
Güney Doğu Anadolu	118	5	1.05	0.3056	54	
Karadeniz	491	18	0.012	0.9111	54	
Marmara	263	4	0.382	0.5368	54	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	10	0.011	0.9182	55	
Ege	102	1	0.549	0.4589	55	
Akdeniz	289	16	2.639	0.1042	55	
Doğu Anadolu	240	7	0.25	0.6168	55	
Güney Doğu Anadolu	118	2	3.194	0.0739	55	
Karadeniz	491	15	0.221	0.638	55	
Marmara	263	8	1.04	0.3078	55	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	9	0.039	0.8433	56	
Ege	102	3	1.689	0.1938	56	
Akdeniz	289	14	0.024	0.8779	56	
Doğu Anadolu	240	12	0.438	0.5083	56	
Güney Doğu Anadolu	118	2	0.077	0.7811	56	
Karadeniz	491	9	1.45	0.2286	56	
Marmara	263	6	0.003	0.9555	56	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**

İç Anadolu	349	20	0.983	0.3216	57	
Ege	102	6	0.401	0.5266	57	
Akdeniz	289	19	1.089	0.2967	57	
Doğu Anadolu	240	16	0.072	0.7881	57	
Güney Doğu Anadolu	118	3	2.552	0.1102	57	
Karadeniz	491	23	0.05	0.8235	57	
Marmara	263	12	0.787	0.375	57	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	6	0.928	0.3355	58	
Ege	102	2	0.936	0.3333	58	
Akdeniz	289	12	0.003	0.9595	58	
Doğu Anadolu	240	6	0.299	0.5845	58	
Güney Doğu Anadolu	118	4	2.719	0.0992	58	
Karadeniz	491	8	0.681	0.4091	58	
Marmara	263	11	4.799	0.0285	58	*
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	8	0.492	0.483	59	
Ege	102	2	4.502	0.0339	59	*
Akdeniz	289	13	0.751	0.386	59	
Doğu Anadolu	240	11	10.504	0.0012	59	*
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.039	0.843	59	
Karadeniz	491	13	4.404	0.0359	59	*
Marmara	263	4	0.005	0.9427	59	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	13	0.179	0.6719	60	
Ege	102	3	0	0.9845	60	
Akdeniz	289	19	1.917	0.1662	60	
Doğu Anadolu	240	12	0.301	0.583	60	
Güney Doğu Anadolu	118	10	0.861	0.3535	60	
Karadeniz	491	13	1.058	0.3037	60	
Marmara	263	8	0.395	0.5298	60	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	8	0.001	0.9771	61	
Ege	102	1	0.221	0.6382	61	
Akdeniz	289	14	1.591	0.2072	61	
Doğu Anadolu	240	2	0.316	0.5738	61	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.417	0.5183	61	
Karadeniz	491	8	4.686	0.0304	61	*
Marmara	263	7	4.579	0.0324	61	*
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	10	0.428	0.5131	62	
Ege	102	1	0.142	0.7067	62	
Akdeniz	289	10	0.011	0.916	62	
Doğu Anadolu	240	7	1.541	0.2145	62	
Güney Doğu Anadolu	118	3	1.794	0.1804	62	
Karadeniz	491	12	3.468	0.0626	62	
Marmara	263	8	0.034	0.8544	62	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	11	5.11	0.0238	63	*
Ege	102	1	0.243	0.622	63	

Akdeniz	289	21	0.761	0.3831	63	
Doğu Anadolu	240	13	0.342	0.5586	63	
Güney Doğu Anadolu	118	4	2.024	0.1548	63	
Karadeniz	491	20	0.949	0.3298	63	
Marmara	263	8	0.002	0.9659	63	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	5	4.034	0.0446	64	*
Ege	102	3	2.063	0.1509	64	
Akdeniz	289	16	3.998	0.0455	64	*
Doğu Anadolu	240	6	0.001	0.9778	64	
Güney Doğu Anadolu	118	3	0.121	0.7275	64	
Karadeniz	491	20	0.655	0.4184	64	
Marmara	263	3	0.115	0.7347	64	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	15	1.156	0.2822	65	
Ege	102	7	2.284	0.1307	65	
Akdeniz	289	19	0.312	0.5762	65	
Doğu Anadolu	240	11	0.456	0.4996	65	
Güney Doğu Anadolu	118	6	1.783	0.1818	65	
Karadeniz	491	15	3.941	0.0471	65	*
Marmara	263	9	2.038	0.1534	65	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	12	0.686	0.4076	66	
Ege	102	4	1.592	0.2071	66	
Akdeniz	289	10	0.09	0.7647	66	
Doğu Anadolu	240	5	0.778	0.3777	66	
Güney Doğu Anadolu	118	3	1.165	0.2805	66	
Karadeniz	491	15	2.677	0.1018	66	
Marmara	263	5	1.89	0.1692	66	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	5	0.241	0.6238	67	
Ege	102	2	0.146	0.7026	67	
Akdeniz	289	10	0.029	0.8641	67	
Doğu Anadolu	240	4	0.23	0.6317	67	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.054	0.8156	67	
Karadeniz	491	10	0.154	0.6945	67	
Marmara	263	6	1.356	0.2441	67	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	10	0.305	0.5807	68	
Ege	102	3	0	0.9836	68	
Akdeniz	289	7	0.218	0.6408	68	
Doğu Anadolu	240	5	0.826	0.3635	68	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.054	0.8167	68	
Karadeniz	491	8	0.818	0.3657	68	
Marmara	263	6	0.322	0.5705	68	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	3	0.257	0.6121	69	
Ege	102	5	0.158	0.6906	69	
Akdeniz	289	11	1.789	0.181	69	
Doğu Anadolu	240	10	0.016	0.8988	69	

Güney Doğu Anadolu	118	3	0.037	0.8473	69	
Karadeniz	491	10	0.275	0.5999	69	
Marmara	263	9	0.038	0.8451	69	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	18	0.743	0.3887	70	
Ege	102	5	0.534	0.465	70	
Akdeniz	289	11	2.687	0.1011	70	
Doğu Anadolu	240	10	0.3	0.5842	70	
Güney Doğu Anadolu	118	7	0.969	0.3249	70	
Karadeniz	491	17	0.004	0.9478	70	
Marmara	263	14	0.329	0.5664	70	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	6	1.937	0.164	71	
Ege	102	5	0.29	0.5902	71	
Akdeniz	289	14	1.166	0.2803	71	
Doğu Anadolu	240	9	4.671	0.0307	71	*
Güney Doğu Anadolu	118	1	1.159	0.2817	71	
Karadeniz	491	6	0.043	0.8355	71	
Marmara	263	3	0	0.9972	71	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	9	0.875	0.3496	72	
Ege	102	2	1.532	0.2158	72	
Akdeniz	289	9	4.307	0.038	72	*
Doğu Anadolu	240	10	1.025	0.3113	72	
Güney Doğu Anadolu	118	1	1.542	0.2143	72	
Karadeniz	491	9	0.353	0.5524	72	
Marmara	263	4	0.196	0.6579	72	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	8	0.922	0.337	73	
Ege	102	5	0.889	0.3457	73	
Akdeniz	289	11	0.613	0.4335	73	
Doğu Anadolu	240	6	1.651	0.1988	73	
Güney Doğu Anadolu	118	3	0.162	0.6869	73	
Karadeniz	491	10	1.201	0.2732	73	
Marmara	263	11	2.999	0.0833	73	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	9	0.259	0.611	74	
Ege	102	4	0.015	0.9026	74	
Akdeniz	289	20	1.741	0.187	74	
Doğu Anadolu	240	12	0.859	0.354	74	
Güney Doğu Anadolu	118	3	0.011	0.9182	74	
Karadeniz	491	10	0.482	0.4873	74	
Marmara	263	7	0.217	0.6414	74	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	4	0.433	0.5103	75	
Ege	102	4	1.314	0.2516	75	
Akdeniz	289	12	1.885	0.1697	75	
Doğu Anadolu	240	2	0.248	0.6184	75	
Güney Doğu Anadolu	118	0	0.016	0.898	75	
Karadeniz	491	15	0.341	0.5595	75	

Marmara	263	5	0.183	0.6684	75	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	9	2.529	0.1118	76	
Ege	102	1	0.781	0.3769	76	
Akdeniz	289	10	0.539	0.4629	76	
Doğu Anadolu	240	6	1.853	0.1735	76	
Güney Doğu Anadolu	118	6	0.089	0.7649	76	
Karadeniz	491	20	3.402	0.0651	76	
Marmara	263	10	0.401	0.5268	76	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	11	0.33	0.5658	77	
Ege	102	3	0.477	0.4898	77	
Akdeniz	289	11	2.02	0.1553	77	
Doğu Anadolu	240	10	0.009	0.9227	77	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.559	0.4546	77	
Karadeniz	491	14	0.004	0.9484	77	
Marmara	263	6	0.061	0.8043	77	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	15	2.018	0.1555	78	
Ege	102	7	0.491	0.4834	78	
Akdeniz	289	14	0.029	0.8651	78	
Doğu Anadolu	240	11	0.491	0.4833	78	
Güney Doğu Anadolu	118	4	0.017	0.8955	78	
Karadeniz	491	22	0.331	0.5651	78	
Marmara	263	9	0.367	0.5447	78	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	13	3.245	0.0717	79	
Ege	102	7	1.559	0.2118	79	
Akdeniz	289	18	0.002	0.9603	79	
Doğu Anadolu	240	8	1.158	0.2819	79	
Güney Doğu Anadolu	118	3	0.001	0.9771	79	
Karadeniz	491	22	0.065	0.7995	79	
Marmara	263	14	0.424	0.5152	79	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	21	0.024	0.8759	80	
Ege	102	7	0.006	0.9382	80	
Akdeniz	289	18	1.192	0.275	80	
Doğu Anadolu	240	13	0.001	0.978	80	
Güney Doğu Anadolu	118	7	1.184	0.2766	80	
Karadeniz	491	15	0.015	0.9011	80	
Marmara	263	21	0.311	0.577	80	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	349	16	0.88	0.3483	81	
Ege	102	4	0.176	0.6748	81	
Akdeniz	289	17	0.044	0.8345	81	
Doğu Anadolu	240	12	2.372	0.1235	81	
Güney Doğu Anadolu	118	1	0.126	0.7227	81	
Karadeniz	491	28	0.767	0.3812	81	
Marmara	263	13	0.528	0.4673	81	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**

İç Anadolu	349	143	0.018	0.8924	82	
Ege	102	43	1.044	0.307	82	
Akdeniz	289	124	2.624	0.1053	82	
Doğu Anadolu	240	102	0.059	0.8086	82	
Güney Doğu Anadolu	118	45	1.229	0.2677	82	
Karadeniz	491	195	0.001	0.972	82	
Marmara	263	127	0.509	0.4758	82	
***p değeri anlamlı sonuç (p<0.05)**						

İkamet yeri 7 Coğrafik Bölge - 82 TNP - Ki kare testi sonuçları						
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	11	0.893	0.3448	1	
Ege	85	4	1.088	0.297	1	
Akdeniz	348	20	0.079	0.7789	1	
Doğu Anadolu	127	8	0.752	0.3858	1	
Güney Doğu Anadolu	50	2	1.112	0.2916	1	
Karadeniz	330	18	3.369	0.0664	1	
Marmara	419	19	2.467	0.1163	1	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	5	0.739	0.39	2	
Ege	85	0	1.256	0.2625	2	
Akdeniz	348	6	0.012	0.9132	2	
Doğu Anadolu	127	3	1.537	0.2151	2	
Güney Doğu Anadolu	50	0	1.313	0.2519	2	
Karadeniz	330	2	4.49	0.0341	2	*
Marmara	419	7	2.509	0.1132	2	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	11	3.801	0.0512	3	
Ege	85	1	0.572	0.4495	3	
Akdeniz	348	7	0.677	0.4108	3	
Doğu Anadolu	127	2	0.65	0.4201	3	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.02	0.8879	3	
Karadeniz	330	4	3.316	0.0686	3	
Marmara	419	7	1.182	0.2769	3	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	13	0.008	0.9283	4	
Ege	85	3	0.033	0.8553	4	
Akdeniz	348	16	0.05	0.8231	4	
Doğu Anadolu	127	6	0.002	0.9669	4	
Güney Doğu Anadolu	50	1	4.447	0.035	4	*
Karadeniz	330	8	1.497	0.2212	4	
Marmara	419	10	0.068	0.7939	4	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	5	3.789	0.0516	5	
Ege	85	1	1.86	0.1727	5	
Akdeniz	348	7	2.851	0.0913	5	
Doğu Anadolu	127	2	0.409	0.5222	5	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.193	0.6602	5	
Karadeniz	330	5	0.112	0.7377	5	
Marmara	419	5	0.625	0.4292	5	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	14	0.17	0.6801	6	
Ege	85	5	2.431	0.119	6	
Akdeniz	348	10	3.264	0.0708	6	
Doğu Anadolu	127	2	0.041	0.84	6	
Güney Doğu Anadolu	50	0	2.054	0.1518	6	
Karadeniz	330	10	0.029	0.8655	6	
Marmara	419	15	0.007	0.9357	6	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**

İç Anadolu	386	4	0.083	0.7732	7	
Ege	85	1	0.036	0.849	7	
Akdeniz	348	10	0.014	0.9061	7	
Doğu Anadolu	127	3	0.186	0.6659	7	
Güney Doğu Anadolu	50	0	1.485	0.223	7	
Karadeniz	330	2	0.308	0.5789	7	
Marmara	419	10	2.92	0.0875	7	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	21	0.322	0.5706	8	
Ege	85	4	3.469	0.0625	8	
Akdeniz	348	16	4.51	0.0337	8	*
Doğu Anadolu	127	3	0.06	0.8063	8	
Güney Doğu Anadolu	50	0	2.316	0.1281	8	
Karadeniz	330	10	0.451	0.502	8	
Marmara	419	14	0.101	0.7506	8	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	11	0.241	0.6236	9	
Ege	85	5	1.076	0.2996	9	
Akdeniz	348	8	1.606	0.205	9	
Doğu Anadolu	127	3	0.537	0.4637	9	
Güney Doğu Anadolu	50	1	3.718	0.0538	9	
Karadeniz	330	2	1.075	0.2998	9	
Marmara	419	4	0.513	0.4737	9	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	14	4.925	0.0265	10	*
Ege	85	6	0.279	0.5974	10	
Akdeniz	348	11	0.041	0.84	10	
Doğu Anadolu	127	8	0.043	0.8364	10	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.033	0.8549	10	
Karadeniz	330	21	0.29	0.5905	10	
Marmara	419	23	0.136	0.7125	10	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	11	0.201	0.6536	11	
Ege	85	3	0.216	0.6425	11	
Akdeniz	348	18	0.067	0.7962	11	
Doğu Anadolu	127	5	0.001	0.9807	11	
Güney Doğu Anadolu	50	0	1.231	0.2672	11	
Karadeniz	330	10	2.336	0.1264	11	
Marmara	419	18	0.16	0.6892	11	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	9	1.152	0.2831	12	
Ege	85	1	1.564	0.2111	12	
Akdeniz	348	8	0.741	0.3893	12	
Doğu Anadolu	127	2	0.386	0.5346	12	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.583	0.4451	12	
Karadeniz	330	5	1.636	0.2009	12	
Marmara	419	14	0.138	0.7102	12	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	10	0.182	0.6697	13	
Ege	85	1	1.692	0.1934	13	

