ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SPORADİK KOLOREKTAL KANSERLERDE EPİGENOMİK VE TRANSKRİPTOMİK PROFİLİN ENTEGRASYONU

Edibe Ece Abacı

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Hilal Özdağ

Eylül

2020

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.

Edibe Ece Abacı

İmzası

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Sporadik Kolorektal Kanserlerde Epigenomik ve Transkriptomik Profilin Entegrasyonu

Edibe Ece Abacı

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Hilal Özdağ

Kolorektal kanser (KRK) yüksek ölüm oranına sahip, dünya genelinde en sık görülen üçüncü kanserdir. Moleküler patogenezi çok çalışılmış olmasına rağmen, multifaktöriyel bir hastalık olan KRK'de hala aydınlatılmamış birçok nokta bulunmaktadır. Sistem biyolojisi yaklaşımı, genomik, transkriptomik, epigenomik ve metabolomik dahil olmak üzere çeşitli omik verilerin bir araya getirilerek, multifaktöriyel hastalıkların mekanizmalarının aydınlatılmasına olanak sağlamaktadır. Bu çerçevede omik verilerin entegrasyonu KRK patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayan, teşhiş, prognoz ve tedavide kullanılabilecek yeni biyobelirteçlerin tanımlanması için kullanılan önemli bir yaklaşımdır.

Bu tez kapsamında sporadik KRK'ya yönelik epigenomik ve transkriptomik verilerin entegrasyonu ile, bu hastalık için kullanılabilecek biyobelirteçlerin tanımlanması amaçlanmıştır. Meta analiz yöntemi ile KRK'da bulunan global miRNA profilleri biraraya getirilerek analiz edilmiş ve böylece KRK'da ifadesi değişen miRNA'lar ve hedefledikleri genler tanımlanmıştır. Hedef genlerin tanımlanması aşamasında elde edilen miRNA profilleri ekibimizin önceki çalışmasında elde edilmiş olan 50 eşli KRK tümör-sağlıklı FFPE tümör örneklerinin transkriptom profili ile entegre edilmiştir. Ardından belirlenen genlerin ifade değişimleri qRT-PCR ile KRK tümör ve eşleştirilmiş sağlıklı FFPE dokulardan izole edilen RNA örnekleri üzerinden valide edilmiştir.

qRT-PCR analizleri sonucunda miRNA çalışmasından bağımsız olarak seçilen *SPP1* geninin yüksek ifade seviyesi doğrulanmıştır. hsa-miR-1-3p'in tümör dokusundaki düşük seviyede ifadesinin yanısıra hsa-miR-145- 5p ve hsa-miR-1-3p tarafından regüle edildiği düşünülen *COL5A1, FN1, CD44, CCND1*, *VEGFA* genlerinin ifadesindeki artış valide edilmiştir. *COL1A1* ve *BCL2L1* genlerinin yüksek ifade seviyeleri valide edilmiştir ancak bu genleri regüle eden hsa-miR-133a-3p ifade değişimi ve önceki çalışmalarda valide edilen hsa-miR-182-5p'nin hedefi olan *THBS1*'in ifade değişimi qRT-PCR analizleri sonucunda anlamsız bulunmuştur. Hücre dışı matris yapısının oluşmasını sağlayan *COL1A1* ve *COL5A1* genlerinin yüksek ifade seviyelerinin KRK karsinogenezinde; *FN1*, *CD44* genlerinin yüksek ifade seviyelerinin tümör gelişiminde; *CCND1*, *VEGFA*, *BCL2L1* genlerinin ise apoptoz, proliferasyon gibi süreçlerde etkili olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak bu genler KRK'da kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır.

2020, 116 sayfa

Anahtar kelimeler: Sporadik kolorektal kanser, miRNA, omik entegrasyon, biyobelirteç, meta analiz, qRT-PCR

ABSTRACT

Master Thesis

Integration of Epigenomics and Transcriptomics Profiles in Colorectal Cancer

Edibe Ece Abacı

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Hilal Özdağ

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly occurring cancer worldwide with high mortality rates. Although its molecular pathogenesis has been extensively studied, there are still some unclear points in CRC, which is a multifactorial disease. The systems biology approach enables the elucidation of the mechanisms of multifactorial diseases by combining various omics technologies, including genomics, transcriptomics, epigenomics and metabolomics. In this context, the integration of omics data is an important approach that provides a better understanding of CRC pathogenesis and is instrumental to identify new biomarkers that can be used in diagnosis, prognosis and treatment.

Within the scope of the thesis, it is aimed to identify new biomarkers with the integration of epigenomic and transcriptomic profiles of sporadic CRC cases. Public global miRNA profiles of CRC were downloaded for meta-analysis and miRNAs whose expression was altered in CRC along with their in silico mRNA targets were identified. These differentially expressed miRNA gene list where then integrated with the previously obtained mRNA expression profile of 50 CRC paired tumour and normal FFPE tissue samples by our group. Then, the expression changes of the selected genes were validated by qRT-PCR studies with RNA samples isolated from CRC tumour and healthy matched FFPE tissues.

As a result of qRT-PCR analysis, high expression level of *SPP1* gene, which was selected independently from miRNA study and low expression level of hsa-miR-1-3p in tumours and the increase in expression level of *COL5A1, FN1, CD44, CCND1, VEGFA* genes, which are thought to be regulated by hsa-miR-1-3p and hsa-miR-145-5p miRNAs, were validated. The high expression level of the *COL1A1* and *BCL2L1* genes was validated, but the change in expression of hsa-miR-133a-3p that regulates these genes was found insignificant. The change in expression of *THBS1*, the target of hsa-miR-182-5p which was validated in previous studies, was found insignificant. It was thought that high expression levels of *COL1A1* and *COL5A1* genes, which provide the formation of extracellular matrix structure, may be effective in CRC carcinogenesis, high expression levels of *FN1*, *CD44* genes in tumor development, and high expression levels of *CCND1, VEGFA, BCL2L1* genes in apoptosis and proliferation. As a result, these genes have been identified as potential biomarkers that can be used in CRC.

2020, 116 pages

Key words: Sporadic colorectal cancer, miRNA, omics integration, biomarker, meta-analysis, qRT-PCR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesi ile beni yönlendiren ve bana her konuda destek olan değerli danışmanım Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a,

Bursiyeri olduğum TÜBİTAK 116S501 numaralı proje yürütücüsü Doç. Dr. Ali Kemal OĞUZ'a,

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Sistem Biyolojisi İleri Araştırma Birimi' ne ve tüm çalışanlarına,

Tez çalışmamı destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (Proje no: 19L0415002),

Yüksek lisans eğitimim süresince birlikte çalışmaktan keyif aldığım genombilim ekibi üyeleri hocam Seda TAŞIR YILMAZ, arkadaşlarım Laleh MADAYEN ve Sülgün Charyyeva'ya,

Yüksek lisans eğitimimin bana kazandırdığı, çok sevdiğim canım arkadaşlarım Berşan Seçil DUREL, Betül Cansu YAZICI ve Onur BENDER'e

Koşulsuz destekleri ile her anımda yanımda olan, değerlerini kelimlelerle ifade edemeyeceğim annem Gülbahar ABACI, babam Cuma ABACI, canım kardeşlerim ve canım sevgilim Haydar ORUÇ'a

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN ..... **İ**

ÖZET ..... **İİ**

ABSTRACT ..... **İİİ**

TEŞEKKÜR ..... **İV**

İÇİNDEKİLER ..... **V**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **İX**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **Xİİ**

SİMGELER DİZİNİ ..... **Xİİİ**

1. GİRİŞ **1**

2. KURAMSAL TEMELLER **2**

2.1. KOLOREKTAL KANSER **2**

2.1.1. KOLOREKTAL KANSER EPİDEMİYOLOJİSİ 2

2.1.2. KOLOREKTAL KANSERİN KLİNİK PATOLOJIK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ 3

2.1.2.1. Dereceleme (Grade) 3

2.1.2.2. Evreleme (Stage) 4

2.1.2.3. Lokasyon 5

2.1.3. RİSK FAKTÖRLERİ 6

2.1.4. KOLOREKTAL KANSER ETİYOLOJİSİ 7

2.1.5. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ 8

2.1.5.1. Kolorektal Kanserin Moleküler Alttiplerine Göre Sınıflandırılması 10

2.1.5.1.1. Konsensus Moleküler Alt Tip Sınıflandırması 10

2.1.5.1.2. Entegre Moleküler Karakterizasyon Sınıflandırması (TCGA Sınıflandırması) 11

2.1.5.1.3. Kromozomal İnstabilite 12

2.1.5.1.4. Mikrosatellit İnstabilitesi 13

2.1.5.1.5. CpG Adacık Metilasyon Fenotipi 13

2.2. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER ALTTİPLERİNİN İLERİ ANALİZİ 14

2.2.1. TRANSKRİPTOMİK ANALİZLER VE KOLOREKTAL KANSER 14

2.2.2. KOPYA SAYISI ANALİZLERİ 15

2.2.3. METİLASYON ANALİZLERİ 16

2.2.4. META ANALİZ VE ENTEGRE OMİK ANALİZLER 17

2.3. KOLOREKTAL KANSERDE BİYOBELİRTEÇLER 19

2.3.1. KLASİK TÜMÖR BİYOBELİRTEÇLERİ 21

2.3.2. MOLEKÜLER BİYOBELİRTEÇLER 22

2.3.2.1. RAS 22

2.3.2.2. BRAF 24

2.3.2.3. APC 25

2.3.2.4. TP53 26

2.4. KOLOREKTAL KANSERDE PROGNOSTİK GEN PANELLERİ 27

2.4.1. COLOPRİNT 27

2.4.2. ONCOTYPE DX COLON 28

3. GEREKÇE VE AMAÇ 29

4. MATERYAL VE YÖNTEM 31

4.1. MATERYAL 31

4.1.1. MİKRODİZİN VERİSİ 31

4.1.2. HASTA MATERYALLERİ 32

4.1.3. HÜCRE HATTI 32

4.2. YÖNTEM 33

4.2.1. MİRNA MİKRODİZİN VERİLERİNİN ENTEGRE ANALİZİ 33

4.2.1.1. miRNA Verilerin Normalizasyonu, Filtrasyonu ve Karşılaştırılması 33

4.2.1.2. Ortak miRNA'ların Tespiti ve Hedeflerinin Belirlenmesi 34

4.2.1.3. mRNA Transkriptom Verilerinin Analizi 34

4.2.1.4. Farklı İfade Edilen mRNA Verilerimiz ile miRNA Hedeflerinin Entegrasyonu 34

4.2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ 34

4.2.2.1. Dondurulmuş hücrelerin açılması ve ekimi 35

4.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması 35

4.2.3. RNA İZOLASYONU 36

4.2.3.1. Parafine Gömülü Dokulardan Ayrıştırılan Tümör Ve Normal Hücrelerden RNA İzolasyonu 36

4.2.3.2. Hücre Hattından Rna İzolasyonu 38

4.2.3.3. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini 39

4.2.3.4. RNA Bütünlüğünün Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü 39

4.2.4. CDNA SENTEZİ 40

4.2.4.1. miRNA-cDNA Sentezi 40

4.2.4.2. mRNA-cDNA Sentezi 41

4.2.5. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR) 41

5. ARAŞTIRMA BULGULARI 44

5.1. MİRNA ENTEGRE ANALİZ BULGULARI 44

5.1.1. 109S477 TRANSKRİPTOM VERİLERİNİN ANALİZİ VE MİRNA ANALİZLERİ İLE ENTEGRASYONU 48

5.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYİ BULGULARI 51

5.3. RNA İZOLASYONU BULGULARI 51

5.4. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ BULGULARI 52

5.5. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR) BULGULARI 54

5.5.1. MİRNA-QRT PCR BULGULARI.....54

5.5.2. MRNA-QRT PCR BULGULARI.....54

6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....66

6.1. MİRNA ENTEGRE ANALİZ ÇALIŞMASININ DEĞERLENDİRİLMESİ 66

6.2. QRT-PCR ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ 68

6.2.1. MİR-1-3P VE HEDEF GENLERİ 68

6.2.2. MİR-145-5P VE HEDEF GENLERİ 70

6.2.3. MİR-133A-3P VE HEDEF GENLERİ 71

6.2.4. MİR-182-5P VE HEDEF GENİ.....72

6.2.5. SPP1.....72

6.3. SONUÇ.....73

7. KAYNAKLAR.....74

EKLER.....89

EK 1. FARKLI İFADE EDİLEN MİRNA'LAR, TERS KORELE GENLER VE BULUNDUKLARI YOLAKLAR.....89

EK 2. QRT-PCR REAKSİYONLARINDA KULLANILAN PRİMER BİLGİLERİ.....94

EK 3. ETİK KURUL KARARI 95

ÖZGEÇMİŞ 97

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dünya 2018 kanser türlerinin insidans oranları, tüm cinsiyetler, tüm yaşlar 2

Şekil 2.2. Türkiye 2018 KRK vakaları, tüm cinsiyetler, tüm yaşlar.....2

Şekil 2.3. Türkiye 2018 yılı, kadınlarda (A) ve erkeklerde (B) kanser vaka oranları 3

Şekil 2.4. Kolon karsinomunun farklı dediferansiyasyon durumları.....4

Şekil 2.5. Evreleme sisteminin şekilsel anlatımı 5

Şekil 2.6. Kolorektal kanserde karsinogenez süreci 9

Şekil 2.7. Anti-EGFR hedefli tedavi mekanizması.....24

Şekil 2.8. 12 gen kolon kanser nüks skoru ve algoritması 28

Şekil 4.1. Yöntem iş akışı.....33

Şekil 5.1. Affymetrix veri setlerinde farklı ifade edilen miRNA'ların Volcano plot grafiği 45

Şekil 5.2. Agilent veri setlerinde farklı ifade edilen miRNA'ların Volcano plot grafiği 47

Şekil 5.3. Affymetrix ve Agilent verilerinde ortak bulunan miRNA sayısı.....47

Şekil 5.4. Gen listesinde zenginleşen yolaklar 48

Şekil 5.5. ECM-reseptor etkileşim yolağında bulunan önemli genler.....49

Şekil 5.6. Caco-2 hücreleri invert mikroskop görüntüleri.....51

Şekil 5.7. İzole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi 53

Şekil 5.8. CaCo-2 hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ..53

Şekil 5.9. miR-1-3p ve miR-133a-3p'nin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi 54

Şekil 5.10. **A-***COL1A1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *COL1A1* genine ait erime eğrileri **C**- *COL1A1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....55

Şekil 5.11. **A-***COL5A1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *CO51A1* genine ait erime eğrileri **C-** *COL5A1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 56

Şekil 5.12. **A-***FN1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *FN1* genine ait erime eğrileri **C-** *FN1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....56

Şekil 5.13. **A-***CD44* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *CD44* genine ait erime eğrileri **C-** *CD44* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 57

Şekil 5.14. **A-***CCND1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *CCND1* genine ait erime eğrileri **C-** *CCND1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 58

Şekil 5.15. **A-***SPP1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *SPP1* genine ait erime eğrileri **C-** *SPP1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 58

Şekil 5.16. **A-***VEGFA* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *VEGFA* genine ait erime eğrileri **C-***VEGFA* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 59

Şekil 5.17. **A-***BCL2L1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *BCL2L1* genine ait erime eğrileri **C-** *BCL2L1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....59

Şekil 5.18. **A-***THBS1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *THBS1* genine ait erime eğrileri **C-** *THBS1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 60

Şekil 5.19. *COL1A1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$)...61

Şekil 5.20. *COL5A1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$)...61

Şekil 5.21. *FN1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$).....62

Şekil 5.22. *CD44* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$) 62

Şekil 5.23. *CCND1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$) 63

Şekil 5.24. *VEGFA* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$) 63

Şekil 5.25. *BCL2L1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$) ...64

Şekil 5.26. *THBS1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p>0,05$) 64

Şekil 5.27. *SPP1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$).....65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kolorektal kanserde evreleme sistemleri 5

Çizelge 4.1. miRNA entegre analiz çalışmasında kullanılan veri setleri 31

Çizelge 4.2. CaCo-2 hücre hattı kültür besiyeri içeriği 35

Çizelge 4.3. Bir örnek için reverse transcriptase reaksiyonunun kurulumu 40

Çizelge 4.4. Bir örnek için cDNA sentezi denatürasyon reaksiyonu kurulumu 41

Çizelge 4.5. Bir örnek için reverse transcriptase reaksiyonunun kurulumu 41

Çizelge 4.6. Bir örnek için miRNA qRT-PCR reaksiyon bilgileri 42

Çizelge 4.7. miRNA-qRT-PCR program bilgileri 42

Çizelge 4.8. Bir örnek için mRNA qRT-PCR bilgileri 42

Çizelge 4.9. mRNA qRT-PCR program bilgileri 42

Çizelge 5.1. Affymetrix verilerinde ifadesi artan miRNA'lar 44

Çizelge 5.2. Affymetrix verilerinde ifadesi azalan miRNA'lar 44

Çizelge 5.3. Agilent verisetinde ifadesi değişen miRNA'lar 46

Çizelge 5.4. ECM yolağında bulunan genler, regüle edildikleri miRNA'lar ve ifade değişim değerleri 49

Çizelge 5.5. miRNA entegre analiz çalışması sonucunda seçilen miRNA'lar ve hedefledikleri genler 50

Çizelge 5.6. RNA izolasyon sonuçları 52

Çizelge 5.7. miRNA qPCR analiz sonuçları 54

Çizelge 6.1. Meta analiz çalışmasının sonucunda seçilen miRNA-mRNA çiftleri 68

Çizelge 6.2. qRT-PCR sonucunda kat değişimleri 68

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
APC	Adenomatöz polipoz koli
ATCC	American Type Culture Collection
BCL2L1	BCL2-like 1
Bp	Baz çifti
CA 19-9	Karbonhidrat antijeni
CCND1	Cyclin D1
CEA	Karsinoembriyonik antijen
$CHCl_3$	Kloroform
CIMP	CpG adacık metilasyon fenotipi
CIN	Kromozom instabilitesi
CMS	Konsensus moleküler alt tip
COL1A1	Kollajen tip 1 α 1
COL5A1	Kollajen tip V α 1
CSC	Kolorektal kanser kök hücreler
ddH_2O	Çift distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı

DNAMT	DNA metiltransferaz
ECM	Hücre dışı matris
EMT	Epitelyal-mezenkimal geçiş
FAP	Ailesel adenomatöz polipozis
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin Embedded
FN1	Fibronektin 1
FOBT	Fekal gizli kan testi
GEO	Gene Expression Omnibus
HCEC	İnsan kolonik epitelyal hücre hattı
HPNCC	Herediter non-polipozis kolorektal kanser
KRK	Kolorektal kanser
MMR	Yanlış onarım tamir mekanizması
MSI	Mikrosatellit instabilitesi
Ng	Nanogram
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
TCGA	Kanser Genom Atlası

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK), kanser nedenli ölümler arasında dünya genelinde üçüncü sırada yer almakta ve görülme sıklığı gelişmekte olan ülkelerde giderek artmaktadır. 2018 yılında yaklaşık 2 milyon yeni KRK vakası tanımlanmıştır, ayrıca yaklaşık 1 milyon KRK sebepli ölüm bulunmaktadır (1). KRK oluşumuna neden olan mekanizmalar tam olarak bilinmese de çevresel, genetik ve epigenetik faktörlerin içinde bulunduğu çeşitli risk faktörleri belirlenmiştir (2). Yaş ve beslenmenin yanısıra fiziksel aktivite eksikliği, sigara kullanımı, aşırı alkol alımı ve obezite gibi faktörler KRK riskini arttırmaktadır (3). Bu nedenle KRK multifaktöriyel, kompleks bir hastalıktır. Etkili tedavi yönteminin seçilebilmesi için kompleks olan bu gelişim sürecinin aydınlatılması çok önemlidir. Bu kapsamda, tümör gelişim sürecinin takibini ve öngörüsünü kolaylaştıracak biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyobelirteçler kanserin erken tanısı ve kişiselleştirilmiş kanser tedavisinde kullanılan etkin biyolojik araçlardır. Düşük maliyetli ve ayrım gücü yüksek biyobelirteçlerin tanımlanması hem genel kanser tarama testleriyle erken teşhisi mümkün kılmakta hem de hastalığın takibi ve tedavi sürecinin planlanmasını kolaylaştırmaktadır. Özellikle KRK gibi heterojen yapıya sahip ve erken teşhis edildiğinde başarılı tedaviyle sonuçlanan kanserler için ayrım gücü yüksek biyobelirteçlerin tanımlanması önem arz etmektedir.

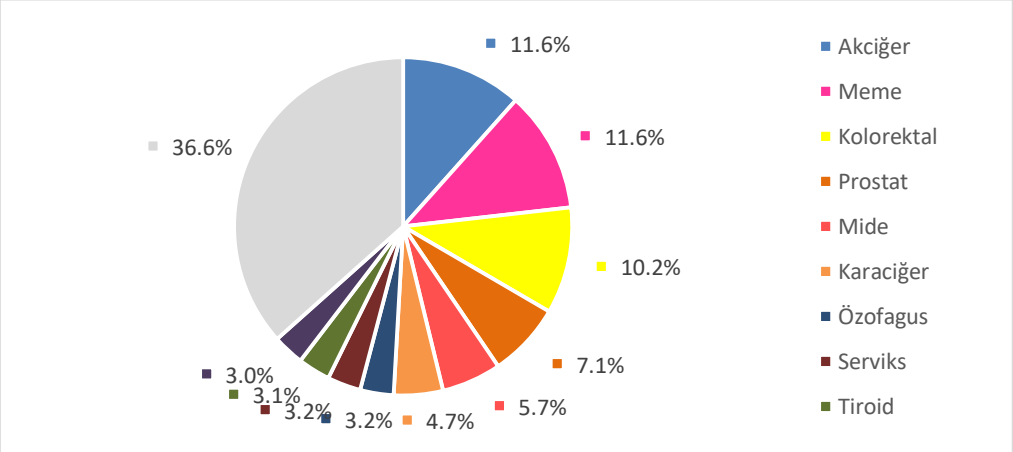
Kolorektal kansere yönelik rutinde kullanılan ve literatürde aday olarak bildirilen biyobelirteçler olmasına rağmen hastalığın karmaşık gelişim süreçleri nedeniyle mevcut biyobelirteçler yetersiz kalmaktadır. Bu kapsamda hastalığın gelişim sürecini sistem biyolojisi yaklaşımı ile değerlendirerek gelişim sürecinde anahtar rol oynayan biyomoleküllerin tanımlanması önem arz etmektedir. Özellikle omik yaklaşım ile entegre analizler kullanılarak tasarlanan çalışmalar ayrım gücü yüksek biyobelirteçlerin tanımlanması için önemli bir basamaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