Akdeniz	348	7	0.291	0.5893	13	
Doğu Anadolu	127	1	1.453	0.2281	13	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.291	0.5898	13	
Karadeniz	330	4	1.749	0.186	13	
Marmara	419	13	0.002	0.9609	13	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	16	0.092	0.7617	14	
Ege	85	0	0.07	0.7913	14	
Akdeniz	348	8	0.114	0.7352	14	
Doğu Anadolu	127	2	1.073	0.3003	14	
Güney Doğu Anadolu	50	0	1.073	0.3002	14	
Karadeniz	330	9	3.747	0.0529	14	
Marmara	419	10	0.314	0.575	14	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	9	0.045	0.8313	15	
Ege	85	6	0.897	0.3436	15	
Akdeniz	348	12	0.003	0.9565	15	
Doğu Anadolu	127	3	0.031	0.8592	15	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.14	0.7086	15	
Karadeniz	330	12	0.405	0.5243	15	
Marmara	419	15	0.012	0.9141	15	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	7	0.052	0.8197	16	
Ege	85	2	3.088	0.0789	16	
Akdeniz	348	14	0.144	0.7044	16	
Doğu Anadolu	127	1	1.055	0.3044	16	
Güney Doğu Anadolu	50	0	2.686	0.1012	16	
Karadeniz	330	7	4.526	0.0334	16	*
Marmara	419	6	3.328	0.0681	16	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	7	0.251	0.6165	17	
Ege	85	1	0.326	0.5679	17	
Akdeniz	348	7	0.528	0.4674	17	
Doğu Anadolu	127	3	0.472	0.492	17	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.001	0.97	17	
Karadeniz	330	5	1.824	0.1769	17	
Marmara	419	8	0.438	0.5082	17	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	5	0.115	0.7343	18	
Ege	85	0	2.029	0.1543	18	
Akdeniz	348	11	0.009	0.924	18	
Doğu Anadolu	127	3	1.752	0.1856	18	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.275	0.6	18	
Karadeniz	330	6	0.113	0.7371	18	
Marmara	419	6	0.438	0.5081	18	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	8	0.29	0.5902	19	
Ege	85	2	0.84	0.3593	19	
Akdeniz	348	13	1.955	0.1621	19	
Doğu Anadolu	127	5	0.387	0.5341	19	

Güney Doğu Anadolu	50	3	0.688	0.4068	19	
Karadeniz	330	6	3.229	0.0723	19	
Marmara	419	7	8.448	0.0037	19	*
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	7	2.138	0.1437	20	
Ege	85	3	0.081	0.7753	20	
Akdeniz	348	7	0.057	0.8106	20	
Doğu Anadolu	127	1	1.922	0.1657	20	
Güney Doğu Anadolu	50	2	0.241	0.6238	20	
Karadeniz	330	4	3.395	0.0654	20	
Marmara	419	8	0.209	0.6472	20	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	9	0.015	0.9034	21	
Ege	85	4	2.631	0.1048	21	
Akdeniz	348	14	0.054	0.8154	21	
Doğu Anadolu	127	10	1.7	0.1922	21	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.946	0.3308	21	
Karadeniz	330	13	0.014	0.9063	21	
Marmara	419	7	0.026	0.8721	21	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	11	6.469	0.011	22	*
Ege	85	1	0.008	0.9294	22	
Akdeniz	348	15	0.025	0.874	22	
Doğu Anadolu	127	5	0.078	0.7802	22	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.077	0.7814	22	
Karadeniz	330	9	1.856	0.1731	22	
Marmara	419	9	0.471	0.4925	22	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	10	0.525	0.4688	23	
Ege	85	0	0.003	0.9561	23	
Akdeniz	348	19	5.732	0.0167	23	*
Doğu Anadolu	127	6	0.159	0.6905	23	
Güney Doğu Anadolu	50	3	2.626	0.1051	23	
Karadeniz	330	9	0.007	0.9352	23	
Marmara	419	23	1.268	0.2601	23	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	16	0.019	0.8892	24	
Ege	85	1	2.421	0.1197	24	
Akdeniz	348	21	1.424	0.2327	24	
Doğu Anadolu	127	3	1.385	0.2392	24	
Güney Doğu Anadolu	50	0	1.675	0.1957	24	
Karadeniz	330	6	0.665	0.4148	24	
Marmara	419	11	0.102	0.7493	24	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	27	0.024	0.8768	25	
Ege	85	10	0.178	0.6731	25	
Akdeniz	348	47	0.568	0.4511	25	
Doğu Anadolu	127	5	0.014	0.9052	25	
Güney Doğu Anadolu	50	1	1.39	0.2384	25	
Karadeniz	330	30	1.204	0.2725	25	

Marmara	419	31	0.938	0.3327	25	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	15	0.053	0.8172	26	
Ege	85	6	2.62	0.1055	26	
Akdeniz	348	16	0.101	0.75	26	
Doğu Anadolu	127	8	0.634	0.426	26	
Güney Doğu Anadolu	50	2	0.154	0.6943	26	
Karadeniz	330	10	1.272	0.2595	26	
Marmara	419	16	0.693	0.4051	26	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	6	3.369	0.0664	27	
Ege	85	2	1.814	0.178	27	
Akdeniz	348	22	0.15	0.6986	27	
Doğu Anadolu	127	1	0.026	0.8716	27	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.281	0.5963	27	
Karadeniz	330	8	2.256	0.1331	27	
Marmara	419	7	0.209	0.6474	27	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	19	0.431	0.5113	28	
Ege	85	7	0.027	0.869	28	
Akdeniz	348	24	0.646	0.4216	28	
Doğu Anadolu	127	11	0.029	0.8655	28	
Güney Doğu Anadolu	50	2	0.001	0.9783	28	
Karadeniz	330	9	1.578	0.209	28	
Marmara	419	10	0.844	0.3581	28	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	7	0.065	0.7987	29	
Ege	85	2	0.17	0.6798	29	
Akdeniz	348	12	0.811	0.3679	29	
Doğu Anadolu	127	6	0.001	0.9763	29	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.368	0.5439	29	
Karadeniz	330	6	1.323	0.25	29	
Marmara	419	5	2.028	0.1544	29	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	14	0.256	0.613	30	
Ege	85	5	0.55	0.4581	30	
Akdeniz	348	8	0.123	0.7258	30	
Doğu Anadolu	127	1	0.637	0.4247	30	
Güney Doğu Anadolu	50	0	1.039	0.308	30	
Karadeniz	330	5	0	0.9917	30	
Marmara	419	12	0	0.9836	30	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	8	0.409	0.5226	31	
Ege	85	2	1.635	0.201	31	
Akdeniz	348	12	0.922	0.337	31	
Doğu Anadolu	127	4	0.309	0.5782	31	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.009	0.923	31	
Karadeniz	330	4	0.881	0.348	31	
Marmara	419	9	0.237	0.6263	31	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**

İç Anadolu	386	18	0.062	0.8041	32	
Ege	85	6	0.043	0.8366	32	
Akdeniz	348	20	0.017	0.8967	32	
Doğu Anadolu	127	6	0.013	0.9104	32	
Güney Doğu Anadolu	50	1	2.902	0.0885	32	
Karadeniz	330	20	1.433	0.2312	32	
Marmara	419	18	0.109	0.741	32	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	17	0.077	0.7808	33	
Ege	85	3	5.216	0.0224	33	*
Akdeniz	348	8	0.257	0.6122	33	
Doğu Anadolu	127	3	1.108	0.2926	33	
Güney Doğu Anadolu	50	0	2.986	0.084	33	
Karadeniz	330	4	0.985	0.321	33	
Marmara	419	8	0.762	0.3826	33	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	7	0.785	0.3757	34	
Ege	85	3	0.175	0.6755	34	
Akdeniz	348	9	2.104	0.1469	34	
Doğu Anadolu	127	4	1.026	0.311	34	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.19	0.6632	34	
Karadeniz	330	6	0.382	0.5364	34	
Marmara	419	8	0.756	0.3845	34	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	21	0.091	0.7635	35	
Ege	85	9	1.038	0.3082	35	
Akdeniz	348	19	0.842	0.3588	35	
Doğu Anadolu	127	1	0.132	0.7164	35	
Güney Doğu Anadolu	50	2	0.022	0.8816	35	
Karadeniz	330	11	0.149	0.6994	35	
Marmara	419	11	1.823	0.177	35	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	25	0.107	0.7439	36	
Ege	85	7	0.512	0.4741	36	
Akdeniz	348	23	0.033	0.8551	36	
Doğu Anadolu	127	6	0.679	0.4099	36	
Güney Doğu Anadolu	50	4	1.45	0.2286	36	
Karadeniz	330	16	0.626	0.4289	36	
Marmara	419	15	0.441	0.5068	36	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	14	2.322	0.1276	37	
Ege	85	3	0.196	0.6581	37	
Akdeniz	348	26	0.009	0.923	37	
Doğu Anadolu	127	5	0.051	0.821	37	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.931	0.3347	37	
Karadeniz	330	13	0.033	0.8553	37	
Marmara	419	14	0.556	0.4558	37	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	15	0.66	0.4164	38	
Ege	85	2	2.069	0.1503	38	

Akdeniz	348	19	0.01	0.9205	38	
Doğu Anadolu	127	7	0.03	0.8624	38	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.419	0.5173	38	
Karadeniz	330	19	0.541	0.4619	38	
Marmara	419	15	0.85	0.3566	38	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	9	0.284	0.5944	39	
Ege	85	3	0.041	0.8388	39	
Akdeniz	348	19	0.702	0.402	39	
Doğu Anadolu	127	9	0	0.9916	39	
Güney Doğu Anadolu	50	2	5.689	0.0171	39	*
Karadeniz	330	12	3.467	0.0626	39	
Marmara	419	15	0.047	0.8286	39	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	12	1.305	0.2532	40	
Ege	85	2	3.923	0.0476	40	*
Akdeniz	348	14	0.325	0.5688	40	
Doğu Anadolu	127	3	0.995	0.3184	40	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.694	0.4047	40	
Karadeniz	330	12	0.024	0.8768	40	
Marmara	419	14	0.032	0.8586	40	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	17	0.315	0.5749	41	
Ege	85	6	0.001	0.9775	41	
Akdeniz	348	16	0.68	0.4097	41	
Doğu Anadolu	127	5	0.213	0.644	41	
Güney Doğu Anadolu	50	3	0.302	0.5826	41	
Karadeniz	330	10	0.004	0.9518	41	
Marmara	419	11	0.065	0.7994	41	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	12	4.614	0.0317	42	*
Ege	85	3	0.927	0.3357	42	
Akdeniz	348	17	0.796	0.3722	42	
Doğu Anadolu	127	2	8.229	0.0041	42	*
Güney Doğu Anadolu	50	1	1.858	0.1729	42	
Karadeniz	330	9	3.308	0.0689	42	
Marmara	419	9	1.289	0.2562	42	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	17	0.033	0.8558	43	
Ege	85	5	0.159	0.6898	43	
Akdeniz	348	22	0.072	0.7889	43	
Doğu Anadolu	127	5	0.052	0.8193	43	
Güney Doğu Anadolu	50	2	4.275	0.0387	43	*
Karadeniz	330	14	2.005	0.1568	43	
Marmara	419	14	1.637	0.2008	43	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	22	1.334	0.2481	44	
Ege	85	2	1.31	0.2524	44	
Akdeniz	348	26	1.483	0.2233	44	
Doğu Anadolu	127	5	1.348	0.2456	44	

Güney Doğu Anadolu	50	0	0.065	0.7992	44	
Karadeniz	330	7	2.029	0.1544	44	
Marmara	419	17	0.99	0.3197	44	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	20	0.104	0.7471	45	
Ege	85	7	0.125	0.724	45	
Akdeniz	348	20	1.622	0.2028	45	
Doğu Anadolu	127	4	0.074	0.7853	45	
Güney Doğu Anadolu	50	1	1.924	0.1654	45	
Karadeniz	330	13	0.504	0.4778	45	
Marmara	419	26	0.377	0.5394	45	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	12	0.945	0.331	46	
Ege	85	5	0.114	0.7357	46	
Akdeniz	348	15	0.126	0.7227	46	
Doğu Anadolu	127	1	0.772	0.3795	46	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.157	0.692	46	
Karadeniz	330	16	0.071	0.7897	46	
Marmara	419	8	0.02	0.8863	46	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	21	0.207	0.6494	47	
Ege	85	4	0.084	0.7723	47	
Akdeniz	348	34	1.025	0.3113	47	
Doğu Anadolu	127	16	0.176	0.6744	47	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.038	0.8452	47	
Karadeniz	330	16	0.096	0.7561	47	
Marmara	419	24	0.176	0.6751	47	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	13	0.058	0.8092	48	
Ege	85	1	0.084	0.7721	48	
Akdeniz	348	20	0.963	0.3264	48	
Doğu Anadolu	127	3	0.028	0.8674	48	
Güney Doğu Anadolu	50	2	1.091	0.2963	48	
Karadeniz	330	10	0.125	0.7235	48	
Marmara	419	13	0.829	0.3625	48	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	14	0.083	0.7726	49	
Ege	85	3	0.214	0.6434	49	
Akdeniz	348	18	0.623	0.4301	49	
Doğu Anadolu	127	1	0.04	0.8421	49	
Güney Doğu Anadolu	50	3	1.615	0.2038	49	
Karadeniz	330	9	0.017	0.8968	49	
Marmara	419	11	0.348	0.5551	49	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	18	0.105	0.7461	50	
Ege	85	9	0.136	0.712	50	
Akdeniz	348	23	0.309	0.5786	50	
Doğu Anadolu	127	8	0.302	0.5829	50	
Güney Doğu Anadolu	50	1	1.622	0.2028	50	
Karadeniz	330	7	0.085	0.7711	50	

Marmara	419	17	0.279	0.5971	50	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	7	0.005	0.9424	51	
Ege	85	4	0.053	0.8186	51	
Akdeniz	348	11	0.753	0.3854	51	
Doğu Anadolu	127	4	0	0.9928	51	
Güney Doğu Anadolu	50	1	1.622	0.2028	51	
Karadeniz	330	10	0.02	0.8871	51	
Marmara	419	10	0.008	0.9306	51	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	10	0.068	0.7937	52	
Ege	85	2	0.004	0.9488	52	
Akdeniz	348	13	1.462	0.2266	52	
Doğu Anadolu	127	3	0.001	0.9716	52	
Güney Doğu Anadolu	50	1	1.622	0.2028	52	
Karadeniz	330	4	0.046	0.8307	52	
Marmara	419	11	0.287	0.592	52	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	5	1.45	0.2285	53	
Ege	85	1	0.603	0.4374	53	
Akdeniz	348	10	0.024	0.8758	53	
Doğu Anadolu	127	2	2.952	0.0857	53	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.891	0.3452	53	
Karadeniz	330	3	2.182	0.1396	53	
Marmara	419	8	0.351	0.5538	53	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	7	0.059	0.8077	54	
Ege	85	3	0.504	0.4778	54	
Akdeniz	348	9	1.606	0.2051	54	
Doğu Anadolu	127	4	1.304	0.2536	54	
Güney Doğu Anadolu	50	3	0.001	0.9734	54	
Karadeniz	330	14	0.072	0.7891	54	
Marmara	419	7	2.571	0.1088	54	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	9	0.019	0.8889	55	
Ege	85	1	0.62	0.431	55	
Akdeniz	348	21	2.627	0.1051	55	
Doğu Anadolu	127	2	0	0.9867	55	
Güney Doğu Anadolu	50	1	1.157	0.2821	55	
Karadeniz	330	7	0.329	0.5662	55	
Marmara	419	18	2.287	0.1305	55	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	10	3.194	0.0739	56	
Ege	85	5	0.316	0.5743	56	
Akdeniz	348	14	0.003	0.9529	56	
Doğu Anadolu	127	4	0.409	0.5227	56	
Güney Doğu Anadolu	50	1	1.242	0.2651	56	
Karadeniz	330	7	0.594	0.441	56	
Marmara	419	9	2.334	0.1266	56	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**

İç Anadolu	386	22	2.373	0.1234	57	
Ege	85	2	1.031	0.31	57	
Akdeniz	348	22	0.63	0.4273	57	
Doğu Anadolu	127	10	0.868	0.3514	57	
Güney Doğu Anadolu	50	3	4.058	0.044	57	*
Karadeniz	330	16	1.185	0.2764	57	
Marmara	419	22	0.144	0.7048	57	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	5	2.377	0.1232	58	
Ege	85	3	1.517	0.2181	58	
Akdeniz	348	15	0.176	0.6748	58	
Doğu Anadolu	127	2	0.183	0.669	58	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.015	0.901	58	
Karadeniz	330	7	1.037	0.3086	58	
Marmara	419	11	0.307	0.5793	58	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	8	0.001	0.9785	59	
Ege	85	2	1.888	0.1695	59	
Akdeniz	348	14	1.629	0.2019	59	
Doğu Anadolu	127	3	0.078	0.7794	59	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.666	0.4145	59	
Karadeniz	330	9	4.309	0.0379	59	*
Marmara	419	9	0.011	0.9174	59	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	14	0.034	0.8548	60	
Ege	85	4	0.114	0.7359	60	
Akdeniz	348	22	3.052	0.0806	60	
Doğu Anadolu	127	6	0.002	0.961	60	
Güney Doğu Anadolu	50	4	1.215	0.2704	60	
Karadeniz	330	7	0.551	0.4581	60	
Marmara	419	15	0.068	0.7949	60	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	8	0.181	0.6704	61	
Ege	85	1	1.339	0.2472	61	
Akdeniz	348	12	0.003	0.9529	61	
Doğu Anadolu	127	2	0.021	0.8842	61	
Güney Doğu Anadolu	50	0	1.025	0.3114	61	
Karadeniz	330	6	1.276	0.2586	61	
Marmara	419	9	0.997	0.3181	61	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	9	1.664	0.197	62	
Ege	85	2	0.007	0.9317	62	
Akdeniz	348	16	0.012	0.9134	62	
Doğu Anadolu	127	3	0.849	0.3568	62	
Güney Doğu Anadolu	50	2	1.505	0.2199	62	
Karadeniz	330	6	2.531	0.1117	62	
Marmara	419	11	0.549	0.4587	62	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	10	5.583	0.0181	63	*
Ege	85	4	1.054	0.3045	63	

Akdeniz	348	25	0.535	0.4644	63	
Doğu Anadolu	127	6	0.697	0.4038	63	
Güney Doğu Anadolu	50	2	3.713	0.054	63	
Karadeniz	330	15	0.024	0.8777	63	
Marmara	419	12	0.362	0.5473	63	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	6	3.673	0.0553	64	
Ege	85	3	3.23	0.0723	64	
Akdeniz	348	20	1.727	0.1888	64	
Doğu Anadolu	127	3	0.003	0.9578	64	
Güney Doğu Anadolu	50	2	0.451	0.5018	64	
Karadeniz	330	14	0.495	0.4816	64	
Marmara	419	8	0.758	0.384	64	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	11	0.605	0.4367	65	
Ege	85	9	2.179	0.1399	65	
Akdeniz	348	24	0.014	0.9067	65	
Doğu Anadolu	127	4	2.242	0.1343	65	
Güney Doğu Anadolu	50	2	0.562	0.4533	65	
Karadeniz	330	11	2.933	0.0868	65	
Marmara	419	14	0.076	0.7832	65	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	9	0.196	0.6576	66	
Ege	85	5	1.053	0.3049	66	
Akdeniz	348	13	0.05	0.8239	66	
Doğu Anadolu	127	1	1.298	0.2545	66	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.424	0.515	66	
Karadeniz	330	9	4.419	0.0355	66	*
Marmara	419	11	1.811	0.1784	66	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	2	0.135	0.7138	67	
Ege	85	3	3.224	0.0726	67	
Akdeniz	348	12	0.578	0.4471	67	
Doğu Anadolu	127	1	0.038	0.8463	67	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.024	0.8778	67	
Karadeniz	330	7	0	0.9916	67	
Marmara	419	13	0.205	0.6504	67	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	8	0.267	0.6055	68	
Ege	85	3	0.065	0.7983	68	
Akdeniz	348	7	0.253	0.6152	68	
Doğu Anadolu	127	3	0.381	0.5369	68	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.142	0.7059	68	
Karadeniz	330	6	2.597	0.1071	68	
Marmara	419	8	0.011	0.9167	68	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	6	0.226	0.6342	69	
Ege	85	3	0.102	0.7494	69	
Akdeniz	348	10	0.955	0.3285	69	
Doğu Anadolu	127	5	2.208	0.1373	69	

Güney Doğu Anadolu	50	0	0.029	0.8645	69	
Karadeniz	330	9	0.82	0.3653	69	
Marmara	419	13	0.057	0.8119	69	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	21	0.267	0.6052	70	
Ege	85	4	0.537	0.4638	70	
Akdeniz	348	11	1.021	0.3123	70	
Doğu Anadolu	127	10	0.717	0.397	70	
Güney Doğu Anadolu	50	2	2.163	0.1414	70	
Karadeniz	330	11	0.428	0.5127	70	
Marmara	419	18	0.883	0.3473	70	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	8	4.639	0.0313	71	*
Ege	85	5	0.006	0.9403	71	
Akdeniz	348	15	0.196	0.6581	71	
Doğu Anadolu	127	6	3.554	0.0594	71	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.283	0.595	71	
Karadeniz	330	4	0.059	0.8083	71	
Marmara	419	6	0.105	0.7461	71	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	10	0.231	0.6305	72	
Ege	85	2	0.026	0.8725	72	
Akdeniz	348	10	3.788	0.0516	72	
Doğu Anadolu	127	8	0.025	0.8753	72	
Güney Doğu Anadolu	50	1	0.013	0.9081	72	
Karadeniz	330	8	0.142	0.7065	72	
Marmara	419	5	2.571	0.1088	72	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	9	0.59	0.4426	73	
Ege	85	4	0.531	0.4662	73	
Akdeniz	348	12	0.035	0.8516	73	
Doğu Anadolu	127	2	3.567	0.0589	73	
Güney Doğu Anadolu	50	2	3.036	0.0815	73	
Karadeniz	330	7	5.169	0.023	73	*
Marmara	419	16	0.232	0.6302	73	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	9	0.446	0.5044	74	
Ege	85	5	5.503	0.019	74	*
Akdeniz	348	22	2.56	0.1096	74	
Doğu Anadolu	127	7	0.686	0.4075	74	
Güney Doğu Anadolu	50	2	1.78	0.1822	74	
Karadeniz	330	7	0.872	0.3503	74	
Marmara	419	11	0.037	0.847	74	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	6	0.023	0.8798	75	
Ege	85	3	2.267	0.1322	75	
Akdeniz	348	10	1.679	0.1951	75	
Doğu Anadolu	127	2	1.607	0.2049	75	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.292	0.5891	75	
Karadeniz	330	11	2.359	0.1245	75	

Marmara	419	9	0	0.9877	75	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	11	3.001	0.0832	76	
Ege	85	3	0.742	0.3889	76	
Akdeniz	348	14	0.613	0.4336	76	
Doğu Anadolu	127	2	0.177	0.6739	76	
Güney Doğu Anadolu	50	3	0.249	0.618	76	
Karadeniz	330	11	2.271	0.1318	76	
Marmara	419	18	3.484	0.062	76	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	8	2.81	0.0937	77	
Ege	85	4	3.447	0.0634	77	
Akdeniz	348	17	0.002	0.9668	77	
Doğu Anadolu	127	4	0.919	0.3376	77	
Güney Doğu Anadolu	50	0	0.554	0.4567	77	
Karadeniz	330	8	0.087	0.7683	77	
Marmara	419	13	0.211	0.6461	77	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	17	1.8	0.1797	78	
Ege	85	5	0.244	0.6214	78	
Akdeniz	348	19	1.615	0.2037	78	
Doğu Anadolu	127	6	0.086	0.7688	78	
Güney Doğu Anadolu	50	3	0.05	0.823	78	
Karadeniz	330	16	0	0.9891	78	
Marmara	419	21	0.728	0.3936	78	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	15	3.538	0.06	79	
Ege	85	6	0.202	0.653	79	
Akdeniz	348	16	1.089	0.2966	79	
Doğu Anadolu	127	5	1.447	0.229	79	
Güney Doğu Anadolu	50	1	1.44	0.2301	79	
Karadeniz	330	14	0.01	0.92	79	
Marmara	419	24	0.712	0.3987	79	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	19	0.951	0.3293	80	
Ege	85	9	1.212	0.271	80	
Akdeniz	348	24	0.344	0.5574	80	
Doğu Anadolu	127	3	0	0.9982	80	
Güney Doğu Anadolu	50	2	5.484	0.0192	80	*
Karadeniz	330	9	0.395	0.5299	80	
Marmara	419	30	0.896	0.3439	80	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**
İç Anadolu	386	21	0.466	0.4948	81	
Ege	85	2	1.142	0.2853	81	
Akdeniz	348	20	1.719	0.1898	81	
Doğu Anadolu	127	7	2.293	0.13	81	
Güney Doğu Anadolu	50	1	1.268	0.2602	81	
Karadeniz	330	14	1.224	0.2686	81	
Marmara	419	22	0.01	0.9184	81	
Bölge	**n**	**n.miss**	**chi-sq**	**p-value**	**TNP**	**p<0.05**

İç Anadolu	386	158	1.13	0.2878	82	
Ege	85	31	0.544	0.4608	82	
Akdeniz	348	147	0.732	0.3922	82	
Doğu Anadolu	127	51	1.085	0.2976	82	
Güney Doğu Anadolu	50	17	1.229	0.2675	82	
Karadeniz	330	135	0.007	0.932	82	
Marmara	419	190	2.285	0.1306	82	
***p değeri anlamlı sonuç (p<0.05)**						
Stratifikasyon nedeni ile dışlandı						

Türkiye geneli 82 TNP arasından Ki kare testi anlamlı (p<0.05) bulunan TNP'LER Allel ve Genotip Frekans Sonuçları, OR değerleri

TNP3	G:G	G:A	A:A
Çalışma	24	232	744
Kontrol	11	189	734
TNP3	**G**	**A**	
Çalışma	280	1720	
Kontrol	211	1657	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.056	1.278	1.547

TNP9	G:G	G:A	A:A
Çalışma	334	487	174
Kontrol	296	418	218
TNP9	**G**	**A**	
Çalışma	1155	835	
Kontrol	1010	854	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.03	1.17	1.328

TNP19	G:G	G:A	A:A
Çalışma	127	419	444
Kontrol	142	451	335
TNP19	**G**	**A**	
Çalışma	673	1307	
Kontrol	735	1121	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.689	0.785	0.896

TNP22	C:C	T:C	T:T
Çalışma	41	355	583
Kontrol	70	337	525
TNP22	**C**	**T**	
Çalışma	437	1521	
Kontrol	477	1387	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.72	0.835	0.969

TNP73	G:G	G:C	C:C
Çalışma	48	327	611
Kontrol	55	337	533
TNP73	**G**	**C**	
Çalışma	423	1549	
Kontrol	447	1403	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.737	0.857	0.997

TNP76	G:G	T:G	T:T
Çalışma	313	488	182
Kontrol	243	463	213
TNP76	**G**	**T**	
Çalışma	1114	852	
Kontrol	949	889	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.078	1.225	1.392

Doğum yeri bölgesine göre 82 TNP arasından Ki kare testi anlamlı bulunan (p<0.05) TNP'LER Allel ve Genotip Frekans Sonuçları, OR değerleri

TNP2-Doğu Anadolu Bölgesi			
TNP2	**C:C**	**T:C**	**T:T**
Çalışma	40	65	24
Kontrol	47	46	13
TNP2	**C**	**T**	
Çalışma	145	113	
Kontrol	140	72	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.453	0.66	0.961

TNP3-Karadeniz Bölgesi*			
TNP3	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	8	55	147
Kontrol	2	60	215
TNP3	**G**	**A**	
Çalışma	71	349	
Kontrol	64	490	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.082	1.558	2.243
fisher p-value: p	0.02347		

TNP9-Marmara Bölgesi			
TNP9	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	45	66	22
Kontrol	30	62	34
TNP9	**G**	**A**	
Çalışma	156	110	
Kontrol	122	130	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.068	1.511	2.139

TNP13-Güneydoğu Anadolu			
TNP13	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	16	32	11
Kontrol	27	25	7
TNP13	**G**	**A**	
Çalışma	64	54	
Kontrol	79	39	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.345	0.585	0.992

TNP13-Karadeniz Bölgesi			
TNP13	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	98	91	17
Kontrol	110	123	44
TNP13	**G**	**A**	
Çalışma	287	125	
Kontrol	343	211	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.077	1.412	1.852

TNP16-Marmara Bölgesi			
TNP16	**C:C**	**T:C**	**T:T**
Çalışma	7	38	87
Kontrol	14	43	71
TNP16	**C**	**T**	
Çalışma	52	212	
Kontrol	71	185	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.425	0.639	0.962

TNP19-Akdeniz Bölgesi			
TNP19	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	18	50	61
Kontrol	26	76	45
TNP19	**G**	**A**	
Çalışma	86	172	
Kontrol	128	166	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.458	0.648	0.917

TNP19-Doğu Anadolu Bölgesi			
TNP19	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	9	56	65
Kontrol	11	56	36
TNP19	**G**	**A**	
Çalışma	74	186	
Kontrol	78	128	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.442	0.653	0.964

TNP19-Karadeniz Bölgesi			
TNP19	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	24	88	95
Kontrol	47	128	100
TNP19	**G**	**A**	
Çalışma	136	278	
Kontrol	222	328	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.554	0.723	0.944

TNP22-İç Anadolu Bölgesi			
TNP22	**C:C**	**T:C**	**T:T**
Çalışma	8	76	115
Kontrol	16	56	70
TNP22	**C**	**T**	
Çalışma	92	306	
Kontrol	88	196	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.475	0.67	0.944