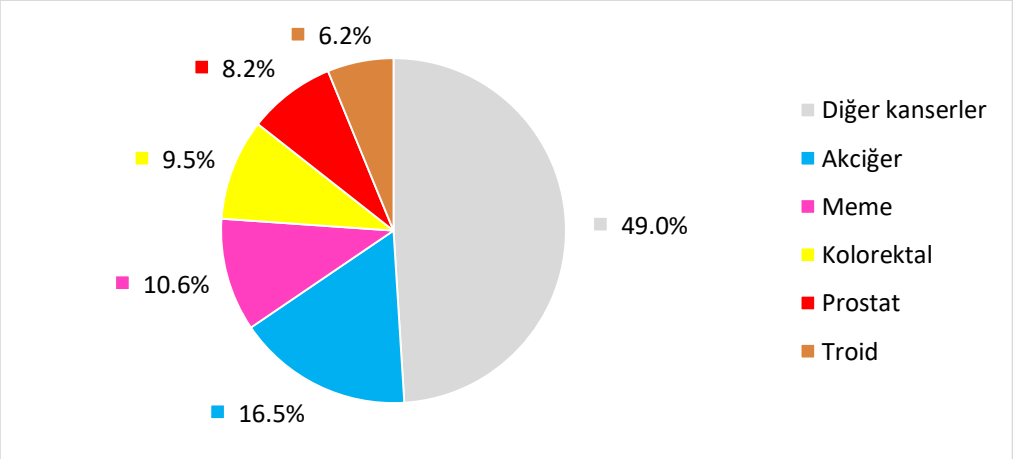
2.1. KOLOREKTAL KANSER

2.1.1. KOLOREKTAL KANSER EPİDEMİYOLOJİSİ

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, kolorektal kanser akciğer kanseri ve meme kanserinden sonra dünyada görülen üçüncü en yaygın kanserdir. (Şekil 2.1.) Dünyada kanser sebepli ölümlerde ise KRK akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. 2018 yılında yaklaşık 1,8 milyon yeni KRK vakası ve KRK nedenli 861,000 ölüm kaydedilmiştir. (4). Gelişmiş ülkelerde kolon ve rektal kanser riski gelişmekte olan ülkelere göre daha fazla görülmektedir. Kolon kanserinin en sık görüldüğü ülkeler Güney Avrupa, Avustralya / Yeni Zelanda ve Kuzey Avrupa'dır. Rektal kanserinde ise bu bölgeler Doğu Avrupa, Avustralya / Yeni Zelanda ve Doğu Asya şeklinde gözlenmektedir (4).

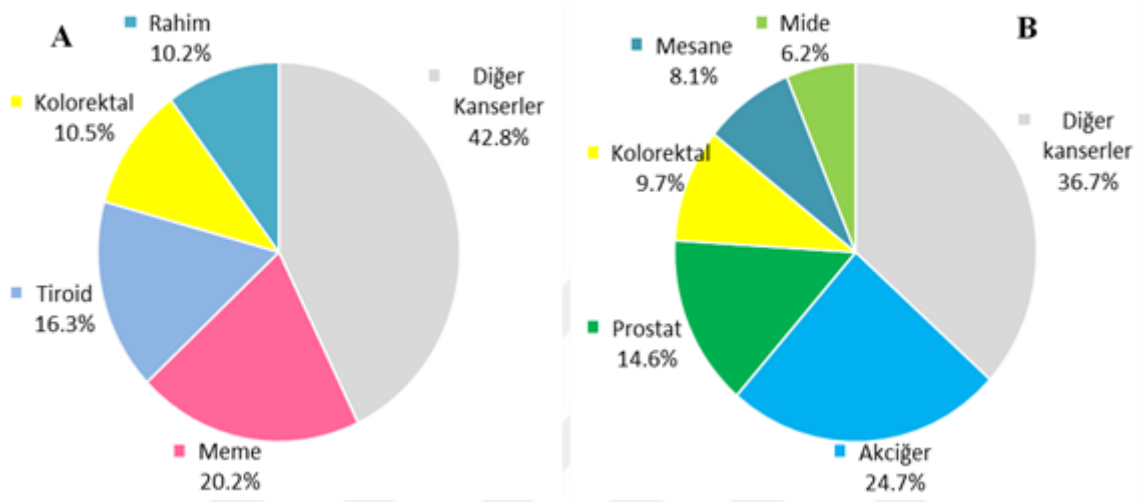


Şekil 2.1. Dünya 2018 kanser türlerinin insidans oranları, tüm cinsiyetler, tüm yaşlar



Şekil 2.2. Türkiye 2018 KRK vakaları, tüm cinsiyetler, tüm yaşlar

GLOBOCAN 2018 verilerine göre Türkiye'de 210,537 yeni kanser vakası, 20,031 KRK vakası tanımlanmıştır. Kanser sebepli ölümlerin sayısı ise 116,710 iken KRK sebepli ölümlerin sayısı 9,996'dır. Türkiye'de KRK, akciğer ve meme kanserinden sonra en çok görülen üçüncü kanserdir (Şekil 2.2.) (4). KRK, kadınlarda meme ve tiroid kanserinden sonra, erkeklerde ise akciğer ve prostat kanserinden sonra en yaygın olan üçüncü kanserdir (.).



Şekil 2.3. Türkiye 2018 yılı, kadınlarda (A) ve erkeklerde (B) kanser vaka oranları

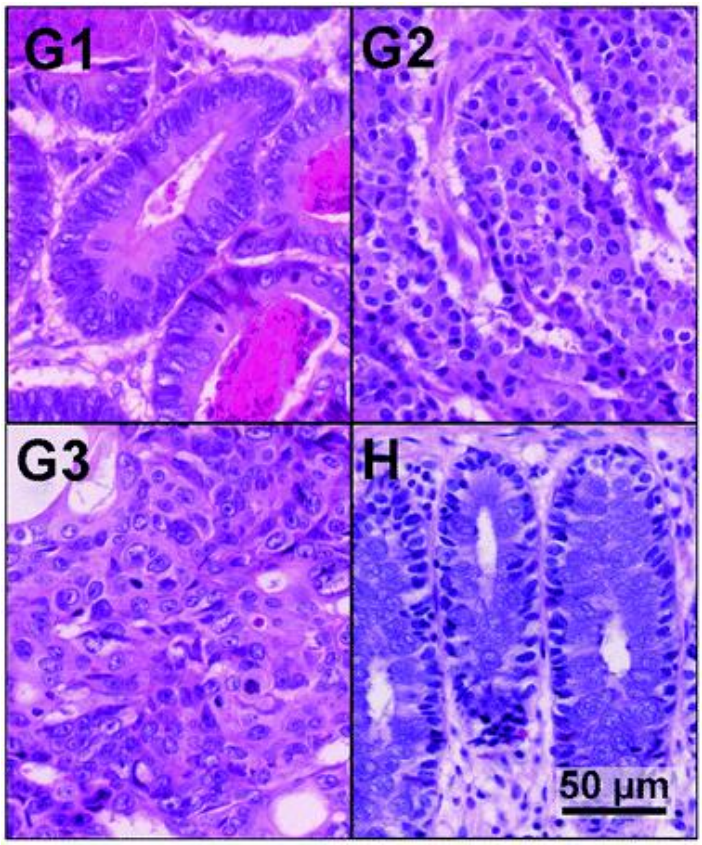
2.1.2. KOLOREKTAL KANSERİN KLİNİK PATOLOJIK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ VE PROGNOZLA İLİŞKİSİ

2.1.2.1. Dereceleme (Grade)

Kolorektal kanserin derecelendirilmesi kanser hücresinin farklılaşma oranına göre yapılmaktadır. Normal dokuda bulunan hücreler dokuya özgü görevlerini yerine getirebilmek için o dokuya özgü farklılaşırlar. Ancak kanser hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybeder. Kanser hücreleri sahip oldukları görevden uzaklaşırlar yani 'dediferansiye' olurlar.

Tümörlerin farklılaşması tümör hücreleri tarafından beze veya tübül oluşumunun alan oranı ile belirlenmektedir. Tümörün farklılaşma derecesi adenomkarsinomlara uygulanabilmektedir. Tümör farklılaşmasının, adenokarsinom bulunduran hastaların prognozunda etkili olduğu gösterilmiştir (5, 6). Tümör derecelendirilmesi yapılırken tercihen düşük dereceli (low-grade) ve yüksek dereceli (high-grade) iki katmanlı sistem kullanılmaktadır (7). 3 katmanlı dereceleme (grading) sisteminde ise tümörün farklılaşması,

iyi diferansiye (well differentiated->%95 beze oluşumu), orta diferansiye (moderately differentiated- %50-%95 beze oluşumu) ve kötü differansiye (poorly differentiated- <%50 beze oluşumu) şeklinde derecelendirilmektedir. (7, 8)



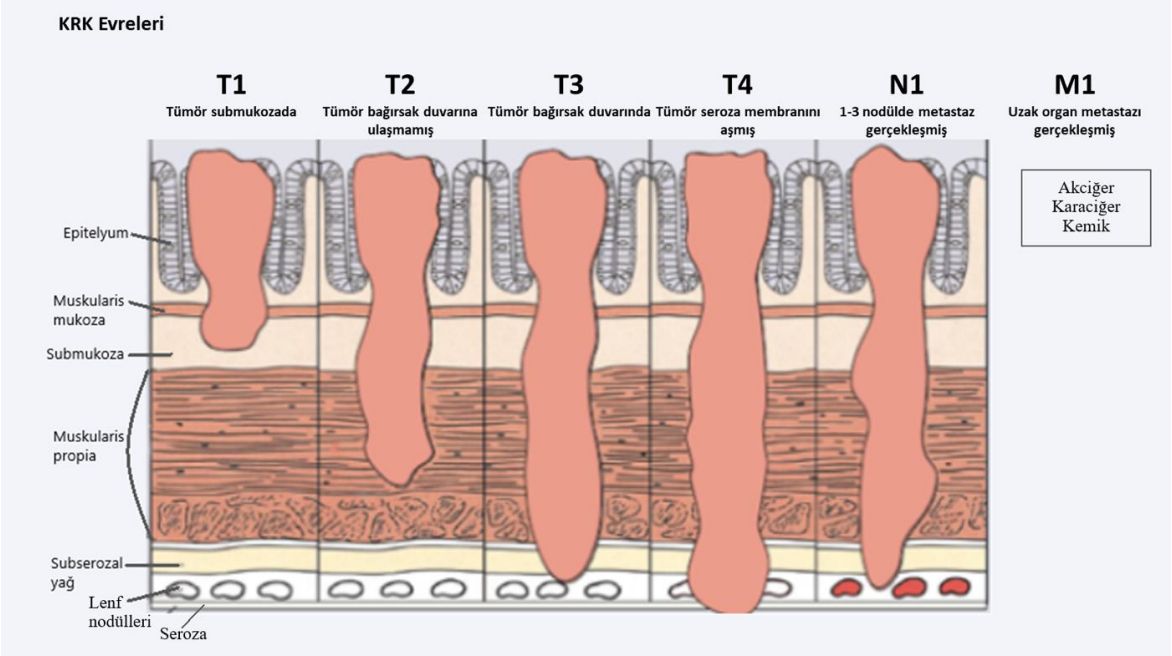
Şekil 2.4. Kolon karsinomunun farklı dediferansiyasyon durumları (9)

G1 iyi farklılaşmış (well differentiated), G2 orta derecede farklılaşmış (moderately differentiated), G3 kötü farklılaşmış (poor differantiated), H sağlıklı dokuyu ifade etmektedir (Şekil 2.4.).