*TNP28-İç Anadolu Bölgesi			
TNP28	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	141	44	7
Kontrol	112	25	0
TNP28	**G**	**A**	
Çalışma	326	58	
Kontrol	249	25	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.343	0.564	0.928
fisher p-value:	0.02624		

TNP36-Doğu Anadolu Bölgesi			
TNP36	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	47	62	12
Kontrol	29	56	20
TNP36	**G**	**A**	
Çalışma	156	86	
Kontrol	114	96	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.047	1.528	2.23

*TNP38-Doğu Anadolu Bölgesi			
TNP38	**C:C**	**T:C**	**T:T**
Çalışma	29	25	0
Kontrol	46	12	0
TNP38	**C**	**T**	
Çalışma	83	25	
Kontrol	104	12	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.182	0.383	0.808
fisher p-value:	0.00497		

TNP39-İç Anadolu Bölgesi			
TNP39	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	123	61	12
Kontrol	107	30	5
TNP39	**G**	**A**	
Çalışma	307	85	
Kontrol	244	40	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.392	0.592	0.894

TNP39-Karadeniz Bölgesi			
TNP39	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	139	57	5
Kontrol	168	92	14
TNP39	**G**	**A**	
Çalışma	335	67	
Kontrol	428	120	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.006	1.402	1.953

TNP40-Marmara Bölgesi			
TNP40	**C:C**	**T:C**	**T:T**
Çalışma	67	56	6
Kontrol	58	51	19
TNP40	**C**	**T**	
Çalışma	190	68	
Kontrol	167	89	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.02	1.489	2.173

TNP59-Doğu Anadolu Bölgesi			
TNP59	**G:G**	**G:C**	**C:C**
Çalışma	49	58	19
Kontrol	59	39	5
TNP59	**G**	**C**	
Çalışma	156	96	
Kontrol	157	49	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.337	0.507	0.764

TNP59-Karadeniz Bölgesi			
TNP59	**G:G**	**G:C**	**C:C**
Çalışma	111	81	13
Kontrol	122	126	25
TNP59	**G**	**C**	
Çalışma	303	107	
Kontrol	370	176	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.014	1.347	1.79

TNP61-Karadeniz Bölgesi			
TNP61	**C:C**	**T:C**	**T:T**
Çalışma	25	89	94
Kontrol	41	139	95
TNP61	**C**	**T**	
Çalışma	139	277	
Kontrol	221	329	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.573	0.747	0.974

TNP61-Marmara Bölgesi			
TNP61	**C:C**	**T:C**	**T:T**
Çalışma	26	63	41
Kontrol	15	58	53
TNP61	**C**	**T**	
Çalışma	115	145	
Kontrol	88	164	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.035	1.478	2.111

TNP63-İç Anadolu Bölgesi			
TNP63	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	115	67	15
Kontrol	62	66	13
TNP63	**G**	**A**	
Çalışma	297	97	
Kontrol	190	92	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	1.057	1.483	2.08

**TNP64-İç Anadolu Bölgesi			
TNP64	**G:G**	**G:C**	**C:C**
Çalışma	99	89	14
Kontrol	55	72	15
TNP64	**G**	**C**	
Çalışma	287	117	
Kontrol	182	102	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.994	1.375	1.901
CA p value:	0.0446		

TNP64-Akdeniz Bölgesi			
TNP64	**G:G**	**G:C**	**C:C**
Çalışma	57	52	21
Kontrol	79	49	15
TNP64	**G**	**C**	
Çalışma	166	94	
Kontrol	207	79	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.469	0.674	0.968

TNP71-Doğu Anadolu Bölgesi			
TNP71	**C:C**	**T:C**	**T:T**
Çalışma	22	22	82
Kontrol	25	29	51
TNP71	**C**	**T**	
Çalışma	66	186	
Kontrol	79	131	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.396	0.588	0.874

TNP72-Akdeniz Bölgesi			
TNP72	**G:G**	**G:A**	**A:A**
Çalışma	21	13	100
Kontrol	28	32	86
TNP72	**G**	**A**	
Çalışma	55	213	
Kontrol	88	204	
	LowerCI	**OR**	**UpperCI**
	0.406	0.599	0.882

*5'ten küçük beklenen değer belirlendiğinden Fisher testi yapılmıştır.

**p:0.05'e yakın ancak anlamlı değerler.

İkamet yeri bölgesine göre 82 TNP arasından Ki kare testi anlamlı bulunan (p<0.05) TNP'LER Allel ve Genotip Frekans Sonuçları, OR değerleri

TNP2-Karadeniz Bölgesi			
TNP2	C:C	T:C	T:T
Çalışma	47	68	28
Kontrol	78	84	23
TNP2	C	T	
Çalışma	162	124	
Kontrol	240	130	
	LowerCI	OR	UpperCI
	0.516	0.708	0.971

*TNP4-Güney Doğu Anadolu Bölgesi			
TNP4	C:C	T:C	T:T
Çalışma	17	5	2
Kontrol	8	15	2
TNP4	C	T	
Çalışma	39	9	
Kontrol	31	19	
	LowerCI	OR	UpperCI
	1.056	2.656	6.683
fisher p-value:	0.01007		

TNP8-Akdeniz Bölgesi			
TNP8	T:T	T:A	A:A
Çalışma	18	62	64
Kontrol	18	62	108
TNP8	T	A	
Çalışma	98	190	
Kontrol	98	278	
	LowerCI	OR	UpperCI
	1.046	1.463	2.046

TNP10-İç Anadolu Bölgesi			
TNP10	G:G	G:A	A:A
Çalışma	13	68	116
Kontrol	5	50	120
TNP10	G	A	
Çalışma	94	300	
Kontrol	60	290	
	LowerCI	OR	UpperCI
	1.055	1.514	2.175

TNP16- Karadeniz Bölgesi			
TNP16	C:C	T:C	T:T
Çalışma	8	28	103
Kontrol	13	59	112
TNP16	C	T	
Çalışma	44	234	
Kontrol	85	283	
	LowerCI	OR	UpperCI
	0.418	0.626	0.937

TNP19-Marmara Bölgesi			
TNP19	G:G	G:A	A:A
Çalışma	22	93	103
Kontrol	33	94	67
TNP19	G	A	
Çalışma	137	299	
Kontrol	160	228	
	LowerCI	OR	UpperCI
	0.491	0.653	0.869

TNP22-İç Anadolu Bölgesi			
TNP22	C:C	T:C	T:T
Çalışma	13	68	121
Kontrol	19	72	82
TNP22	C	T	
Çalışma	94	310	
Kontrol	110	236	
	LowerCI	OR	UpperCI
	0.471	0.651	0.899

TNP23- Akdeniz Bölgesi			
TNP23	C:C	T:C	T:T
Çalışma	11	60	74
Kontrol	27	83	74
TNP23	C	T	
Çalışma	82	208	
Kontrol	137	231	
	LowerCI	OR	UpperCI
	0.477	0.665	0.926

*TNP33-Ege Bölgesi			
TNP33	C:C	T:C	T:T
Çalışma	31	19	6
Kontrol	6	16	4
TNP33	C	T	
Çalışma	81	31	
Kontrol	28	24	
	LowerCI	OR	UpperCI
	1.129	2.24	4.441
fisher p value:	0.01815		

TNP39-Güney Doğu Bölgesi			
TNP39	G:G	G:A	A:A
Çalışma	11	13	0
Kontrol	19	5	0
TNP39	G	A	
Çalışma	35	13	
Kontrol	43	5	
	LowerCI	OR	UpperCI
	0.102	0.313	0.963

TNP42- İç Anadolu Bölgesi			
TNP42	C:C	C:A	A:A
Çalışma	11	72	116
Kontrol	7	46	122
TNP42	C	A	
Çalışma	94	304	
Kontrol	60	290	
	LowerCI	OR	UpperCI
	1.041	1.495	2.146

*TNP42- Doğu Anadolu Bölgesi			
TNP42	C:C	C:A	A:A
Çalışma	1	12	62
Kontrol	3	17	30
TNP42	C	A	
Çalışma	14	136	
Kontrol	23	77	
	LowerCI	OR	UpperCI
	0.168	0.345	0.709
fisher p value:	0.01188		

TNP59- Karadeniz Bölgesi			
TNP59	G:G	G:C	C:C
Çalışma	78	54	9
Kontrol	80	81	19
TNP59	G	C	
Çalışma	210	72	
Kontrol	241	119	
	LowerCI	OR	UpperCI
	1.019	1.44	2.036

TNP63- İç Anadolu Bölgesi			
TNP63	G:G	G:A	A:A
Çalışma	121	67	15
Kontrol	80	76	17
TNP63	G	A	
Çalışma	309	97	
Kontrol	236	110	
	LowerCI	OR	UpperCI
	1.077	1.485	2.047

TNP71- İç Anadolu Bölgesi			
TNP71	C:C	T:C	T:T
Çalışma	45	29	128
Kontrol	51	35	90
TNP71	C	T	
Çalışma	119	285	
Kontrol	137	215	
	LowerCI	OR	UpperCI
	0.484	0.655	0.887

TNP73-Karadeniz Bölgesi			
TNP73	G:G	G:C	C:C
Çalışma	9	41	89
Kontrol	16	76	92
TNP73	G	C	
Çalışma	59	219	
Kontrol	108	260	
	LowerCI	OR	UpperCI
	0.45	0.649	0.934

TNP74- Ege Bölgesi			
TNP74	G:G	G:A	A:A
Çalışma	25	24	5
Kontrol	5	16	5
TNP74	G	A	
Çalışma	74	34	
Kontrol	26	26	
	LowerCI	OR	UpperCI
	1.104	2.176	4.29

*5'ten küçük beklenen değer belirlendiğinden Fisher testi yapılmıştır.

HaploReg v4.1

HaploReg is a tool for exploring annotations of the noncoding genome at variants on haplotype blocks, such as candidate regulatory SNPs at disease-associated loci. Using LD information from the 1000 Genomes Project, linked SNPs and small indels can be visualized along with chromatin state and protein binding annotation from the Roadmap Epigenomics and ENCODE projects, sequence conservation across mammals, the effect of SNPs on regulatory motifs, and the effect of SNPs on expression from eQTL studies. HaploReg is designed for researchers developing mechanistic hypotheses of the impact of non-coding variants on clinical phenotypes and normal variation.

Update 2015.11.05: Version 4.1 GWAS and eQTL have been updated; a simpler pruning strategy is applied when combining GWAS; and links out to other NHGRI/EBI GWAS hits and GRASP QTL hits are provided.

Update 2015.09.15: Version 4.0 now includes many recent eQTL results including the GTEx pilot, four different options for defining enhancers using Roadmap Epigenomics data, and a complete set of source files for download and local analysis. Older versions available: v3, v2, v1.

- Build Query
- Set Options
- Documentation

Build Query

Use one of the three methods below to enter a set of variants. If an r² threshold is specified (see the Set Options tab), results for each variant will be shown in a separate table along with other variants in LD. If r² is set to NA, only queried variants will be shown, together in one table.

Query (comma-delimited list of rsIDs OR a single region as chrN:start-end):

or, upload a text file (one refSNP ID per line): Dosya Seç Dosya seçilmedi

or, select a GWAS:

Set Options

LD threshold, r² (select NA to only show query variants): 0.8

1000G Phase 1 population for LD calculation: AFR AMR ASN EUR

Source for epigenomes: ChromHMM (Core 15-state model)

Mammalian conservation algorithm: GERP SiPhy-omega both

Show position relative to: GENCODE genes RefSeq genes both

Condense lists in table longer than: 4

Condense indel oligos longer than: 6

Output mode: HTML Text

Documentation

For details on data sources and methods along with usage examples, see the full documentation (opens in a pop-up window.)

The HaploReg database and web interface were produced by Luke Ward in the Kellis Lab at MIT. HaploReg is hosted by the Broad Institute.

To cite HaploReg, please refer to our publication in Nucleic Acids Research: HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. (PMID:22064851).

The underlying data are available in the following directory.

Contact: luke@lukeward.net

Gönder

Query SNP: rs635833 and variants with r^2 >= 0.8

chr	pos (hg38)	LD (r^2)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNAse	Proteins bound	Motifs changed	NHGRI/EBI GWAS hits	GRASP QTL hits	Selected eQTL hits	RefSeq genes	dbSNP func annot
1	56912137	1	1	rs635833	C	T	0.92	0.90	0.92	0.87			ESDR, LIV, GI			Cart1,Hoxa5		2 hits		C8A	intronic
1	56912740	1	1	rs623077	T	C	0.92	0.90	0.92	0.87			LIV			AP-1,LBP-1,SMC3				C8A	intronic
1	56920723	0.96	0.98	rs706480	A	G	0.92	0.90	0.92	0.87			8 tissues	6 tissues		12 altered motifs				2.5kb 3' of C8A	
		0.94	0.98	rs147415061	C	CATA	0.92	0.90	0.92	0.86			5 tissues			15 altered motifs				3.8kb 3' of C8B	
1	56929578	0.92	0.97	rs605648	T	C	0.80	0.89	0.92	0.86			LIV			FXR,Foxk1,Pbx-1		2 hits		C8B	intronic
1	56933949	0.92	0.97	rs652553	T	C	0.92	0.90	0.92	0.86			IPSC, FAT, SKIN			NRSF				C8B	intronic
1	56934902	0.92	0.97	rs676480	A	C	0.78	0.89	0.92	0.86		FAT	8 tissues	SKIN,SKIN,MUS,SKIN		6 altered motifs				C8B	intronic
1	56939066	0.92	0.97	rs669358	C	T	0.92	0.90	0.92	0.86			ESC, ESDR, IPSC, BRN					2 hits		C8B	intronic
1	56942261	0.91	0.97	rs10536989	CTAAG	C	0.78	0.89	0.92	0.86						Foxc1,Foxp3				C8B	intronic
1	56943361	0.86	0.95	rs598772	C	T	0.85	0.87	0.92	0.86						CDP,Sox				C8B	intronic

Query SNP: rs3007737 and variants with r^2 >= 0.8

chr	pos (hg38)	LD (r^2)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNAse	Proteins bound	Motifs changed	NHGRI/EBI GWAS hits	GRASP QTL hits	Selected eQTL hits	RefSeq genes	dbSNP func annot
1	241555004	0.91	0.98	rs6658805	C	G	0.46	0.47	0.44	0.61			LIV			Pax-4,Zfp128			2 hits	KMO	intronic
1	241557259	1	1	rs3007737	T	C	0.24	0.44	0.44	0.59			LIV					2 hits	1 hit	KMO	intronic

Query SNP: rs6826441 and variants with r^2 >= 0.8

chr	pos (hg38)	LD (r^2)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNAse	Proteins bound	Motifs changed	NHGRI/EBI GWAS hits	GRASP QTL hits	Selected eQTL hits	RefSeq genes	dbSNP func annot
4	27185117	0.91	-0.96	rs1982811	A	C	0.46	0.34	0.47	0.27			SKIN	SKIN		Mef2				160kb 3' of STIM2	
4	27185213	0.91	-0.95	rs1982810	A	G	0.39	0.33	0.47	0.26			SKIN	SKIN		Mrg,Pbx3				160kb 3' of STIM2	
4	27194373	0.97	-0.99	rs10000844	G	C	0.40	0.33	0.48	0.26										169kb 3' of STIM2	
4	27195237	0.99	-1	rs2087260	C	T	0.38	0.33	0.48	0.26						5 altered motifs				170kb 3' of STIM2	
4	27199734	0.99	1	rs7662141	C	T	0.60	0.67	0.52	0.74			PANC			7 altered motifs				174kb 3' of STIM2	
4	27199858	0.99	1	rs1488287	A	C	0.60	0.67	0.52	0.74			PANC			6 altered motifs				174kb 3' of STIM2	
4	27199923	1	1	rs1488286	A	G	0.51	0.65	0.52	0.74			PANC			Arid5a,Pou1f1,Pou3f2				175kb 3' of STIM2	
4	27200001	0.99	1	rs1488285	A	G	0.60	0.67	0.52	0.74			PANC							175kb 3' of STIM2	
4	27200024	0.99	1	rs1488284	T	C	0.60	0.67	0.52	0.74			PANC			6 altered motifs				175kb 3' of STIM2	
4	27200682	0.99	1	rs13144865	T	C	0.51	0.65	0.52	0.74			ESDR, FAT, BRN, PANC			5 altered motifs				175kb 3' of STIM2	
4	27200814	1	1	rs6825535	A	G	0.51	0.65	0.52	0.74			ESDR, IPSC, FAT, BRN							175kb 3' of STIM2	
4	27200972	1	1	rs6826441	G	A	0.51	0.66	0.52	0.74			ESDR, IPSC, FAT, BRN	ESDR,SKIN		XBP-1				176kb 3' of STIM2	
4	27201151	0.99	1	rs6857150	T	C	0.60	0.67	0.52	0.74			5 tissues			GR,Hoxd10,PLZF,Sox				176kb 3' of STIM2	
4	27201279	0.99	1	rs979623	A	G	0.51	0.65	0.52	0.73			ESDR, IPSC, FAT, BRN			STAT				176kb 3' of STIM2	
4	27201523	0.99	1	rs979622	T	G	0.51	0.65	0.52	0.73			ESDR, FAT, BRN			Arid5a,E2F				176kb 3' of STIM2	
4	27201553	0.99	1	rs5856976	GC	G	0.51	0.65	0.52	0.73			ESDR, FAT, BRN			FAC1,Foxp1,HDAC2,Zfp105				176kb 3' of STIM2	
4	27202013	0.99	0.99	rs4103808	A	C	0.54	0.66	0.52	0.74			PANC			Pou2f2,Pou3f2,Pou5f1,Sox				177kb 3' of STIM2	
4	27202141	0.99	1	rs4692178	A	G	0.51	0.65	0.52	0.73			PANC			PEBP				177kb 3' of	

																		STIM2	
4	27202483	0.99	-0.99	rs1565188	T	C	0.37	0.33	0.48	0.26					BDP1,Nanog,SEF-1,Sin3Ak-20			177kb 3' of STIM2	
4	27202767	0.99	0.99	rs7660015	T	G	0.54	0.66	0.52	0.74								177kb 3' of STIM2	
4	27203344	0.99	0.99	rs993395	A	C	0.54	0.66	0.52	0.74					SEF-1,Smad3			178kb 3' of STIM2	
4	27204164	0.99	1	rs7659051	C	A	0.51	0.65	0.52	0.73					GR,Mef2			179kb 3' of STIM2	
4	27204186	0.99	0.99	rs7683751	T	C	0.54	0.66	0.52	0.74					AIRE,CEBPB,STAT			179kb 3' of STIM2	
4	27204607	0.99	0.99	rs6448502	C	T	0.60	0.67	0.52	0.74		ESDR, BRN			6 altered motifs			179kb 3' of STIM2	
4	27204838	0.99	0.99	rs965978	A	G	0.60	0.67	0.52	0.74		BRN			6 altered motifs			179kb 3' of STIM2	
4	27205294	0.99	1	rs7666254	G	A	0.51	0.65	0.52	0.73					Brachyury,VDR			180kb 3' of STIM2	
4	27205335	0.99	0.99	rs2220404	T	G	0.60	0.67	0.52	0.74					E2A,Myf,ZEB1,p53			180kb 3' of STIM2	
4	27205777	0.99	0.99	rs2200691	A	G	0.55	0.66	0.52	0.74		FAT			8 altered motifs			180kb 3' of STIM2	
4	27205809	0.99	1	rs2220403	T	C	0.52	0.65	0.52	0.73		ESDR, FAT						180kb 3' of STIM2	
4	27206601	0.99	1	rs4504235	C	G	0.52	0.65	0.52	0.73		6 tissues			Nanog,PEBP,Sox			181kb 3' of STIM2	
4	27206637	0.99	1	rs4298124	A	G	0.51	0.65	0.52	0.73		6 tissues			6 altered motifs			181kb 3' of STIM2	
4	27207937	0.99	-0.99	rs1488268	G	T	0.36	0.33	0.48	0.26		ESDR, IPSC			5 altered motifs			183kb 3' of STIM2	
4	27207940	0.99	-0.99	rs1488269	C	T	0.36	0.33	0.48	0.26		ESDR, IPSC			7 altered motifs			183kb 3' of STIM2	
4	27209456	0.99	0.99	rs3947590	C	T	0.61	0.67	0.52	0.74					Brachyury,Hoxa7,LXR			184kb 3' of STIM2	
4	27213063	0.97	0.99	rs7683268	C	A	0.55	0.66	0.53	0.73					Nanog,Pou2f2			188kb 3' of STIM2	intronic

Query SNP: rs10067633 and variants with r^2 >= 0.8

chr	pos	LD	LD	variant	Ref	Alt	AFR	AMR	ASN	EUR	SiPhy	Promoter	Enhancer	DNAse	Proteins	Motifs	NHGRI/EBI	GRASP	Selected	RefSeq	dbSNP

	(hg38)	(r^2)	(D')				freq	freq	freq	freq	cons	histone marks	histone marks		bound	changed	GWAS hits	QTL hits	eQTL hits	genes	func annot
5	54577625	1	1	rs766529	G	C	0.37	0.27	0.41	0.17		BLD	ESDR, BLD, PLCNT	BLD,BLD		Pou5f1,Sox,TFE		2 hits		31kb 3' of SNX18	
5	54578346	1	1	rs10067633	T	C	0.41	0.28	0.42	0.17								2 hits		32kb 3' of SNX18	

Query SNP: rs16829831 and variants with r^2 >= 0.8

chr	pos (hg38)	LD (r^2)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNAse	Proteins bound	Motifs changed	NHGRI/EBI GWAS hits	GRASP QTL hits	Selected eQTL hits	RefSeq genes	dbSNP func annot
3	159049958	0.99	1	rs56324519	C	T	0.22	0.28	0.35	0.22						AhR,Smad				19kb 5' of IQCJ	
3	159050178	0.95	0.98	rs6807606	G	C	0.37	0.28	0.37	0.22						LUN-1,RBP-Jkappa				19kb 5' of IQCJ	
3	159050631	0.98	1	rs1566550	A	C	0.38	0.29	0.37	0.22						Bcl6b,STAT		1 hit		19kb 5' of IQCJ	
3	159051052	0.94	0.97	rs9872767	C	T	0.37	0.29	0.36	0.21										18kb 5' of IQCJ	
3	159051085	0.98	1	rs9821195	T	C	0.40	0.30	0.37	0.22						BRCA1,CHD2,Ets,ZBTB33				18kb 5' of IQCJ	
3	159051346	0.98	1	rs2102108	T	C	0.37	0.29	0.37	0.22						MIF-1,RXR::LXR				18kb 5' of IQCJ	
3	159051446	0.98	1	rs2088850	G	A	0.38	0.29	0.37	0.22						Nkx2,Nkx3				18kb 5' of IQCJ	
3	159052214	0.98	1	rs6765871	C	T	0.37	0.29	0.37	0.22										17kb 5' of IQCJ	
3	159052635	0.83	1	rs115747548	A	G	0.37	0.31	0.37	0.25										17kb 5' of IQCJ	
3	159052857	0.98	1	rs2134030	C	G	0.38	0.29	0.37	0.22						SETDB1,STAT				16kb 5' of IQCJ	
3	159052921	0.98	1	rs1976409	A	C	0.37	0.29	0.37	0.22						GR,ZBRK1,ZBTB7A,Znf143				16kb 5' of IQCJ	
3	159053136	0.98	0.99	rs61795961	C	G	0.08	0.28	0.37	0.21						CCNT2,Foxo,GATA				16kb 5' of IQCJ	
3	159053584	0.98	1	rs66556054	T	C	0.38	0.30	0.37	0.22						Pax-6,Pou1f1,Pou3f2,Pou3f3				16kb 5' of IQCJ	
3	159054033	0.98	1	rs9850989	A	G	0.37	0.29	0.37	0.22						BATF				15kb 5' of IQCJ	
3	159054868	0.98	0.99	rs67625330	T	C	0.19	0.28	0.36	0.21						7 altered motifs				14kb 5' of IQCJ	
3	159055139	0.96	0.99	rs9842572	T	C	0.38	0.28	0.37	0.21						Zbtb3				14kb 5' of IQCJ	
3	159055434	0.98	1	rs9843076	T	C	0.36	0.29	0.37	0.22						Arid5b,Pou2f2,STAT,Sox				14kb 5' of IQCJ	
3	159055677	0.98	1	rs9823603	C	T	0.38	0.29	0.37	0.22						10 altered motifs				14kb 5' of IQCJ	
3	159057871	0.98	1	rs58791262	AT	A	0.18	0.28	0.36	0.21			MUS		MAFF,MAFK	7 altered motifs				11kb 5' of IQCJ	
3	159057878	0.98	1	rs16844902	C	G	0.18	0.28	0.36	0.21			MUS		MAFF,MAFK	9 altered motifs				11kb 5' of IQCJ	
3	159057992	0.98	1	rs1501280	A	G	0.37	0.29	0.37	0.22			MUS		MAFF	6 altered motifs		1 hit		11kb 5' of IQCJ	

3	159058090	1	1	rs6768168	C	G	0.18	0.28	0.36	0.21			MUS				DMRT2			11kb 5' of IQCJ	
3	159058440	1	1	rs6768479	C	G	0.18	0.28	0.37	0.21							Smad3,Sox			11kb 5' of IQCJ	
3	159058522	1	1	rs16829831	C	G	0.18	0.28	0.37	0.21							Hoxa10			11kb 5' of IQCJ	
3	159059111	0.98	1	rs28526501	A	G	0.38	0.29	0.37	0.22			IPSC		USF1					10kb 5' of IQCJ	
3	159060600	0.98	1	rs4680488	A	T	0.38	0.29	0.37	0.22							Pou6f1			8.7kb 5' of IQCJ	
3	159061524	0.98	1	rs6791973	T	C	0.38	0.29	0.37	0.22							Ets		1 hit	7.7kb 5' of IQCJ	
3	159061548	0.92	0.96	rs74951474	AACTT	A	0.38	0.28	0.37	0.21							CEBPG,Lhx3,Nkx6-1,Sox			7.7kb 5' of IQCJ	
3	159061595	0.98	1	rs6779213	G	A	0.35	0.28	0.37	0.22							AP-1,Hoxa3,Hoxa4			7.7kb 5' of IQCJ	
3	159061971	0.98	1	rs6782012	G	C	0.37	0.29	0.37	0.22										7.3kb 5' of IQCJ	
3	159062250	0.98	1	rs58260218	A	G	0.48	0.30	0.37	0.22							RXRA,STAT,Whn			7kb 5' of IQCJ	
3	159062425	0.98	1	rs12495683	A	T	0.29	0.28	0.37	0.22							DMRT4			6.8kb 5' of IQCJ	
3	159062623	0.98	1	rs12495742	A	G	0.48	0.30	0.37	0.22			ESC						1 hit	6.6kb 5' of IQCJ	
3	159063489	0.98	0.99	rs16829848	T	G	0.17	0.28	0.37	0.21							GLI			5.8kb 5' of IQCJ	
3	159063724	0.98	0.99	rs61221330	T	C	0.28	0.28	0.36	0.21							AIRE,Sin3Ak-20			5.5kb 5' of IQCJ	
3	159066413	0.98	0.99	rs1501286	C	G	0.12	0.28	0.36	0.21							E2A,LBP-1,PU.1,TAL1			2.8kb 5' of IQCJ	
3	159074102	0.92	0.98	rs974155	C	T	0.02	0.30	0.28	0.21							5 altered motifs		1 hit	IQCJ	intronic
3	159079482	0.91	0.98	rs59930845	G	A	0.02	0.30	0.27	0.21			MUS				Hoxa5,Mef2,Pou2f2,TATA			IQCJ	intronic
3	159082172	0.92	0.98	rs61795965	G	T	0.02	0.30	0.28	0.21			FAT, STRM, MUS				10 altered motifs			IQCJ	intronic
3	159082747	0.92	0.98	rs16829875	G	T	0.02	0.30	0.28	0.21			6 tissues	11 tissues	CFOS,CJUN,P300,RAD21		Foxf2,Foxl1,PRDM1			IQCJ	intronic
3	159086263	0.92	0.98	rs139496364	T	C	0.02	0.30	0.28	0.21							GR,Hbp1,Sox,TCF4			IQCJ	intronic
3	159086447	0.92	0.98	rs145561447	T	C	0.02	0.30	0.28	0.21							Bbx,TCF4			IQCJ	intronic
3	159087490	0.91	0.98	rs150431679	A	G	0.02	0.30	0.28	0.21							AP-1,p300			IQCJ	intronic
3	159088106	0.92	0.98	rs141971763	C	G	0.04	0.30	0.28	0.21							LUN-1,Osf2			IQCJ	intronic
3	159091264	0.91	0.96	rs59794476	C	G	0.05	0.30	0.28	0.21							SIX5,Znf143			IQCJ	intronic
3	159095264	0.86	0.95	rs61796004	G	A	0.01	0.29	0.28	0.21							Foxc1,Foxl1,Lhx3,Nkx6-2			IQCJ	intronic
3	159101880	0.9	0.96	rs61796008	A	G	0.02	0.30	0.28	0.21							PLZF,Pax-4,STAT			IQCJ	intronic
3	159108370	0.88	0.94	rs2134029	A	G	0.02	0.35	0.25	0.21										IQCJ	intronic
3	159109573	0.9	0.96	rs4094324	C	T	0.02	0.35	0.26	0.21							20 altered motifs			IQCJ	intronic

Query SNP: rs6983267 and variants with r^2 >= 0.8

chr	pos (hg38)	LD (r^2)	LD (D')	variant	Ref	Alt	AFR freq	AMR freq	ASN freq	EUR freq	SiPhy cons	Promoter histone marks	Enhancer histone marks	DNAse	Proteins bound	Motifs changed	NHGRI/EBI GWAS hits	GRASP QTL hits	Selected eQTL hits	RefSeq genes	dbSNP func annot
8	127395198	0.92	1	rs10505477	A	G	0.13	0.45	0.64	0.54				5		5 altered motifs	3 hits			20kb 5' of	

												tissues				POU5F1B
8	127398703	0.91	0.98	rs12682374	C	G	0.11	0.44	0.63	0.53	5 tissues	5 tissues	POL2	Ets,Myb,SIX5,p300		17kb 5' of POU5F1B
8	127401060	1	1	rs6983267	G	T	0.07	0.44	0.64	0.52	8 tissues	10 tissues	5 bound proteins	AP-1,Sox,TCF4	11 hits	15kb 5' of POU5F1B