2.1.2.2. Evreleme (Stage)

Evreleme sistemi (TNM classification), Amerika Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Savaş Örgütü (UICC) tarafından tasarlanmıştır. Evreleme, hastaları sınıflandırmak için kullanılan en güvenilir prognostik parametredir. TNM sistemi, tümör invazyonunun kolon duvarı boyunca derinliği (T), etkilenen lenf nodüllerinin sayısı (N) ve metastaz varlığını (M) temsil etmektedir. TNM sınıflandırılmasında tümörler farklı prognostik ve terapotik sonuçlara göre 4 farklı evreye ayrılmaktadırlar. Kolorektal kanser için Evre-1 tümörlerin 5 yıllık sağkalım oranı %94, evre-2 tümörlerde ise %82'dir. Bu oran

evre-3 tümörlerde %67’ ye düşmektedir. Metastastik ya da evre-4 tümörlerde 5 yıllık hayatta kalım oranı %11’dir (10).



Şekil 2.5. Evreleme sisteminin şekilsel anlatımı (11)

Çizelge 2.1. Kolorektal kanserde evreleme sistemleri

Evre	TNM Seviyeleri	Dukes	MAC
0	Tis N0 M0	-	-
I	T1 N0 M0	A	A
	T2 N0 M0		B1
IIA	T3 N0 M0	B	B2
IIB	T4a N0 M0		B2
IIC	T4b N0 M0		B3
IIIA	T1-T2 N1 MO	C	C1
	T1 N2a M0		C1
IIIB	T3-T4a N1 M0	C	C2
	T2-T3 N2a M0	C	C1/C2
	T1-T2 N2b M0	C	C1
IIIC	T4a N2a M0	C	C2
	T3-T4a Nb M0	C	C2
	T4b N1-N2 M0	C	C3
IVA	Herhangi T-N M1a	-	-
IVB	Herhangi T-N M1b	-	-

2.1.2.3. Lokasyon

Kolorektal kanser patogenezini etkileyen diğer bir faktör tümörün lokasyonudur ve kolonun sağ ve sol taraflarında farklılık gösterir. Proksimal kolondaki (sağ taraf) ve distal kolondaki

(sol taraf) tümörler farklı moleküler özellikler ve histoloji sergiler. Sağ taraftaki tümörlerde, DNA uyumsuzluğu (mismatch) tamir yolundaki mutasyonlar sıklıkla gözlenir ve bu tümörler genellikle yassı bir histolojiye sahiptir. Sol taraftaki tümörlerde ise *KRAS, APC, PIK3CA, p53* genleri gibi kromozomal instabilite yolağında yer alan genlerde mutasyonlar gözlenir ve bu tümörler polipoid benzeri morfoloji gösterir. Uygulanan terapilere alınan cevap tümör lokasyonları arasında tamamen farklıdır. Sol taraflı kolorektal kanser (LCRC) hastaları, 5-fluorourasil (5-FU) bazlı rejimler gibi adjuvan kemoterapilerden ve anti-epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) terapisi gibi hedeflenen tedavilerden daha fazla yararlanır ve daha iyi prognoz gösterirler. Sağ taraflı kolorektal kanser (RCRC) hastaları konvansiyonel kemoterapilere iyi cevap vermezler, ancak bu tümörler yüksek antijenik yüke sahip olduklarından immünoterapilerde daha umut verici sonuçlar gösterir. Etkili terapi rejimlerinin geliştirilmesi ve daha iyi tedavi seçenekleri için, sağ ve sol taraflı tümörleri ayrı durumlar olarak değerlendirmek ve bu tümörler arasındaki farkları göz önünde bulundurarak terapi yöntemini belirlemek gerekir (12).

2.1.3. RİSK FAKTÖRLERİ

Kolorektal kanserde birden çok faktör etkilidir, spesifik tek bir sebebi yoktur. Yaş, cinsiyet, etnik köken, kalıtsal mutasyonlar gibi faktörler KRK'ya sebep olan ve değiştirilemeyen faktörlerdir. Yaş en etkili risk faktörlerinden biridir. 50 yaş sonrası KRK gelişme riski önemli ölçüde artmaktadır. Yaşa dayalı insidans ve ölüm oranları erkeklerde kadınlara göre sırasıyla 1,4 ve 1,5 kat daha yüksektir. KRK vakalarının yaklaşık %25'inde ailede KRK öyküsü vardır. Bu gruba dahil edilebilecek diğer bir risk faktörü, özellikle tanı sırasında 50 yaşın altındaki vakalarda pozitif bir ailevi KRK öyküsünün varlığıdır. Ailesel geçmişe bağlı olarak artan KRK riski, kalıtsal mutasyonlardan ya da çevresel faktörlerden kaynaklanabilmektedir. Kalıtsal faktörler, Crohn's hastalığı ve ülseratif kolit gibi enflamatuar bağırsak hastalıkları ve kolonda bulunan polipler KRK insidansının artışı ile ilişkilidir (13).

Diğer risk faktörleri yaşam şekliyle ilişkili olan, değiştirilebilir faktörlerdir. Beslenme KRK riskiyle ilişkili önemli bir faktördür. Obezite, yüksek miktarda kırmızı et ve alkol tüketimi, sigara kullanımı, sağlıksız beslenme alışkanlıkları KRK ile önemli derecede ilişkilidir. Buna karşın vejeteryan beslenme, lifli gıdalar tüketimi, balık ve kalsiyum tüketimi KRK riskinin azalması ile ilişkilendirilmiştir. Yaşam tarzıyla ilişkili diğer bir faktör fiziksel aktivitedir.

Fiziksel aktivitenin az olduğu sedanter yaşam tarzının KRK riskini arttırdığı düşünülmektedir (14, 15).

2.1.4. KOLOREKTAL KANSER ETİYOLOJİSİ

Spesifik genlerdeki mutasyonlar diğer kanser türlerinde olduğu gibi kolorektal kanserin başlamasına yol açabilir. Bu mutasyonlar onkojenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım mekanizmalarına bağlı genlerde ortaya çıkabilir. Mutasyonun kökenine bağlı olarak, kolorektal karsinomlar sporadik, kalıtsal ve ailesel olarak sınıflandırılabilir (15).

Yaşam boyunca ortaya çıkan nokta mutasyonları kalıtsal sendromlarla ilişkili değildir ve sadece bireysel hücreleri ve onların soyundan gelenleri etkiler. Ailesel ya da kalıtımsal KRK öyküsü bulunmadan gelişen kanserlere sporadik kanserler denir ve kolorektal kanserlerin yaklaşık %70'ini oluşturur. Sporadik kanserin moleküler patogenezi mutasyonlar farklı genleri hedef alabildiğinden heterojendir. Kolorektal kanser vakalarının %70 oranında belirli mutasyonlar dizisi oluşmaktadır, daha sonra bu mutasyon dizisi bir adenom oluşumuyla başlayan ve karsinoma durumuna son veren spesifik bir morfolojik sekansa dönüştürülür. İlk olarak Fearon ve Vogelstein'in önerdiği bu çok iyi çalışılmış modelde ilk mutasyon, polip olarak da adlandırılan malign olmayan adenomların oluşumunu tetikleyen bir tümör baskılayıcı gen olan adenomatöz polipoz koli (APC)'de ortaya çıkar. Bu adenomların yaklaşık %15'inin on yıllık bir süre içerisinde karsinoma durumuna dönüşmektedir. Bu APC mutasyonunu *KRAS, TP53* ve son olarak *DCC*'deki mutasyonlar izler (15).

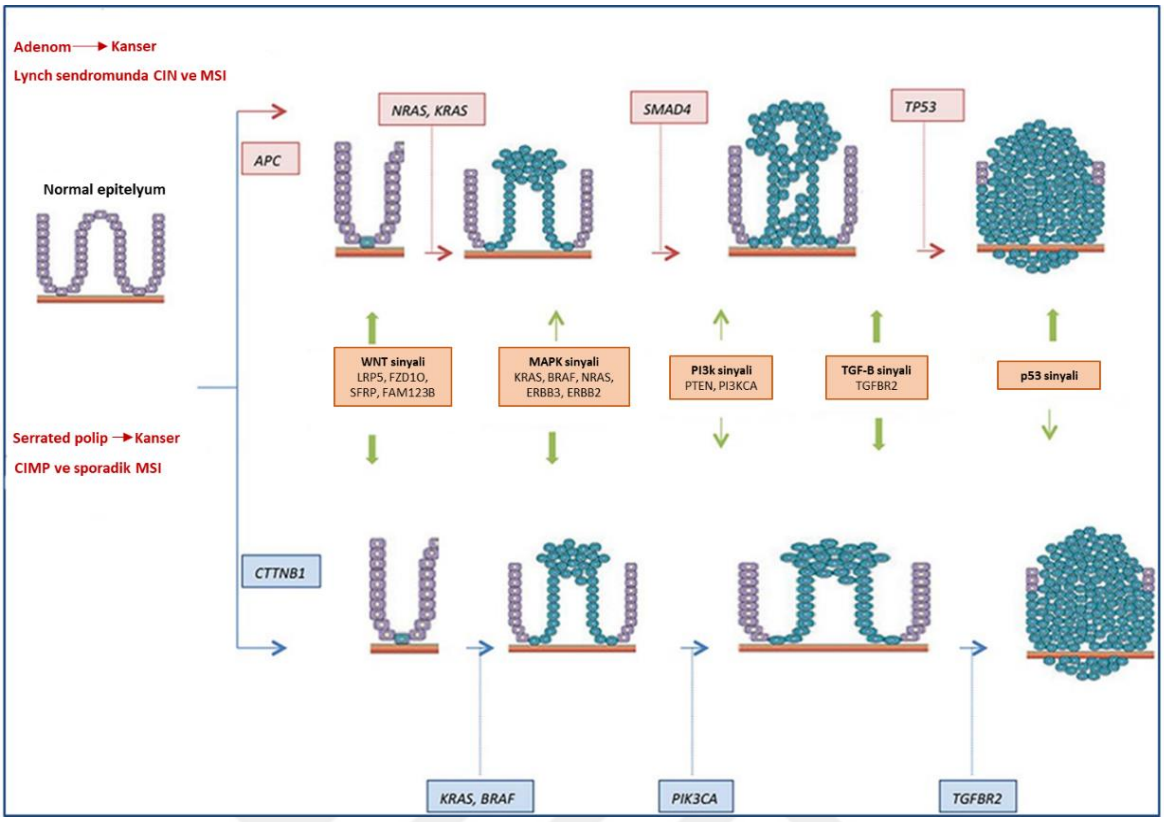
Kalıtımsal kanserler tüm kanser vakalarının yalnızca %5'ini oluşturur. Bu kanserler, mutasyona uğramış genin alellerinden birini etkileyen kalıtsal mutasyonlardan kaynaklanır, yani diğer alleldeki nokta mutasyonu, tümör hücresinin ve daha sonra karsinomun ortaya çıkmasını tetikler. Kalıtsal kanserlerin daha doğru bir sınıflandırmasını oluşturmak için, polipozis ve polipozis olmayan formlar olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Polipoz varyantı esas olarak, kolonda çoklu potansiyel olarak malign poliplerin oluşması ile karakterize edilen ailesel adenomatöz polipozis (FAP) içerir. Ancak kalıtsal polipsiz kolorektal kanser (HNPCC), DNA onarım mekanizmalarındaki mutasyonlarla ilişkilidir. HNPCC'nin ana nedeni, *MSH2, MLH1, MLH6, PMS1* ve *PMS2* gibi DNA onarım proteinlerini kodlayan allellerden birinde kalıtsal mutasyonların neden olduğu Lynch sendromudur. Lynch sendromu tüm kolorektal kanser vakalarının %2-3'ünde bulunabilir ve bu nedenle HNPCC grubunda en sık görülen sendromdur (16). Ailesel kolorektal kanser tüm

vakaların yaklaşık %25'ini oluşturur ve kalıtsal mutasyonlara da neden olurlar, buna rağmen bu olgular kalıtsal olmayan herhangi bir kanser varyantına dahil edilemediklerinden kalıtsal kanserler olarak sınıflandırılmazlar (17).