Query SNP enhancer summary:

NOTE: Background for GWAS SNPs is still based on Haploreg v4.0 and will be updated to reflect v4.1

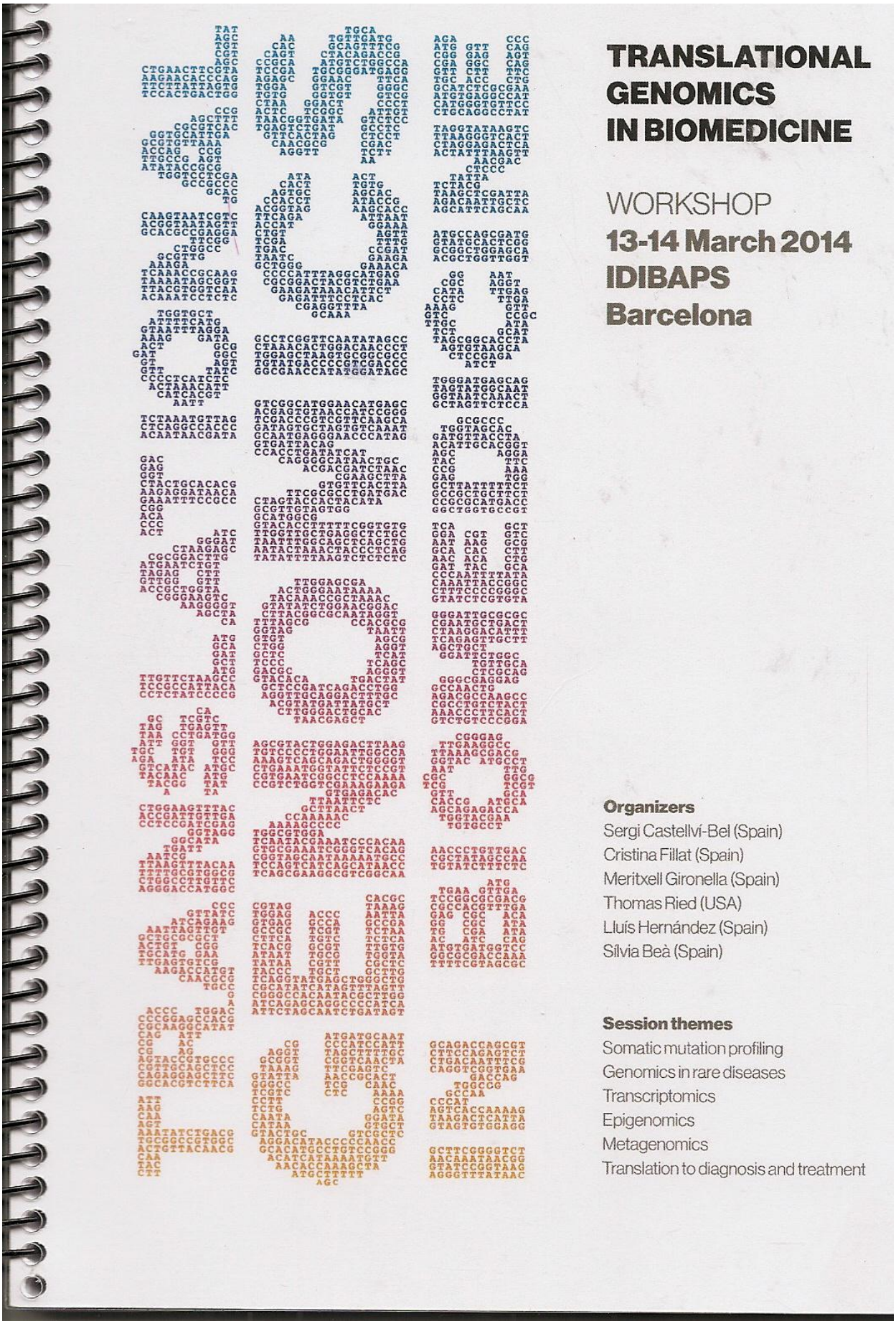
Cell	Observed	Expected (all SNPs)	Expected (GWAS SNPs)	Binomial p (all SNPs)	Binomial p (GWAS SNPs)
E017 LNG.IMR90 (IMR90 fetal lung fibroblasts Cell Line)	0	0.3	0.5	1	1
E002 ESC.WA7 (ES-WA7 Cells)	0	0.1	0.1	1	1
E008 ESC.H9 (H9 Cells)	0	0.1	0.2	1	1
E001 ESC.I3 (ES-I3 Cells)	0	0.2	0.4	1	1
E015 ESC.HUES6 (HUES6 Cells)	0	0.2	0.4	1	1
E014 ESC.HUES48 (HUES48 Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E016 ESC.HUES64 (HUES64 Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E003 ESC.H1 (H1 Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E024 ESC.4STAR (ES-UCSF4 Cells)	0	0.2	0.4	1	1
E020 IPSC.20B (iPS-20b Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E019 IPSC.18 (iPS-18 Cells)	1	0.2	0.3	0.202158	0.284736
E018 IPSC.15b (iPS-15b Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E021 IPSC.DF.6.9 (iPS DF 6.9 Cells)	0	0.1	0.2	1	1
E022 IPSC.DF.19.11 (iPS DF 19.11 Cells)	0	0.2	0.4	1	1
E007 ESDR.H1.NEUR.PROG (H1 Derived Neuronal Progenitor Cultured Cells)	0	0.1	0.2	1	1
E009 ESDR.H9.NEUR.PROG (H9 Derived Neuronal Progenitor Cultured Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E010 ESDR.H9.NEUR (H9 Derived Neuron Cultured Cells)	0	0.2	0.4	1	1
E013 ESDR.CD56.MESO (hESC Derived CD56+ Mesoderm Cultured Cells)	1	0.2	0.4	0.176519	0.320159
E012 ESDR.CD56.ECTO (hESC Derived CD56+ Ectoderm Cultured Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E011 ESDR.CD184.ENDO (hESC Derived CD184+ Endoderm Cultured Cells)	2	0.2	0.4	**0.014049**	**0.045758**
E004 ESDR.H1.BMP4.MESO (H1 BMP4 Derived Mesendoderm Cultured Cells)	1	0.1	0.2	0.102934	0.169108
E005 ESDR.H1.BMP4.TROP (H1 BMP4 Derived Trophoblast Cultured Cells)	0	0.2	0.4	1	1
E006 ESDR.H1.MSC (H1 Derived Mesenchymal Stem Cells)	0	0.2	0.4	1	1
E062 BLD.PER.MONUC.PC (Primary mononuclear cells from peripheral blood)	0	0.1	0.2	1	1
E034 BLD.CD3.PPC (Primary T cells from peripheral blood)	0	0.2	0.3	1	1
E045 BLD.CD4.CD25I.CD127.TMEMPC (Primary T cells effector/memory enriched from peripheral blood)	0	0.1	0.2	1	1
E033 BLD.CD3.CPC (Primary T cells from cord blood)	1	0.1	0.2	0.138965	0.21746
E044 BLD.CD4.CD25.CD127M.TREGPC (Primary T regulatory cells from peripheral blood)	0	0.1	0.2	1	1
E043 BLD.CD4.CD25M.TPC (Primary T helper cells from peripheral blood)	0	0.2	0.3	1	1
E039 BLD.CD4.CD25M.CD45RA.NPC (Primary T helper naive cells from peripheral blood)	1	0.2	0.3	0.168179	0.253037
E041 BLD.CD4.CD25M.IL17M.PL.TPC (Primary T helper cells PMA-I stimulated)	1	0.2	0.3	0.194266	0.287256
E042 BLD.CD4.CD25M.IL17P.PL.TPC (Primary T helper 17 cells PMA-I stimulated)	0	0.2	0.3	1	1

E040 BLD.CD4.CD25M.CD45RO.MPC (Primary T helper memory cells from peripheral blood 1)	0	0.2	0.3	1	1
E037 BLD.CD4.MPC (Primary T helper memory cells from peripheral blood 2)	0	0.2	0.3	1	1
E048 BLD.CD8.MPC (Primary T CD8+ memory cells from peripheral blood)	0	0.1	0.3	1	1
E038 BLD.CD4.NPC (Primary T helper naive cells from peripheral blood)	0	0.2	0.3	1	1
E047 BLD.CD8.NPC (Primary T CD8+ naive cells from peripheral blood)	1	0.2	0.3	0.166687	0.282208
E029 BLD.CD14.PC (Primary monocytes from peripheral blood)	0	0.3	0.5	1	1
E031 BLD.CD19.CPC (Primary B cells from cord blood)	0	0.2	0.3	1	1
E035 BLD.CD34.PC (Primary hematopoietic stem cells)	0	0.2	0.3	1	1
E051 BLD.MOB.CD34.PC.M (Primary hematopoietic stem cells G-CSF-mobilized Male)	0	0.2	0.4	1	1
E050 BLD.MOB.CD34.PC.F (Primary hematopoietic stem cells G-CSF-mobilized Female)	0	0.2	0.4	1	1
E036 BLD.CD34.CC (Primary hematopoietic stem cells short term culture)	0	0.2	0.4	1	1
E032 BLD.CD19.PPC (Primary B cells from peripheral blood)	0	0.2	0.4	1	1
E046 BLD.CD56.PC (Primary Natural Killer cells from peripheral blood)	1	0.2	0.4	0.189442	0.30879
E030 BLD.CD15.PC (Primary neutrophils from peripheral blood)	0	0.2	0.3	1	1
E026 STRM.MRW.MSC (Bone Marrow Derived Cultured Mesenchymal Stem Cells)	0	0.2	0.4	1	1
E049 STRM.CHON.MRW.DR.MSC (Mesenchymal Stem Cell Derived Chondrocyte Cultured Cells)	0	0.3	0.5	1	1
E025 FAT.ADIP.DR.MSC (Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell Cultured Cells)	1	0.3	0.6	0.296655	0.450981
E023 FAT.MSC.DR.ADIP (Mesenchymal Stem Cell Derived Adipocyte Cultured Cells)	0	0.3	0.4	1	1
E052 MUS.SAT (Muscle Satellite Cultured Cells)	0	0.2	0.4	1	1
E055 SKIN.PEN.FRSK.FIB.01 (Foreskin Fibroblast Primary Cells skin01)	0	0.3	0.5	1	1
E056 SKIN.PEN.FRSK.FIB.02 (Foreskin Fibroblast Primary Cells skin02)	1	0.2	0.3	0.165094	0.297264
E059 SKIN.PEN.FRSK.MEL.01 (Foreskin Melanocyte Primary Cells skin01)	0	0.1	0.3	1	1
E061 SKIN.PEN.FRSK.MEL.03 (Foreskin Melanocyte Primary Cells skin03)	1	0.3	0.4	0.231794	0.34243
E057 SKIN.PEN.FRSK.KER.02 (Foreskin Keratinocyte Primary Cells skin02)	1	0.2	0.4	0.211265	0.34868
E058 SKIN.PEN.FRSK.KER.03 (Foreskin Keratinocyte Primary Cells skin03)	1	0.2	0.4	0.221543	0.351786
E028 BRST.HMEC.35 (Breast variant Human Mammary Epithelial Cells (vHMEC))	0	0.3	0.5	1	1
E027 BRST.MYO (Breast Myoepithelial Primary Cells)	0	0.3	0.6	1	1
E054 BRN.GANGEM.DR.NRSPHR (Ganglion Eminence derived primary cultured neurospheres)	0	0.2	0.3	1	1
E053 BRN.CRTX.DR.NRSPHR (Cortex derived primary cultured neurospheres)	1	0.2	0.4	0.209116	0.306334
E112 THYM (Thymus)	0	0.1	0.2	1	1
E093 THYM.FET (Fetal Thymus)	1	0.2	0.4	0.200384	0.351786
E071 BRN.HIPP.MID (Brain Hippocampus Middle)	0	0.2	0.4	1	1
E074 BRN.SUB.NIG (Brain Substantia Nigra)	0	0.2	0.3	1	1
E068 BRN.ANT.CAUD (Brain Anterior Caudate)	0	0.2	0.3	1	1
E069 BRN.CING.GYR (Brain Cingulate Gyrus)	0	0.2	0.3	1	1
E072 BRN.INF.TMP (Brain Inferior Temporal Lobe)	0	0.2	0.3	1	1
E067 BRN.ANG.GYR (Brain Angular Gyrus)	0	0.1	0.3	1	1
E073 BRN.DL.PRFRNTL.CRTX (Brain Dorsolateral Prefrontal Cortex)	0	0.1	0.3	1	1
E070 BRN.GRM.MTRX (Brain Germinal Matrix)	0	0.1	0.2	1	1
E082 BRN.FET.F (Fetal Brain Female)	0	0.1	0.2	1	1
E081 BRN.FET.M (Fetal Brain Male)	0	0.2	0.3	1	1
E063 FAT.ADIP.NUC (Adipose Nuclei)	0	0.2	0.5	1	1

E100 MUS.PSOAS (Psoas Muscle)	0	0.1	0.2	1	1
E108 MUS.SKLT.F (Skeletal Muscle Female)	0	0.2	0.4	1	1
E107 MUS.SKLT.M (Skeletal Muscle Male)	0	0.2	0.4	1	1
E089 MUS.TRNK.FET (Fetal Muscle Trunk)	0	0.3	0.5	1	1
E090 MUS.LEG.FET (Fetal Muscle Leg)	1	0.3	0.6	0.292011	0.487707
E083 HRT.FET (Fetal Heart)	0	0.3	0.5	1	1
E104 HRT.ATR.R (Right Atrium)	0	0.2	0.3	1	1
E095 HRT.VENT.L (Left Ventricle)	0	0.2	0.4	1	1
E105 HRT.VNT.R (Right Ventricle)	0	0.2	0.3	1	1
E065 VAS.AOR (Aorta)	0	0.1	0.1	1	1
E078 GI.DUO.SM.MUS (Duodenum Smooth Muscle)	0	0.1	0.2	1	1
E076 GI.CLN.SM.MUS (Colon Smooth Muscle)	0	0.2	0.3	1	1
E103 GI.RECT.SM.MUS (Rectal Smooth Muscle)	0	0.1	0.2	1	1
E111 GI.STMC.MUS (Stomach Smooth Muscle)	0	0.1	0.2	1	1
E092 GI.STMC.FET (Fetal Stomach)	0	0.2	0.4	1	1
E085 GI.S.INT.FET (Fetal Intestine Small)	1	0.2	0.4	0.207472	0.340859
E084 GI.L.INT.FET (Fetal Intestine Large)	1	0.2	0.4	0.19929	0.33613
E109 GI.S.INT (Small Intestine)	0	0.1	0.2	1	1
E106 GI.CLN.SIG (Sigmoid Colon)	0	0.1	0.2	1	1
E075 GI.CLN.MUC (Colonic Mucosa)	0	0.1	0.2	1	1
E101 GI.RECT.MUC.29 (Rectal Mucosa Donor 29)	1	0.1	0.2	0.094097	0.179539
E102 GI.RECT.MUC.31 (Rectal Mucosa Donor 31)	0	0.2	0.3	1	1
E110 GI.STMC.MUC (Stomach Mucosa)	1	0.2	0.4	0.19333	0.313682
E077 GI.DUO.MUC (Duodenum Mucosa)	0	0.2	0.3	1	1
E079 GI.ESO (Esophagus)	0	0.1	0.2	1	1
E094 GI.STMC.GAST (Gastric)	1	0.1	0.2	0.107371	0.201918
E099 PLCNT.AMN (Placenta Amnion)	0	0.1	0.3	1	1
E086 KID.FET (Fetal Kidney)	0	0.1	0.2	1	1
E088 LNG.FET (Fetal Lung)	0	0.2	0.4	1	1
E097 OVRY (Ovary)	0	0.2	0.3	1	1
E087 PANC.ISLT (Pancreatic Islets)	0	0.1	0.1	1	1
E080 ADRL.GLND.FET (Fetal Adrenal Gland)	0	0.3	0.5	1	1
E091 PLCNT.FET (Placenta)	0	0.3	0.5	1	1
E066 LIV.ADLT (Liver)	2	0.2	0.4	**0.020194**	0.059204
E098 PANC (Pancreas)	0	0.2	0.3	1	1
E096 LNG (Lung)	0	0.1	0.3	1	1
E113 SPLN (Spleen)	0	0.2	0.4	1	1
E114 LNG.A549.ETOH002.CNCR (A549 EtOH 0.02pct Lung Carcinoma Cell Line)	0	0.2	0.3	1	1
E115 BLD.DND41.CNCR (Dnd41 TCell Leukemia Cell Line)	0	0.1	0.2	1	1
E116 BLD.GM12878 (GM12878 Lymphoblastoid Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E117 CRVX.HELAS3.CNCR (HeLa-S3 Cervical Carcinoma Cell Line)	1	0.2	0.3	0.157371	0.273729
E118 LIV.HEPG2.CNCR (HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cell Line)	2	0.3	0.5	**0.032404**	0.081301