2.1.5. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Kolorektal kanser insidansı ve mortalitesi yüksek, gelişmesi yıllar alan sessiz bir hastalıktır. Birçok insan kanser metastaz yapana kadar intestinal kanama ya da karın ağrısı gibi klinik belirtiler göstermemektedir. Adenomun karsinomaya dönüşümü için yaklaşık 7-10 yıl süre gerekmektedir. 1990 yılında Fearon ve Vogelstein onkogenler ve tümör baskılayıcı genleri içeren kolorektal kanser oluşumunun çok aşamalı moleküler mekanizmasını formüle ettiğinden beri, kolorektal karsinogenezin anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Kolorektal kanser genetik olduğu kadar epigenetik faktörlere de bağlı poligenik bir hastalıktır. Genetik faktörler onkogenler, tümör baskılayıcı genler, yanlış eşleşme onarım genleri ve kolon mukozasında bulunan hücrelerin hücre döngüsünü düzenleyen genlerindeki bir seri genetik değişikliktir. Bu değişiklikler çok adımlı adenomdan karsinom gelişmesi sürecini etkileyen, kolorektal kanser başlangıcı ve ilerlemesinde önemli yolakları etkilemektedir (18). Karsinogenezle sonuçlanan bu genetik değişikliklere neden olan üç ana moleküler yolak bulunmaktadır. Bu yolaklar, kromozomal instabilite, mikrosatellit instabilite ve CpG adacık metilasyon fenotipidir.

Kolorektal karsinogenizinde adenomların oluşması *APC* genindeki mutasyon sebebiyle başlamaktadır. Bu mutasyonlar hücresel proliferasyona sebep olan C-myc onkogeninin overexpresyonuna sebep olmaktadır. İkinci önemli adım ise *KRAS/ BRAF* genlerindeki mutasyonlardır. Bu mutasyonlar DNA onarım sistemlerinde inhibisyona yol açmaktadır. Bu mutasyonları kromozomun 18q konulun kaybı ve bununla birlikle SMAD4 kaybı takip etmektedir. 18q delesyonu transforme edici büyüme faktörünü -β (TGFβ) etkilemektedir. Bu değişikleri p53 ve genindeki mutasyonlar izlemektedir. p53 ve *PTEN* genleri gibi kritik genlerin epigenetik metilasyonu tümör oluşumunu tetiklemektedir. Ayrıca, mRNA'nın miRNA'lar tarafından degredasyonu da KRK karsinojenezinde rol oynar (Şekil 2.6.) (19).



Şekil 2.6. Kolorektal kanserde karsinogenez süreci (18)

Kolorektal kanser kök hücreler (CSC'ler), genetik değişiklikler sebebiyle farklılaşan ve malign transformasyona sebep olan intestinal hücrelerinden veya intestinal kök hücrelerinden (ISC) türemektedirler. Kolorektal CSC'ler kendi kendini yenileme ve çok yönlü farklılaşma potansiyeline sahiptir. Ayrıca Wnt, Notch ve Hedgehog gibi sinyal yolaklarının anormal aktivasyonu, tümör oluşturma ve ilaç veya radyasyon direnci gibi özelliklere sahiptir. Kolorektal CSC'ler aynı zamanda sonsuz bölünme, telomeraz aktivitesi ve organa özgü farklılaşma gibi normal bağırsak kök hücrelerinin birçok özelliğini de paylaşmaktadırlar. Kolorektal CSC'ler birkaç yüzey belirteci ile tanımlanmaktadırlar. Bu yüzey belirteçlerinden başlıcaları, CD44, CD133, CD166, Lgr5, ALDH1 ve EpCAM'dir (20).

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) karsinomların heterojen yapısında rol alan çok önemli bir faktördür. Bu gelişimsel süreç KRK'da sıklıkla yeniden aktifleştirilir ve heterojen tümör hücre fenotipinin oluşmasına katkı sağlamaktadır. EMT agresif tümör hücresi ile ilişkilidir ve antikanser ilaçlarına karşı direnç kazandırmaktadır. CSC ve EMT metastatik KRK gelişimde anahtar rol oynamaktadırlar. Kolorektal CSC'ler veya EMT yoluyla göç potansiyeli olan tümör hücreleri tümör bölgesinden ayrılıp, damarlar içine aktarılırlar. Bu hücreler dolaşım boyunca hayatta kalarak karaciğer ve akciğer gibi organlara aktarılırla.

Böylece metastaz gelişimine sebep olurlar (21). KRK tedavisinde kullanılan ameliyat, radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel tedavi yöntemlerine direnç bulunması kanser ölümlerinin başlıca sebebidir. Yapılan çalışmalar bu tedavi yöntemlerinin EMT yolu ile daha agresif kanser hücrelerinin oluşmasına ve metastaz yapabilen, tedaviye dirençli daha fazla CSC'lerin oluşmasına sebep olabileceğini göstermiştir. Bundan dolayı CSC'yi terapötik olarak hedefleme ihtiyacı oluşmuştur. EMT ve CSC'ler agresif tümör biyolojisi ve tedaviye direnç konusunda önemli biyobelirteç olmalarının yanısıra, yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesinin önemini vurgulamaktadırlar (22).

2.1.5.1. Kolorektal Kanserin Moleküler Alttiplerine Göre Sınıflandırılması

Kanser Genom Atlası (TCGA) ve konsensus moleküler alt tip (CMS) sınıflandırmaları dahil olmak üzere kolorektal kanserin kapsamlı moleküler karakterizasyonlarına ilişkin son veriler, kolorektal kanserin genomik ve epigenomik mekanizmaların anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Bu kapsamda kolorektal kanser, farklı moleküler patolojilere ve klinik özelliklerine göre çeşitli alt tiplere sınıflandırılmıştır. Son yıllarda tanımlanan KRK alt tipleri, kapsamlı moleküler karakterizasyonları temeline dayanmaktadır (23). Anahtar moleküler biyobelirteçler, KRK'in biyolojik heterojenliğini anlamak, prognoz, tedavi yanıtı ve nüks riskini tahmin etmek için kullanılabilecek alt tiplerin ayrımı için önemlidir. Ek olarak bu anahtar moleküler özellikler, kişiselleştirilmiş tedaviler için hedefleri temsil edebilmektedir.

2.1.5.1.1. Konsensus Moleküler Alt Tip Sınıflandırması

Konsensus moleküler alt tip sınıflandırması, KRK için RNA ifade seviyesine dayanan ve 4151 KRK vakası içeren 18 veri seti üzerinden oluşturulmuş bir sınıflandırma sistemidir (24). Premalign adenom aşaması dahil olmak üzere KRK patogenezi sırasında genomik değişiklikler birikerek RNA ifadesinde değişikliklere yol açmaktadır. Adenomların yalnızca küçük bir bölümü, spesifik DNA kopya sayısı değişimleri veya mikrosatelit instabilitesi (MSI) ile ilişkili bir geçiş olan malignitelere ilerlemektedir (25). KRK moleküler özellikleri ve tedavi yanıtı açısından heterojen bir yapıya sahip olduğundan, prognozu tahmin etmede ve tedavi stratejilerini belirlemede KRK'in sınıflandırılması çok önemlidir (26). TNM sınıflandırması, genellikle KRK'nin ilerlemesini belirlemek için kullanılsa da tedavi stratejilerini ve prognozu daha iyi değerlendirmek için daha derinlemesine karakterizasyon gerekmektedir. KRK için gen imzalarına uygun olarak rapor edilen sınıflandırma sistemlerden biri konsensus moleküler alt tip sınıflandırmasıdır. 2015 yılında KRK Alt

Tipleme Konsorsiyumu tarafından çoklu mevcut sınıflandırmalar arasındaki farklılıkları uzlaştırmak ve KRK'nin konsensus moleküler alt tiplerini (CMS'ler) belirlemek amacıyla RNA ifade seviyesine dayanan ve dört CMS grubuna ayıran bir sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir (27).

CMS1, KRK'lerin %14'ünü içerirken mikrosatelit instabilitesi (MSI), BRAF mutasyonu, promotor hipermetilasyonu ve immün infiltrasyon ile ilişkilidir. CMS2, en yaygın KRK alt tipi (% 37) olup Wnt ve Myc yolaklarının aktivasyonu dahil olmak üzere kanonik KRK karsinogenezinin ayırt edici özelliklerini gösterir. KRK'lerin yaklaşık %13'ü, düzensiz metabolizma ve KRAS mutasyonu ile karakterize edilen CMS3 sınıfında yer almaktadır. Son olarak, CMS4 (% 23) kötü prognozla ilişkili bir grup olarak tanımlanmaktadır (27). CMS sınıflandırması, moleküler olarak hedeflenebilir tedaviler için bir çerçeve görevi gören biyolojik ve klinik ayrıma bağlı farklı moleküler özellikleri koruyan ve KRK için şu anda mevcut olan en sağlam sistem olarak kabul edilmektedir (28). Ancak CMS sınıflandırmasının bazı sınırlamaları vardır. CMS, mutasyon durumuna bakılmaksızın tümördeki gen ifadesine dayalı olarak geliştirilmiştir. Ancak mutasyon durumu, mevcut uygulamada kemoterapötik ajanı seçmek için önemli bir faktör olarak görülmektedir (24). Bu nedenle KRK'nin CMS'lere göre daha fazla araştırılması ve analizi, uygun kişiselleştirilmiş tedavi seçenekleri sunulmasını ve KRK hastaları için klinik sonuçları iyileştirmesini sağlayacaktır.

2.1.5.1.2. Entegre Moleküler Karakterizasyon Sınıflandırması (TCGA Sınıflandırması)

TCGA veri tabanında 224 KRK vakasının ekzon dizileri, DNA kopya sayısı, promotor metilasyonu, mRNA ve miRNA ifade profilleri analiz edilerek KRK'nın kapsamlı bir moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirilmiştir. Ek olarak örneklem içerisindeki 97 vaka tüm genom dizilimi ile incelenmiştir (29). 10^6 baz başına en az 12 mutasyon oranına sahip (ortalama toplam mutasyon sayısı 728) olan ve incelenen toplam vaka sayısının %16'sını temsil eden tümörler, hypermutated KRK olarak adlandırılırken, 10^6 baz başına en fazla 8.24 mutasyon oranına sahip tümörler (ortalama toplam mutasyon sayısı 58), non-hypermutated KRK' ler (vakaların %84'ü) olarak tanımlanmıştır (23). Hipermutasyonlu (Hypermutated) KRK vakalarının %75'i mikrosatellit instabilitesi (MSI), MLH1 metilasyonu ve CpG adacık metilasyon fenotipi (CIMP) açısından zenginleşirken, %25'i polimeraz ε (POLE) ve somatik yanlış eşleşme tamiri (MMR) geninde 10^6 baz başına en az 40 mutasyon oranı ile karakterize

edilmiştir. Hipermutasyonlu olmayan (Non-hypermutated) KRK vakalarında APC (%81), TP53 (%60), KRAS (%43), PIK3CA (%18), FBXW7 (%11), SMAD4 (%10) gibi birçok gende somatik mutasyon gözlemlenmektedir. Non-hypermutated KRK vakalarında sıklıkla mutasyona uğrayan TP53 ve APC, hypermutated KRK vakalarında daha az mutasyona uğramıştır: Non-hypermutated KRK vakaları, kararlı mikrosatellit yapısı (MSS) ile karakterize edilmiş ve bu grup somatik kopya sayısı değişiklikleri (SCNA) ile daha sık ilişkilendirilmiştir (23).

Hemen hemen tüm KRK vakalarında, kolorektal karsinogenezde MYC'nin önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Aktif WNT sinyal yolağının veya TGF-β yolağının inaktivasyonu ile MYC'nin aktivasyonu sonucunda, MYC transkripsiyonel hedeflerinin düzensizliği gösterilmiştir (23). WNT sinyal yolağı APC inaktivasyonu veya CTNNB1 aktivasyonu dahil olmak üzere bu yolağın düzenlenmesinde yer alan diğer birçok gendeki değişikliklerle birlikte non-hypermutated vakaların %93'ünde, hypermutated vakaların ise %97'inde aktiftir. TGF- β yolağı ise non-hypermutated vakaların %27'sinde ve hypermutated vakaların %87'sinde deregülasyona uğramıştır. Yapılan TCGA çalışmasında, çeşitli çalışmalarda ümit verici olduğu gösterilen WNT sinyal yolağı ve CTNNB1 inhibitörlerinin kullanımı da dahil olmak üzere KRK vakalarına yönelik bir dizi terapötik yaklaşım önerilmiştir (30).

2.1.5.1.3. Kromozomal İnstabilite

Kolorektal kanserde en yaygın görülen genomik kararsızlık kromozom instabilitesidir (CIN). Hücreden hücreye karyotipik değişkenlik ile sonuçlanan kromozomların bütününde ya da büyük bölümlerinde kazanım veya kayıpların meydana gelmesi ile oluşmaktadır. Sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %65-70'inde görülmektedir. Kromozom instabilitesi kromozomda kopya sayısı ve yapısının değişimine sebep olur. Kromozomal instabilite *APC, TP53, SMAD4* gibi bir tümör baskılayıcı genin fiziksel kaybına neden olan etkili bir mekanizmadır (31, 32). Her ne kadar KRK'da CIN'nin nedenlerinin belirlenmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, bunun altında yatan mekanizmalar bilinmemektedir. Olası mekanizmalar arasında kromozom segregasyonu, telomer disfonksiyonu, *TP53* ve *APC* gibi kritik genleri etkileyen DNA hasar yanıtı değişiklikleri yer almaktadır. Ana hücre döngüsü kontrol noktası geni olan TP53'ün fonksiyon kaybı mutasyonları, hücre döngüsünde kontrolsüz girişe neden olmaktadır (31). CIN bulunduran KRK vakaları, genom boyunca kopya sayısı değişiklileri ile karakterize edilmekte ve anöploidik tümörler ve heterozigotluk kaybıyla sonuçlanmaktadır (33). Kromozomal segregasyondaki hatalarla ilişkili olan APC

mutasyonları da CIN ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Bu nedenle CIN'e yol açması ve KRK'lerde kanser ilerlemesini desteklemesi muhtemeldir. APC, WNT sinyal yolağının bir parçasını oluşturmaktadır. Ek olarak, etkisizleştirilmesi, çekirdek CTNNB1 ekspresyonunda ve hücre proliferasyonunda artışa neden olmaktadır. Bu nedenle, WNT sinyal yolağının CIN KRK'lerinde önemli bir rolü bulunmaktadır (34).

2.1.5.1.4. Mikrosatellit İnstabilitesi

Mikrosatellitler genomda bulunan 1-6 baz çifti uzunluğundaki dizilerdir İnsan genomu 100.000' den fazla mikrosatelit içerdiği bilinmektedir. Miksosatellit instabilitesi (MSI) KRK vakalarının %15'inde görülmektedir ve yanlış eşleşme onarım genleri (MMR) olan MSH2, MLH1, MSH6 ve PMS2 genlerinin inaktivasyonu sonucu oluşmaktadır. Replikasyon sırasında DNA'da yanlış eşleşme hatası MMR genleri ile tespit edilir ve MLH1 ve/veya PMS2 heterodimeri bu hatayı keserek DNA zincirinin düzeltilmesine yardımcı olur. DNA MMR sisteminde oluşan hatalar MMR aktivitesinin kaybına neden olur, böylece hipermutator fenotip olan MSI oluşumu gerçekleşir. Sporadik KRK vakalarında MSI epigenetik değişikler sonucu oluşmaktadır. MLH1 promotorundaki metilasyon bu genin sessizliğine sebep olarak MSI gerçekleşir. MSI vakalarının %12'si bu şekilde oluşmaktadır. Vakalaların %3' lük kısmını ise Lynch sendromu oluşturmaktadır. Bu vakalarda MMR genlerinde germline mutasyonlar sonucu MSI meydana gelmektedir (35, 36). MSI evre II vakalarında %20, evre III vakalarında %12 ve evre IV vakalarında %4 oranında görülmektedir (35).

MSI KRK'leri klinik olarak iyi bir prognoza sahip olarak karakterize edilmektedir. Ayrıca MSI, 5-florourasil (5-FU) ile tedaviye duyarlılığın olası bir belirtecidir. MSI KRK'lerde 5-FU'ya yanıt verme, KRK evrelerine bağlı gibi görünmektedir. Evre II MSI KRK'leri 5-FU bazlı adjuvan kemoterapiye duyarlı değildir. Evre III MSI KRK'lerde, 5-FU bazlı adjuvan kemoterapiye veya standart adjuvan kemoterapiye duyarlılık tartışmalıdır ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (37, 38).

2.1.5.1.5. CpG Adacık Metilasyon Fenotipi

CpG adaları genellikle 500 bp' den uzun tekrarlı sitozin-guanozin rezidülerinden oluşan DNA bölgeleridir. İnsanlarda genomun yarısında promotorların CpG adacıklarında gömülü olduğu bulunmuştur. CpG adacıklarında promotorların anormal metilasyonu (CIMP) tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile ilgili en önemli epigenetik mekanizmalardan biridir.

Bu epigenetik değişiklilik DNA onarım sistemi, apoptoz, hücre döngüsü regülasyonu, anjiyogenez inhibisyonu gibi mekanizmaların inaktivasyonuna neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarla kolorektal kanser alt grubunda aynı anda metile edilmiş çok sayıda CpG adasının karakterize olduğu ve birkaç tümör baskılayıcı genin inaktif olduğu keşfedilmiştir. CIMP olarak adlandırılan bu alt grup proksimal kolon baskınlığı, dişi cinsiyet, zayıf ve müsinöz histoloji ve sık KRAS veya BRAF mutasyonları dahil olmak üzere eşsiz bir klinikopatolojik ve moleküler özellik sergilemektedir. CIMP pozitif kolorektal kanserin genel olarak istenmeyen bir prognozla korelasyon gösterdiği, fakat bu özelliğin, MSI durumundan ve KRAS veya BRAF mutasyonlarının varlığından bağımsız olduğu gösterilmiştir (39). CIMP-pozitif KRK'lerin çoğu bir MSI fenotipi sergilediğinden, CIMP pozitif KRK'lerin klinikopatolojik özellikleri MSI KRK'leri ile çakışmaktadır. CIMP-pozitif MSI KRK'lere benzer şekilde, CIMP-pozitif MSS KRK'leri yüksek bir BRAFV600E mutasyonu frekansı ile karakterize edilmektedir. APC mutasyonları ve WNT/CTNNB1 sinyal yolağının aktivasyonu, CIMP ile ters ilişkilidir (40).

2.2. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER ALTTİPLERİNİN İLERİ ANALİZİ

Kolorektal kanser moleküler patogenezi uzun yıllardır çalışılmasına rağmen hala çözülemeyen birçok yönü olan kompleks, multifaktöriyel bir hastalıktır. Bundan dolayı, kolorektal kanser patogenezinde genetiğin yanı sıra makro ve mikroçevre önemli rol oynamaktadır ve bu da kolorektal kansere yönelik güvenilir biyobelirteçler tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. Hastalığın patogenezi daha iyi anlamak ve yeni biyobelirteçlerin tanımlanması için moleküler alttiplerinin belirlenmesi gerekmektedir. Omik yaklaşımlar, anlaşılması güç süreçleri aydınlatmada önemli bir yer kapsamaktadır (41).

2.2.1. TRANSKRİPTOMİK ANALİZLER VE KOLOREKTAL KANSER

Gen ifade profili olarak da bilinen transkriptomik, bir hücrede, dokuda ya da biyolojik bir üründe bulunan ifade edilen bütün genlerden transkribe olan RNA moleküllerinin ifadesinin tespiti ile belirli bir örneğin biyolojik aktivitesinin değerlendirilmesini sağlayan güçlü bir araçtır. Transkriptomik analizlerin dayandığı temel fikir, ortak süreçlerde yer alan genlerin birlikte ifade edildiği ve bu nedenle benzer ifade modellerini takip eden genlerin, işlevsel olarak bağlı ve/veya benzer genetik kontrol mekanizmaları altında olabileceği yönündedir. mRNA transkript seviyeleri doğrudan protein seviyesi ile ilişkili olmayabilir, ancak genel

varsayım, gen ifade seviyelerinin paternlerinin hücrenin fizyolojik durumunu yansıttığı şeklindedir. Transkriptomik analizler hibridizasyon ve dizileme temelli teknolojiler olarak iki şekilde yapılmaktadır (41).

İlk olarak 1990 yıllarında geliştirilen DNA mikrodizin teknolojisi katı bir yüzey ya da boncuklara sabitlenmiş oligonükleotidler prensibine dayanmaktadır. Oligonükleotid problarının flüoresan etiketli tamamlayıcı DNA (cDNA) ile hibridizasyonu, mevcut RNA transkript miktarının nicel ölçümünü sağlar. Mikrodizin teknolojisi, maliyet ve verimlilik açısından EST ya da gen ekspresyonunun seri analizi (SAGE) gibi Sanger bazlı dizileme methodlarına kıyasla avantajlıdır (42). Mikrodizin teknolojisi mRNA'lara ek olarak miRNA gibi kodlanmayan RNA'ların da transkriptomik analizleri gerçekleştirilebilir. miRNA'lar 18-25 nükleotid uzunluğunda ve mRNA'ları hedefleyerek gen ifadesini azaltan RNA'lardır. miRNA' ların onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak işlev görebildiği ve KRK dahil bir dizi kanser ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Mikrodizin yöntemi kullanılarak yapılan miRNA profilleme çalışmaları, KRK' ya yönelik dagnostik, prognostik ya da terapötik biyobelirteçler tanımlanmasını sağlamıştır (43). Bu miRNA'lardan biri miR-21'dir. İyi karakterize edilmiş bir onkojenik miRNA olan miR-21, KRK'nın erken teşhisi için en umut verici biyobelirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir(44).