E119 BRST.HMEC (HMEC Mammary Epithelial Primary Cells)	1	0.3	0.4	0.225703	0.363326
E120 MUS.HSMM (HSMM Skeletal Muscle Myoblasts Cells)	0	0.2	0.4	1	1
E121 MUS.HSMMT (HSMM cell derived Skeletal Muscle Myotubes Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E122 VAS.HUVEC (HUVEC Umbilical Vein Endothelial Primary Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E123 BLD.K562.CNCR (K562 Leukemia Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E124 BLD.CD14.MONO (Monocytes-CD14+ RO01746 Primary Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E125 BRN.NHA (NH-A Astrocytes Primary Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E126 SKIN.NHDFAD (NHDF-Ad Adult Dermal Fibroblast Primary Cells)	0	0.3	0.4	1	1
E127 SKIN.NHEK (NHEK-Epidermal Keratinocyte Primary Cells)	1	0.2	0.4	0.211064	0.328982
E128 LNG.NHLF (NHLF Lung Fibroblast Primary Cells)	0	0.2	0.3	1	1
E129 BONE.OSTEO (Osteoblast Primary Cells)	0	0.2	0.4	1	1

Tez çalışması ile ilgili sunulmuş bildiriler ve Doktora sırasında yapılmış yayınlar



#27

Second Step of a GWAS Study: Validation of 75 SNPs associated with sporadic colorectal cancer in the Turkish population

Özge Cumao
Ankara University, Biotechnology Institute, Turkey

Colorectal cancer is the second most common cause of cancer death in developed countries and third most prevalent cancer worldwide. Although there are many studies on colorectal cancer genetics there is still a need for novel data on the mechanisms triggering the disease and its predisposing genes. The aim of our study is the identification of gene loci responsible for sporadic colorectal cancer susceptibility in Turkish population. In the first step of our study, in order to identify new colorectal cancer predisposing genes we conducted a family based genome-wide association study (GWAS) in 51 trios using Sequential Probability Ratio Test (SPRT) which enables the analysis limited trio numbers in GWAS. In this study we identified 75 SNPs on 67 loci pointing out 119 genes. Haplotype analysis conducted on the association data revealed a homozygous block on chromosome 3 indicating a founder effect in six out of 51 trios. In the current, second step of our GWAS, the validation of these 75 SNPs (119 genes) in an independent and large sporadic colorectal cancer case group has started. These 75 SNPs will be evaluated in 1000 sporadic colorectal cancer cases and 1000 healthy control samples which will be collected by random sampling from 10 centres representing 7 geographic regions of Turkey. So far, 650 control and cancer cases DNA were collected and genotyping assays are on going.

the FEBS Journal

the FEBS Journal

Volume 282 Supplement 1 July 2015

Poster Sessions

Table of Contents

Poster Session 1

Sunday 5 July & Monday 6 July
08:30–19:30, Foyer Convention Center

56 Gen EX S1, Chromatin Structure and Epigenetic Modifications and Maintenance of the Genome
70 Gen Ex S2, Turning Signals into Messages – the Complexity of Gene Regulation
89 Gen Ex S3, Translational Control and Protein Turnover
98 Mem Biol S1, Organelle Dynamics and Communication
107 Mem Biol S2, Autophagy and Degradation
110 Mem Biol S3, Redox-Regulation of Biological Activities
129 Chem Biol S1, Probing Cellular Function with Small Molecules
158 Chem Biol S2, Targeted Cancer Therapy
160 Chem Biol S4, RNA-Based Disease Mechanism and Therapy
166 Mol Neu S1, Neuronal Ion Channels and their Role in Disease
168 Mol Neu S2, Mechanisms of Nervous System Development and Regeneration
172 Mol Neu S3, Degeneration and Ageing of the Nervous System
184 Sys Biol S2, Molecular Clocks
187 Sys Biol S3, Comprehensive Models of Metabolism and Signaling
198 Struct Biol S1, Mechanisms of Membrane Transport
205 Struct Biol S2, Channels and Transporters
206 Struct Biol S3, Protein-Mediated Membrane Deformation and Penetration

Poster Session 2

Tuesday 7 July & Wednesday 8 July
08:30–19:30, Foyer Convention Center

209 Gen Ex S4, RNA Processing and Modifications
215 Gen Ex S5, Non-Coding RNAs in Gene Regulation
220 Mem Biol S4, Extrinsic and intrinsic regulation of cellular growth control
228 Mem Biol S5, Lipid Signaling & Dynamics
240 Chem Biol S2, Targeted Cancer Therapy
274 Chem Biol S3, Functional Glycobiology – from Mechanism to Disease
281 Chem Biol S5, Signal Transduction in Tumor Development, Differentiation and Immune Escape
293 Mol Neu S4, Molecular Architecture and Assembly of the Synapse
297 Mol Neu S5, Control of Neuronal Function by Regulating Protein Homeostasis
302 Sys Biol S1, Interspecies Communications
304 Sys Biol S4, Functional Networks Regulating Cellular Stress Response and Ageing
315 Sys Biol S5, Systems Biology in Stem Cells
316 Struct Biol S2, Channels and Transporters
324 Struct Biol S4, Monitoring Protein Conformational Dynamics and Movement
329 Struct Biol S5, Advances in Structural Biology – from Subcellular to Molecular Resolution

353 **FEBS Education Session**

380 **Late-breaking abstracts**

Each poster has been given a unique number and the first part of the poster number relates to the session in which the poster was presented. Gen EX S1 = P02; Gen EX S2 = P03; Gen EX S3 = P04; Gen EX S4 = P05; Gen EX S5 = P06; Mem Biol S1 = P08; Mem Biol S2 = P09; Mem Biol S3 = P10; Mem Biol S4 = P11; Mem Biol S5 = P12; Chem Biol S1 = P14; Chem Biol S2 = P15; Chem Biol S3 = P16; Chem Biol S4 = P17; Chem Biol S5 = P18; Mol Neu S1 = P20; Mol Neu S2 = P21; Mol Neu S3 = P22; Mol Neu S4 = P23; Mol Neu S5 = P24; Sys Biol S1 = P26; Sys Biol S2 = P27; Sys Biol S3 = P28; Sys Biol S4 = P29; Sys Biol S5 = P30; Struct Biol S1 = P32; Struct Biol S2 = P33; Struct Biol S3 = P34; Struct Biol S4 = P35; Struct Biol S5 = P36; FEBS Education Session = P38; Late-breaking abstracts = LB.

© 2015 The Authors. FEBS Journal © 2015 FEBS

LB-119
Second step of genome-wide association study: Validation of 50 single nucleotit polymorphisms associated with sporadic colorectal cancer in Turkish population

O. Cumaogullari[1], O. Ilk Dag[2], N. Tekin[1], F. Rajabli[3], M. A. Kuzu[4], D. Çiglidag Dungul[1], N. Belder[1], H. Ozdag[1]
[1]Ankara University Biotechnology Institute, Ankara, Turkey, [2]Middle East Technical University, Ankara, Turkey, [3]Turgut Özal University, Ankara, Turkey, [4]Ankara University School of Medicine, Ankara, Turkey

Colorectal cancer (CRC) is the second most seen neoplasia in developed countries and over 75% of the CRC cases are sporadic. Although it is one of the most well studied cancer type, mechanisms that trigger sporadic CRC together with its predisposing genes have not been entirely exhausted. In this study, our aim is to identify gene loci responsible for sporadic CRC susceptibility in Turkish population and define new genes which predispose CRC in our population.

Our study is consisted of a family based genomewide association study (GWAS) results and their validation by using KASP (Kompetitive allele spesific amplification) technology. In the first step, we identified 75 CRC associated SNPs by 250K Affymetrix chips in 51 trio. In the second step we used KASP technology to investigate 75 SNPs in 1000 cases and 1000 healthy controls. So far, we studied 50 SNPs in 913 patientand 607 controls. Statistical analysis was carried out by Cochran-Armitagechi-square test.

In this study 5 out of 50 SNPs were found to be associated with sporadic CRC in Turkish population. With regards to our study preliminary results cancer associated SNPs localized in 1q43, 4p15.2, 5q11.2, 6p25.2 and 10p14.

This study is the very first CRC GWAS in Turkish population and it includes preliminary results of the validation studies. With this study, we seek to explain the molecular background of sporadic CRC by investigating and subsequently revealing the related genes in our population of interest.

(This work was supported by TUBİTAK Grant no: 112S634).

LB-120
N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) suppresses the epithelial.mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells via STAT3/Snail signaling

M.-J. Kim[1], S. R. Yoon[2], **J.-S. Lim**[1]
[1]Department of Biological Science, Sookmyung Women's University, Seoul, Republic of Korea, [2]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Immunotherapy Research Center, Daejeon, Republic of Korea

Although NDRG2 has recently been found to be a candidate tumor suppressor, its precise role in the epithelial.mesenchymal transition (EMT) is not well understood. In the present study, we demonstrated that NDRG2 overexpression in MDA-MB-231 cells down-regulated the expression of Snail, a transcriptional repressor of E-cadherin and a key regulator of EMT, as well as the phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), an oncogenic transcription factor that is activated in many human malignancies including breast cancer. In addition, we confirmed that the expression of Snail and phospho-STAT3 was recovered when NDRG2 was knocked down by siRNA in MCF7 cells in which NDRG2 is endogenously expressed. Interestingly, MDA-MB-231-NDRG2 cells showed remarkably decreased Snail expression after treatment with JSI-124 (also known as cucurbitacin I) or Stattic, STAT3 inhibitors, compared to MDA-MB-231-mock cells. Moreover, STAT3 activation by EGF treatment induced higher Snail expression, and NDRG2 overexpression resulted in the inhibition of Snail expression in MDAMB-231 cells stimulated by EGF in the absence or presence of STAT3 inhibitor. Treatment of MDA-MB-231 cells with STAT3 inhibitor led to a moderate decrease inwound healing and migration capacity, whereas STAT3 inhibitor treatment of MDA-MB-231-NDRG2 cells resulted in a significant attenuation of migration in both resting and EGF-stimulated cells. Collectively, our data demonstrate that the inhibition of STAT3 signaling by NDRG2 suppresses EMT progression of EMT via the down-regulation of Snail expression.

LB-121
"Quorum sensing in times of cholera" – targeting bacterial virulence regulators in *V. cholerae* with electrophilic probes

N. Levy, M. M. Meijler
Ben-Gurion University of the Negev, Chemistry, Beer-Sheva, Israel

Antibiotic-resistant pathogens have become a rising and troubling phenomenon in recent years. A potential solution may come through fighting infections by targeting virulence mechanisms as opposed to killing the bacteria, thereby avoiding the strong selective pressures that encourage antibiotic-resistant strains to develop. One strategy for doing so is to disrupt quorum sensing (QS), the mechanism by which bacteria communicate with one another via small signaling molecules in order to coordinate their behavior, often including pathogenic behavior. For example, in *Vibrio cholerae*, a Gram-negative pathogen estimated to cause 100,000-120,000 deaths each year, QS mediates biofilm formation and the production of virulence factors through CAI-1, an α-hydroxyl ketone signaling molecule.

We have synthesized CAI-1 analogues containing electrophilic moieties with the aim of covalently binding them to a specific cysteine residue in the CAI-1 receptor, CqsS. Once the probe is covalently bound, it will be possible to selectively label the modified CAI-1 with a fluorescent aminooxy-tag as previously reported by our group. The advantage of this method is that the binding of the probe to the receptor and the labeling are two separate reactions, thereby avoiding a decrease in affinity of the probe to the receptor due to a bulky tag. Moreover, covalently binding a CAI-1 analogue to its receptor can be later used for live cell imaging and further investigation of the QS system in *V. cholerae*, opening the way for innovative, new ways to treat the disease.

LB-122
Structural elucidation of bi-specificity of A-domains as a basis to activate non-natural amino acids

A. Rentmeister[1], H. Kaljunuen[2], S. H. H. Schiefelbein[1], D. Stummer[1], S. Kozak[2], R. Meijers[2], G. Christiansen[3]
[1]Department of Chemistry, Institute of Biochemistry, Universität Münster, Münster, Germany, [2]EMBL Hamburg Outstation, c/o DESY, Hamburg, Germany, [3]Research Institute for Limnology, University of Innsbruck, Mondsee, Austria

Many biologically active peptide secondary metabolites of bacteria are produced by modular enzyme complexes, the non-ribosomal peptide synthetases. Substrate selection occurs through an adenylation (A) domain, which activates the cognate amino acid with high fidelity. The recently discovered A domain of an Anabaenopeptin synthetase from *Planktothrix agardhii* (ApnA A_1) is

© 2015 The Authors. FEBS Journal © 2015 FEBS

SS-01 04

Sporadik Kolorektal Kanserde Genom-boyu Kopya Sayısı Değişiklik Analizi: 18q21.2 Delesyonlarının ve 7p22.2, 8q24.3 Amplifikasyonlarının Önemi

Belder Nevin[1], Sümer Çelebi Hülya[1], Savaş Berna[2], Kuzu Mehmet Ayhan[2], Pak Işın[3], Ensari Arzu[2], Özdağ Hilal[1]

[1]Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara

[2]Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara

[3]Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara

Amaç: Bu çalışmada kopya sayısı değişiklikleri (KSD) ile sporadik koloraktal kanser (sKRK) arasındaki ilişkinin aydınlatılması ve yeni prognostik ve teröpatik hedeflerin tanımlanması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntemler: Öncelikle FFPE örnekler için farklı izolasyon protokollerinin karşılaştırılması ve amplifikasyon etkinliğinin test edilmesini içeren bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Genom ebadında KSD profilleme çalışması 50 eşli sKRK FFPE örneği (toplam 100 örnek) ile Affymetrix SNP 6.0 array'leri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. KSD ve zenginleşme analizi için Partek Genomic Suite 6.6. yazılımı kullanılmıştır. Genomdaki kayıp ve kazançların tespiti genomik segmentasyon algoritması ile gerçekleştirilmiş olup; analizde minimum genomik belirteç:10, iki yönlü t-test p-value eşik değeri: 0.001, sinyal/gürültü: 0.5 parametreleri kullanılmıştır. Kayıp ve kazançlar için eşik değeri 2 ±0.3 alınmıştır.