Yeni nesil dizileme teknolojisinin geliştirilmesi sonrası ortaya çıkan "Whole Genome Shotgun Sequencing" yaklaşımının ardından RNA Seq analizleri de 2008 yılından itibaren transkriptom çalışmalarına paralel DNA dizileme teknolojilerinin adapte edilmesi sonucu geliştirilmiştir. RNA-seq mikrodizin tekniğinin aksine transkript spesifik prob prensibine dayanmamaktadır, bu da daha önce tanımlanmamış (novel) transkriptleri belirlemeyi mümkün hale getirmektedir. RNA-seq, düşük yoğunluktaki transkriptlerin tespit edebilir ve yüksek duyarlılık ve spesifikliğe sahiptir. RNA-seq analizleri memelilerde transkriptom profilinin düşünüldüğünden daha karmaşık olduğunu göstermiştir (45).

2.2.2. KOPYA SAYISI ANALİZLERİ

Kolorektal kanser her yıl 1,2 milyon insanın ölümüne sebep olan, farklı moleküler paternler ve patolojik özellikler gösteren heterojen bir hastalıktır (46). Farklı moleküler değişikliklerden biri de kopya sayısı değişiklikleridir. Kopya sayısı değişiklikleri genomda DNA bölgelerinin kaybına ya da artmasına sebep olan somatik değişikliklerdir (47). İlerlemiş adenomlar bu kromozomal anomaliklerin çoğunu içermektedir. Adenomların

karsinoma dönüştüğü süreçte kromozomda 8q, 13q ve 20q kazanımları ve 8p, 15q, 17p ve 18q kayıpları olduğu gözlemlenmiştir (48). Yapılan çalışmalara göre kromozomlarda meydana gelen kopya sayısı değişikliklerinin, değiştirilmiş genomik segment üzerindeki genlerin çoğunun ekspresyonunu doğrudan etkilediğini göstermektedir. Kromozomal anöploidinin biyolojik sonucu, etkilenen kromozomal bölge ile sınırlı değildir, ancak genomun diğer bölgelerinde bulunan genlerin transkripsiyonel aktivitesi üzerinde etkileri olabilir (49).

Kopya sayısı değişikleri ve gen ekpresyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu iki mekanizma arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanmış ve çalışmalar kanserle ilgili yeni genlerin keşfi ile sonuçlanmıştır. Kolorektal kanserde, kromozom 13 kazanımı ve bu kromozomda bulunan genlerin fazla ekprese edilmesi ile tümör oluşumunda etkili olan yeni genleri ortaya çıkarmıştır. CDK8, CDX2, and LNX2 genlerinin fazla ekpresyonunun WNT-sinyal yolağı ve tümör oluşum süreci ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (50, 51). Yapılan diğer çalışmalar, ayrıca kopya sayısı değişikliklerinin sadece anöploid kromozomunda bulunan genlerin değil, aynı zamanda tüm genom boyunca protein ekspresyonunu da etkileyen birçok genin ifadesini etkilediğini ortaya koymuştur (52).

2.2.3. METİLASYON ANALİZLERİ

Kanserin başlangıcı ve proliferasyonu epigenetik ve genetik olaylar tarafından düzenlenmektedir. Epigenetik modifikasyonlar kanser araştırmaları için oldukça önemlidir ve giderek daha da önem kazanmaktadır. DNA metilasyonu DNA metiltransferazlar (DNAMT'ler) tarafından katalize edilen ve ökaryotlarda apoptoz, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre döngüsü ve transformasyonu kontrol eden epigenetik bir mekanizmadır. Anormal DNA metilasyonu esas olarak DNA hiper ya da hipometilasyonu ile kötü huylu tümörlerin oluşmasına sebep olmaktadır. DNA hipermetilasyonu transkripsyonel baskılanmaya ve gen ifadesinde azalışa sebep olurken, DNA hipometilasyonu DNA metilasyonunda eksikliği ifade etmektedir ve kromozom stabilitesini ve anoploidi gelişimini etkilemektedir.

Bisülfit dizileme tekniği DNA metilasyon analizleri için altın standart yöntem olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem ile, metillenmemiş sitozinler deaminasyon yoluyla urasile dönüştürülürken, metillenmiş sitozinler sitozin olarak kalır. Bisülfit dönüşümü ile genomdaki nükleotid sayıları üçe indirgendiğinden, yeni nesil sekanslama (NGS) sonrası

hizalama analizlerini daha zor bir hale getirebilmektedir. Buna ek olarak, DNA parçalarının oluşmasına sebep olabilmektedir(53). Bu DNA parçaları, uzun fragmentasyonların amplifikasyonunu zorlaştırır ve kimerik ürünlerin oluşmasına neden olabilmektedir. Konvansiyonel metilasyon spesifik PCR (MSP), metilasyonun tespiti için kullanılan hassas bir yöntemdir. Bu yöntemde, CpG dinukleotidleri içeren primerler kullanılmaktadır. Böylelikle metillenmiş bölgelerin spesifik olarak çoğaltılması sağlanır ve genellikle düşük metilasyon seviyelerini tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Mikrodizin ya da yeni nesil dizilemeye dayalı kromatin immünopresipitasyonu (ChIP-Seq) ve metillenmiş DNA immünopresipitasyon sekanslama (MeDIP-seq) yöntemleri de metilasyon analizinde kullanılan faydalı yöntemlerdir(54).

2.2.4. META ANALİZ VE ENTEGRE OMİK ANALİZLER

Yüksek verimli teknolojilerdeki ilerlemeler, moleküler, hücresel ve organizma ölçeğinde üretilen veri miktarında hızlı bir artış sağlamıştır. Meta analiz farklı çalışmaların sonuçlarının bir araya getirilmesiyle gerçekleştirilen istatiksel bir yöntemdir. Birden fazla bağımsız çalışmadan elde edilen büyük ölçekli verilerin yeniden kullanımı ve meta-analizi, tek bir çalışmaya kıyasla biyolojik süreçleri daha iyi anlaşılabilir kılacak istatiksel gücü arttırabilir. Meta analiz çalışmaları ayrıca güçlü, klinikle kullanılabilecek, güvenilir biyobelirteçlerin tanımlanması için çok önemli bir yaklaşımdır. Biyobelirteç tanımlanmasında kullanılan ve meta analiz yöntemi ile verileri bir araya getirilip analiz edilen önemli tekniklerden biri mikrodizindir. Erişime açık mikrodizin verileri çok büyük miktarda mevcut gen ifade verisi içermektdir ve bu veriler biyobelirteç keşfi için büyük bir potansiyele sahiptir (55). Mikrodizin verilerine meta analiz çalışmalarında kullanılmak üzere GEO (Gene Expression Omnibus) ve Array Express gibi veri tabanlanlarından ulaşılabilmektedir.

Sistem biyolojisi yaklaşımı genomik, transkriptomik, proteomik, epigenomik gibi çoklu omik yaklaşımların bir araya getirilmesine olanak sağlamıştır. Bu şekilde hücreler, organizmalar, hastalığın gelişimi gibi biyolojik süreçler bütüncül bir yaklaşımla incelenebilmektedir. Omik verilerin entegrasyonu bilinmeyen moleküler değişikliklerin tanımlanmasında yardımcı olmaktadır. KRK gelişimine sebep olan süreçler omik verilerin entegrasonu ve bu mekanizmaların birbirlerini nasıl etkilediğinin aydınlatılmasına olanak sağlamaktadır. Verilerin entegrasyonu ayrıca hastalık riskini ya da hastalığın pronozunu tahmin etmede kullanılabilir (56).

Kopya sayısı analizleri ve transkriptom profillerinin entegrasyonu: Birçok çalışma DNA segmentlerinin kopya sayısının kaybı ya da kazanımının gen ifade sevisinde değişikliğine sebep olduğunu göstermektedir. Bu değişikliklerin kansere bağlı biyolojik süreçleri etkilediği bilinmektedir. Çoğu gende kopya sayısının artması ile gen ifadesi arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Ancak kopya sayısı değişikleri gen ifadesindeki değişiklerin aydınlatılması için yeterli değildir çünkü gen ifadesi transkipsiyonu düzenleyen karmaşık mekanizmalar tarafından belirlenmektedir. Bununla birlikte, gen ekspresyon analizlerinin sonuçlarının genomik profilleme ile bütünleştirilmesi, kansere bağlı yeni genlerin keşfedilmesi için etkili bir yaklaşımdır. KRK doku örnkelerinde yapılan çok sayıda araştırma sonucunda, 8q, 13 ve 20q kromozomları üzerindeki kazançların yüksek prevalansı ve 8p, 17p ve 18q kromozomlarındaki kayıpları doğrulanmıştır.

Metilasyon ve transkriptom profillerinin entegrasyonu: KRK'da anormal DNA metilasyonu onkojonik dönüşüm sürecinin erken evrelerinde ortaya çıkan epigenetik değişikliktir. Metilasyon verilerin gen ekspresyonu analizleriyle entegrasyonu, onkogenezin erken aşamalarında metillenen yeni aday diagnostik biyobelirteçlerinin tanımlanmasına yardımcı olabilir. Yapılan çalışmalarda CpG adacık hipermetilasyonunun gen ifade düzenlenmesindeki rolü hakkında yeni görüşler ortaya çıkarmıştır. Metilasyon ve gen ifade analizlerinin entegrasyonu, KRK'da ErB sinyal yolağının önemini ortaya çıkarmıştır ve metilasyonun KRK gelişiminde otnadığı önemli rolü vurgulamıştır. Ayrıca Erb sinyal yolağı ilişkili 4 gen (*PIK3CD, PKCB, ERBB4, ve PAK7*) belirlenmiştir ve bu genlerin KRK örneklerinde kademeli (differantially) olarak metillendiği belirlenmiştir. PIK3CD geninin hipermetilasyonun KRAS mutasyonu varlığı ile korele olduğu gösterilmiştir (57).

Epigenomik ve transkriptomik profillerin entegrasyonu: miRNA ve uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA'lar) gibi kodlanmayan RNA profilleri KRK patogenezini etkileyen önemli epigenetik modifikasyonlardır. miRNA'lar hedef mRNA'ların 3'translasyon olmayan bölgelerin (3'UTR) tamamlayıcı uçlarına bağlanarak gen ifade seviyesini değiştirmektedirler. Çok sayıda mikrodizin ve yeni nesil dizileme çalışmaları ile KRK'da tümör ve sağlıklı dokularda gen ifadesini etkileyen miRNA'lar tanımlanmıştır. Biyoinformatik araçlar yardımı ile miRNA'ların hedeflediği mRNA'lar ve ters ifade korelasyonu gösteren miRNA ve mRNA profilleri belirlenebilmektedir. Bu verilerin entegrasyonu KRK gelişiminin altında yatan miRNA düzenleyici mekanizmalarını tam olarak anlamak için umut verici bir yaklaşımı temsil etmektedir. Ayrıca KRK'ya yönelik diagnostik ve prognostik biyobelirteç tanımlanmasında büyük bir potansiyele sahiptir.