Bulgular: Optimizasyon adımında modifikasyon uygulamamızla izole edilen DNA örnekleri değerlendirilen tüm izolasyon metodları ve genler için daha başarılı sonuç vermiştir. KSD analizi sonucu en sık görülen değişiklik bölgelerinde 94 gende kazanç tespit edilirken 2 gende kayıp olduğu belirlenmiştir. 18q21.2 genomik bölgesi % 42 sıklıkla en anlamlı kayıp bölgesi iken; 7p22.2 ve 8q24.3 bölgeleri tüm tümör örnekleri içinde %42 sıklıkla görülen en kayda değer kazanç bölgeleri olarak belirlenmiştir. SMAD4 tümör baskılayıcı geni kayıp bölgesi içinde tespit edilmiştir.

Tartışma ve Sonuç: Sonuçlar, 8q24.3, 7p22.2 kazançlarının ve 18q21.2 kayıplarının sporadik kolorektal kanserde en sık görülen değişiklikler olduğunu göstermiştir. Hedef genlerin validasyonu için ek çalışmalar ve daha büyük örnek sayıları gerekse de bu değişiklik bölgeleri SMAD4 gibi potansiyel hedef genler içermektedir.

Genome-wide Copy Number Variation Analysis in Sporadic Colorectal Cancer: Importance of Deletions at 18q21.2 and Amplifications at 7p22.2, 8q24.3

Belder Nevin[1], Sümer Çelebi Hülya1, Savaş Berna[2], Kuzu Mehmet Ayhan[2], Pak Işın3, Ensari Arzu[2], Özdağ Hilal[1]

[1]Ankara University Biotechnology Institute, Ankara

[2]Ankara University, School of Medicine, Ankara

[3]Ankara Oncology Training and Research Hospital, Ankara

Objective: The goal of this study was to elucidate the association between copy number variations (CNVs) and sporadic colorectal cancer (sCRC) and identify candidate novel prognostic and therapeutic targets.

Materials-Methods: An optimization study which included comparison of different isolation procedures and testing of amplification efficiency was conducted on FFPE samples. 50 paired sCRC FFPE tissue samples (100 samples) were subjected to global CNV profiling using the Affymetrix SNP 6.0 arrays. CNV and enrichment analyses were performed using Partek Genomic Suite 6.6. The genomic segmentation algorithm was used to detect gains and losses with the following parameters: minimum genomic markers:10, two sided t-test p-value threshold: 0.001, signal to noise ratio: 0.5. The cut-off value for the gain and loss was set of 2 ±0.3.

Results: In the optimization step, DNA samples were isolated using our modified protocol gave more succesful amplifications for all tested isolation methods and genes. CNV analysis revealed gain in 94 genes and losses in 2 genes. Significant losses were mostly (42%) found at position 18q21.2, and the most remarkable gains at 7p22.2 and 8q24.3 were observed with a frequency of 42% in all tumor samples. A tumor suppressor gene, SMAD4 was found in the deletion region.

Discussion and Conclusion: Our results showed that gains at 8q24.3, 7p22.2 and losses at 18q21.2 are the most frequently alterations in sCRC patients. Validation of target genes requires additional study and larger sample size, but these regions contain potential target genes. e.g. SMAD4.

SS-01 05

Aile Temelli Bir Genom Boyu Asosiyasyon Çalışmasının Validasyonu: Türk Popülasyonunda Sporadik Kolorektal Kanser ile İlişkili 75 Tekli Nükleotit Polimorfiziminin İncelenmesi

Cumaoğulları Özge[1], Çığlıdağ Düngül Dilay[1], Tekin Nilgün[1], Belder Nevin[1], İlk Dağ Özlem[2], Rajabli Farid[3], Doğan Yeşim[1], Kuzu Mehmet Ayhan[4], Özdağ Hilal[1]

[1]Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara

[2]Orta Doğu Teknik Üniversitesi, İstatistik Bölümü, Ankara

[3]Turgut Özal Üniversitesi, Elektrik Elektronik Mühendisliği Bölümü, Ankara

[4]Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı, Ankara

Dünya sağlık örgütü 2014 raporuna göre kolorektal kanserin Türkiye'deki yıllık insidansı diğer kanser tipleri arasında ortalama %6.5'dir. Kolorektal kanser (KRK) vakalarının büyük bir kısmını (%85) sporadik KRK oluşturmaktadır. KRK en iyi çalışılmış kanser tiplerinden biri olsa da bu kanserin oluşumunda rol alan genler bütünüyle belirlenememiştir.Bu çalışmada, Türk sporadik KRK hastalarında yeni yatkınlık genlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamız, daha önce yürütmüş olduğumuz aile temelli bir genom

boyu asosiyasyon çalışması (GBAÇ) sonuçlarına dayanmakta ve bu çalışmada elde edilen sonuçların KASP (Yarışmalı allel spesifik amplifikasyon) teknolojisi ile validasyonunu içermektedir. Bu kapsamda ilk olarak 51 trioda 250K Affymetrix çipinde 75 KRK ilişkili TNP tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise KASP teknolojisi kullanarak 1000 hasta ve 1000 kontrolde tespit edilen 75 TNP'nin validasyonu hedeflenmiştir. Bugüne kadar, 913 hasta ve 607 sağlıklı kontrol bireyde 75 TNP'nin analizi gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler ki kare eğilimli Cochran-Armitage testi ile yapılmıştır. Sonuç olarak, Türk sporadik KRK hastalarında 6 TNP ve 9 ilişkili gen belirlenmiştir. Çalışmamızın bu ilk sonuçlarına göre, 1q43, 3q25.1, 4p15.2, 5q11.2, 6p25.2 ve 10p14 lokuslarının kanser ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışma Türk KRK hastalarında yapılan ilk GBAÇ validasyon sonuçlarını içermektedir.
(Bu çalışma TÜBİTAK 112S634 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.)

Validation of A Family Based Genome-Wide Association Study: Investigation of 75 Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Sporadic Colorectal Cancer in Turkish Population

Cumaoğulları Özge[1], Çığlıdağ Düngül Dilay[1], Tekin Nilgün[1], Belder Nevin[1], İlk Dağ Özlem[2], Rajablı Farıd[3], Doğan Yeşim[1], Kuzu Mehmet Ayhan[4], Özdağ Hilal[1]

[1]*Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara, Turkey*
[2]*Middle East Technical University,Department of Statistics, Ankara, Turkey*
[3]*Turgut Özal University, Department of Electrical Electronics Enginering, Ankara, Turkey*
[4]*Ankara University, School of Medicine, Department of General Surgery, Ankara, Turkey*

According to WHO 2014 report colorectal cancer's (CRC) new incidence rate in Turkey is %6.5 among other cancer types. Majority of the CRC cases are sporadic CRC (%85). Although CRC is one of the most well studied cancer type, CRC predisposing genes have not been entirely identified.In this study, we aimed to identify new predisposing genes in Turkish sporadic CRC cases. The study is based on the results of a family based genome wide association study (GWAS) we previously conducted and their validation by using KASP (Kompetitive allele spesific amplification) technology. Firstly, we identified 75 CRC associated SNPs by 250K Affymetrix chips in 51 trios. In the second step of this study, KASP technology is used to analyse these 75 SNPs in 1000 cases and 1000 healthy controls. So far, we studied 75 SNPs in 913 patient and 607 controls. Statistical analysis was carried out by Cochran-Armitage chi-square test.In this study, 6 SNPs and 9 related genes were found to be associated with sporadic CRC in Turkish population. These SNPs are localized at 1q43, 3q25.1, 4p15.2, 5q11.2, 6p25.2 and 10p14. This study is the very first CRC GWAS in Turkish population and it includes preliminary results of the validation studies.

(This work was supported by TUBITAK Grant no:112S634)

SS-01 06

Transkripsiyon faktörü FOXM1'nın susturulması triple-negatif meme kanser hücrelerinde maligniteyi azaltır

Hamurcu Zuhal[1], Ashour Ahmed[2], Kahraman Nermin[2], Ozpolat Bulent[2]

[1]*Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Betül-Ziya Eren, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri /TÜRKİYE; Teksas Üniversitesi, MD Anderson Kanser Merkezi, Deneysel Terapötik Departmanı, Houston, Texas/USA*
[2]*Teksas Üniversitesi, MD Anderson Kanser Merkezi, Deneysel Terapötik Departmanı, Houston, Texas/USA*

FOX protein ailesinden olan FOXM1, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve hücre çoğalmasında görev alan genlerin transkripsiyonunda merkezi bir fonksiyona sahip, transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda,hücre çoğalması ve apopitoz arasındaki homeostazinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. FOXM1'in rolü dikkate alınarak yapılan bu çalışmada amaç, triple-negatif meme kanser hücrelerinin (TNBC) büyüme ve ilerlemesinde FOXM1'in rolünü araştırmaktır. Triple-negatif meme kanser hücreleri iki farklı FOXM1 hedefli küçük müdahale RNA (siRNA) ve kontrol siRNA ile transfekte edildi. Kontrol siRNA ile transfekte edilmiş hücreler, negatif kontrol olarak kullanıldı. Çalışmamızda, FOXM1'in baskılanması triple-negatif meme hücrelerinin canlılık oranını önemli ölçüde düşürmüştür. Ayrıca, FOXM1 siRNA ile transfekte olmuş hücrelerde, hücre çoğalması, inavazyon ve migrasyon belirgin olarak baskılanmıştır. Üstelik, FOXM1'nın susturulması triple- negatif meme hücrelerini apopitoza teşvik etmiştir. Çalışmamız, FOXM1 siRNA ile FOXM1'in hem mRNA hem de protein düzeyinde ekspresyonun baskılanması, FOXM1'in hedefi olan proteinlerin de down-regülasyonuna yol açtığını göstermiştir. Bu bulgular; FOXM1 sinyal regülasyonundaki düzensizliklerin tümörogenez ve kanser ilerlemesinde etkili olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda, bu sonuçlar FOXM1 inhibisyonunun triple-negatif meme hücrelerinde, kanser terapisi için bir hedef olduğunu göstermektedir.

Deletion of Forkhead Box M1 (FOXM1) transcription factor reduces malignancy in triple negative breast cancer cells

Hamurcu Zuhal[1], Ashour Ahmed[2], Kahraman Nermin[2], Ozpolat Bulent[2]

[1]*Erciyes University, Medical Faculty, Department of Medical Biology, Genome and Stem Cell Center, Kayseri /TURKEY;Department of Experimental Therapeutics The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas/USA*
[2]*Department of Experimental Therapeutics The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas/USA*

ASTR

ORIGINAL ARTICLE

pISSN 2288-6575 • eISSN 2288-6796
http://dx.doi.org/10.4174/astr.2015.89.1.17
Annals of Surgical Treatment and Research

The effects of ventilation with high density oxygen on the strength of gastrointestinal anastomosis

Tevfik Eker, Volkan Genc, Yusuf Sevim[1], Ozge Cumaogullari[2], Menekse Ozcelik[3], Akin Firat Kocaay, Cemal Özben Ensari[4], Ozge Tugce Pasaoglu[5]

Department of General Surgery, Ankara University Medical School, Ankara, [1]Department of General Surgery, Ankara Penal Institution Campus State Hospital, Ankara, [2]Ankara University Biotechnology Institute, Ankara, [3]Department of Anesthesiology and Reanimation, Ankara University Medical School, Ankara, [4]Department of General Surgery, Antalya Education and Training Hospital, Antalya, [5]Department of Medical Biochemistry, Gazi University Medical School, Ankara, Turkey

Purpose: The aim of our study is to evaluate the effects of administration of perioperative supplemental oxygen on anastomoses.
Methods: Forty male Wistar albino rats were used in the study and randomized into 4 groups. Ischemia-reperfusion models were built in groups 3 and 4. Jejunojejunostomy was performed in all rats and assigned to an oxygen/nitrous oxide mixture with a fraction of inspired oxygen of 30% in groups 1 and 3 and 80% in groups 2 and 4. The measurements of perianastomotic tissue oxygen pressure, bursting pressure, level of hydroxyproline were evaluated and compared in all groups.
Results: The perianastomotic tissue oxygen pressures, bursting pressures and levels of hydroxyproline were identified as significantly high in groups 2 and 4, administered a fraction of inspired oxygen of 80%, compared to groups 1 and 3, administered a fraction of inspired oxygen of 30%.
Conclusion: Perioperative supplemental oxygen contributes positively to the anastomotic healing.
[Ann Surg Treat Res 2015;89(1):17-22]

Key Words: Anastomosis, Wistar rats, Oxygen

INTRODUCTION

Anastomotic leak (AL) is the most distressing early complication of gastrointestinal anastomosis; it also requires frequent reoperation. Systemic situations such as anemia, diabetes mellitus, malnutrition, vitamin deficiencies, smoking, and steroid therapy increase the risk of AL [1]. Some local factors such as presence of irradiated bowel anastomose involving disease affected bowel and inadequate blood flow are associated with AL [1]. AL is also associated with technical issues that present on early postoperative days. Uncontrolled leakage with diffuse peritonitis causes high morbidity and mortality. Most of the general factors suggest that vasoconstrictive effects may be the cause of local ischemia, and dehiscence of anastomosis. One of the most important factors is perfusion and the state of local oxygenation of the gastrointestinal anastomoses.

Oxygen (O_2) is essential for oxidative metabolism and electron transport chain of living cells. Changes in O_2 concentration represent a fundamental physiological stimulus for all aerobic organisms. Intracellular O_2 concentration is maintained within a narrow range due to oxidative damages from hyperoxia or hypoxia. In fact, oxygen tension below 20 mmHg is significantly

Received November 13, 2014, **Revised** January 8, 2015, **Accepted** January 21, 2015

Corresponding Author: Volkan Genc
Department of General Surgery, Ankara University Medical School, Turan Gunes Bulvari, 180/K No: 28 Oran, 06450, Cankaya, Ankara, Turkey
Tel: +90-312-5082435, **Fax:** +90-312-3093989
E-mail: volkangenc77@yahoo.com

The study has been presented orally at "2nd International Conference on E-Health and Telemedicine" (22-24 May 2014, Istanbul, Turkey).

Copyright © 2015, the Korean Surgical Society

Annals of Surgical Treatment and Research is an Open Access Journal. All articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.