Literatürde yapılan bir çalışmada, miRNA ve mRNA mikrodizin verleri entegre edilmiş ve farklı ifade edilen miRNA/mRNA çiftleri belirlenmiştir. Çalışmada kolorekral karsinoma ve normal dokuların ifade profilleri karşılaştırıldığında, miR-320, miR-15b ve miR-16 'nın ifade seviyesindeki değişiklikler saptanmıştır. Ayrıca mRNA ifade verileri ile entegre edildiğinde KRK'da etkili toplam 30 miRNA/mRNA çifti tanımlanmıştır (58).

2.3. KOLOREKTAL KANSERDE BİYOBELİRTEÇLER

Kolorektal kanser dünyada en yaygın üçüncü kanserdir ve hastaların %10'undan fazlasının KRK tanısı konulduğunda hastalığın ileri evrelerine ulaşmış olduğu ve diğer doku veya organlara metastaz gerçekleştiği gözlemlenmektedir. KRK mortalitesinin artışı erken dönemde teşhis eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Kolorektal karsinogenezin sürecinin daha iyi anlaşılması ve bu yöndeki ilerlemeler, daha erken teşhis, "kişiselleştirilmiş" tedavi stratejisinin seçilmesi ve kolorektal kanser için belirteçler sağlamada çok önemlidir (59, 60).

Kanser biyobelirteçleri, tümör hücreleri tarafından veya tümöre yanıt olarak vücudun diğer hücreleri tarafından üretilen biyomoleküllerdir. Bu biyomoleküller kanser taraması/erken tanı, tanı, prognostik veya genel sonucun öngörülmesi sürecinde kullanılmaktadır. Ek olarak, kanser biyobelirteçleri, belirli bir tedaviye yanıt verme olasılığı en yüksek olan hasta alt popülasyonlarını belirleyebilmektedir. Biyobelirteçler kanda, idrarda, dokularda veya diğer vücut sıvılarında tespit edilebilen spesifik hücreleri, molekülleri, enzimleri, hormonları, genleri ve/veya gen ürünlerini içine alan geniş bir biyomolekül sınıfıdır.

Biyomoleküllerin kanser biyobelirteci olarak tanımlanmasındaki en önemli faktörlerden biri biyobelirtecin spesifikliği ve hassasiyetidir. Bu faktörler için eşik değerleri belirlenerek, genellikle en yüksek spesifikliği ve hassasiyeti sağlayan eşik değeri seçilerek aday biyobelirteçlerin uygun kriterlere sahip olup olmadığı test edilmelidir. Cutoff değerinin artması testin spesifikliğinin artmasını sağlasa da yanlış negatif sonuçların elde edilme potansiyeli taşımaktadır. Bu durum oldukça spesifik ancak hassasiyeti düşük bir biyobelirtecin elde edilmesine yol açmaktadır. Diğer yandan eşik değerinin düşük olması hassasiyeti yüksek ancak düşük spesifikliğe sahip bir biyobelirtecin tanımlanmasına yol açmaktadır. Çünkü daha az yanlış negatif sonuçlar elde edilse de yanlış pozitif tanı oranının artması durumu söz konusudur.

Bir kanser biyobelirtecinin klinik kullanımda için onaylanabilmesi için birçok gereksinimi karşılanması gerekmektedir. Bir molekül erken tanıda kullanılacaksa, küçük bir

asemptomatik tümör (veya mikroçevresi) tarafından kayda değer ve kolayca tespit edilebilir miktarlarda dolaşıma salınmalıdır. Bu gereklilik, neden birçok kanser biyobelirtecinin hastalığı geç evre hastalığı olan hastalar arasında göreceli olarak daha iyi saptadığını, ancak erken evre hastalığı olan hastalar arasında hastalığı zayıf bir şekilde saptadığını veya asemptomatik hastalığı olan hastalar arasında neden hiç saptamadığını açıklayabilmektedir. Diğer bir gereklilik, biyobelirtecin doku için spesifik olması gerekliliğidir. Çünkü diğer dokularda da bu biyobelirtecin üretilmesi durumunda, normal sağlıklı bireylerdeki seviyesi muhtemelen yüksek olacaktır ve arka plan kirliliği nedeniyle tanı süreci zorlaşacaktır. Bu nedenle, arka plandan bağımsız olarak önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde üretilen moleküller biyobelirteç olarak kullanılmalıdır. Dokuya özgü olmayan biyobelirteçler için bir başka sorun da ilgili biyobelirteç seviyesinin kanser dışı bir hastalıktan etkilenmesidir (61).

Özellikle görülme sıklığı ve ölüm oranı yüksek kanser türleri için bir biyobelirtecin tanımlanması sürecinde, ilgili kriterlerin doğru değerlendirilmesi ve hedefe yönelik ideal biyobelirteçlerin tanımlanması büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda ideal biyobelirteç, kanserli ve iyi huylu vakalar arasında, agresif tümörler ve agresif olmayan vakalar arasında iyi ayrım yapabilme yeteneğine sahip olmalıdır. Ek olarak. ideal bir biyobelirtecin karakteristik özellikleri değişkendir. Bu değişkenlik kanser biyobelirteçlerinin sınıflandırılmasını ve uygulama alanlarını sınırlandırmaktadır. Genel olarak, kanser biyobelirtecinin ideal olarak kabul edilebilmesi için aşağıdaki genel özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bununla birlikte hiçbir biyobelirteç tüm bu kriterleri bir arada karşılayamamaktadır. Yine de bu kriterler biyobelirteç tanımlama sürecinde önemli derecede dikkate alınmalıdır.

• Yüksek klinik hassasiyeti: ilgili spesifik kansere sahip tüm hastalar tarafından üretilmelidir.

• Yüksek klinik spesifikliği: yanlış negatif oranı düşük olmalıdır.

• Organ veya dokuya özgü sentezlenmelidir.

• Tümör yükü veya hacmi ile orantılı: kantitatif olarak tümör hacmi veya hastalığın ilerlemesi ile orantılı olmalıdır.

• Kısa yarı ömür: tedavinin uygun şekilde izlenmesi için tümör yükündeki herhangi bir erken değişikliği hızlı bir şekilde yansıtmalıdır.

• Sağlıklı bireylerin ve iyi huylu hastalığı olanların serumunda (varsa) düşük seviyelerde bulunmalıdır.

• Metastatik tümörler için ayırt edici olmalıdır.

• Kantitatif, standartlaştırılmış, tekrarlanabilir ve doğrulanmış testi yapılabilmelidir.

• Ucuz tespit yöntemine sahip olmalıdır.

• İnvaziv olmayan bir şekilde elde edilmeli: serumda, vücut sıvılarında veya kolayca erişilebilen dokuda tespit edilebilmelidir (62).

Kansere bağlı moleküler ve hücresel biyobelirteçler dört grupta sınıflandırılabilir:

1. Diagnostik belirteçler: Hastalığın erken teşhisi ve risk sınıflandırması için kullanılan biyobelirteçlerdir.
2. Prognostik belirteçler: Hastalığın olası seyri hakkında bilgi veren biyobelirteçlerdir.
3. Prediktif belirteçler: Tedaviye yanıtı öngören belirteçlerdir.
4. Takip belirteçleri: Hastalık nüksünü gözlemlemek için kullanılan belirteçlerdir.

2.3.1. KLASİK TÜMÖR BİYOBELİRTEÇLERİ

Karsinoembriyonik antijen (CEA) birçok epitelyal tümörde ifade edilen bir serum glikoproteindir. CEA, fetal gelişim sırasında üretilmektedir ve hücre adezyonunda rol oynamaktadır. Üretimi genellikle doğumla birlikte durur. Doğumdan sonra, sağlıklı yetişkinlerde CEA ekspresyonu büyük ölçüde inhibe edilmiştir, çok düşük plazma CEA seviyeleri ölçülmektedir. Ancak kolorektal, meme, akciğer ve pankreas kanseri olan kişilerde, sigara içenlerde ve karaciğer sirozu, sarılık, şeker hastalığı, pankreatit, kronik böbrek yetmezliği gibi hastalıkları olan kişilerde yüksek seviyeler tespit edilebilmektedir (63). İlk olarak 1965 yılında tanımlanan bu biyobelirteç, özellikle kolon ve rektum dokularında, adenokarsinomlarda fazla ifade edilmektedir. KRK hastalarının yaklaşık %70'inde tanı konulduğu sırada CEA değeri yüksektir. Bu da CEA antijeninin iyi bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir. CEA, KRK hücrelerinin karaciğer ve akciğere metastazını kolaylaştırabilmektedir. Ameliyat sonrası CEA seviyeleri önemli prognostik bir göstergedir. Ameliyat sonrasında yüksek plazma CEA seviyeleri 4-6 hafta içinde normale

dönmelidir. Ancak normale dönmeyen ve hala yüksek seviyede olan CEA olumsuz prognostik bir belirteçtir (64, 65).

CA 19-9 (karbonhidrat antijeni), kana salınabilecek yüksek moleküler ağırlık ile karakterize edilen bir glikoproteindir ve KRK teşhisinde kullanılır. CA 19-9 mide, kolon, endometriyal epiteliyle insan pankreas ve safra kanalı hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Sağlıklı bireylerde serumda az miktarda bulunan CA 19-9, pankreatit ve gastrointestinal hastalıklar gibi durumlarda aşırı ifade edilmektedir ve gastrointestinal kanserlerde kullanılan önemli bir prognostik belirteçtir (66). CA 19-9 adenokarsinomlar tarafından üretilmektedir. KRK'da artan serum CA 19-9 seviyesi sıklığı %20 ile %40 arasında değişmektedir. Artan CA 19-9 seviyesi evre ile ilişkilendirilmiştir ve en yüksek duyarlılık metastazlı hastalarda görülmektedir. Bununla birlikte, CA 19-9'un duyarlılığı her zaman hastalığın tüm evreleri için CEA duyarlılığından daha azdır (64). CEA ve CA 19.9'un biraraya getirilerek yapılan analizi kolorektal kanser saptamasında tanısal duyarlılığı arttırabilir. Ayrıca, bu belirteçlerin her ikisinin de belirlenmesi, hastalığın evresinin ve sağkalım oranının değerlendirilmesinde postoperatif bir prognostik faktör olarak kullanılmaktadır (65).

Fekal gizli kan testi (FOBT) KRK taramasında kullanılan en önemli dışkı testidir ve tarama protokollerinde ilk adım olarak bu test kullanılır. FOBT ucuz, kolay ve spesifikliği yüksek (%98-99) bir testtir. FOBT testinin KRK'da mortaliteyi %11-33 oranında, insidansı ise %17-20 oranında azalttığı bildirilmiştir. FOBT spesifikliği yüksek olmasına karşın duyarlılığı düşük bir testtir. Kırmızı et ve C vitamini gibi beslenme kaynakları testin pozitif sonuçlanmasına sebep olabilmektedir. Bir diğer dezavantajı ise adenomların büyüklüğünden kaynaklanmaktadır. Çelişkili bir biçimde kolon bölgesinden bağımsız olarak, 1 cm'den küçük adenomlar 1.5-2 cm boyutundaki adenomlara göre daha sık kanamaya sebep olmaktadır. Bu nedenle kolon adenomlu hastaların %40'ından azı Pozitif FOBT sonucu vermektedir(67, 68).

2.3.2. MOLEKÜLER BİYOBELİRTEÇLER

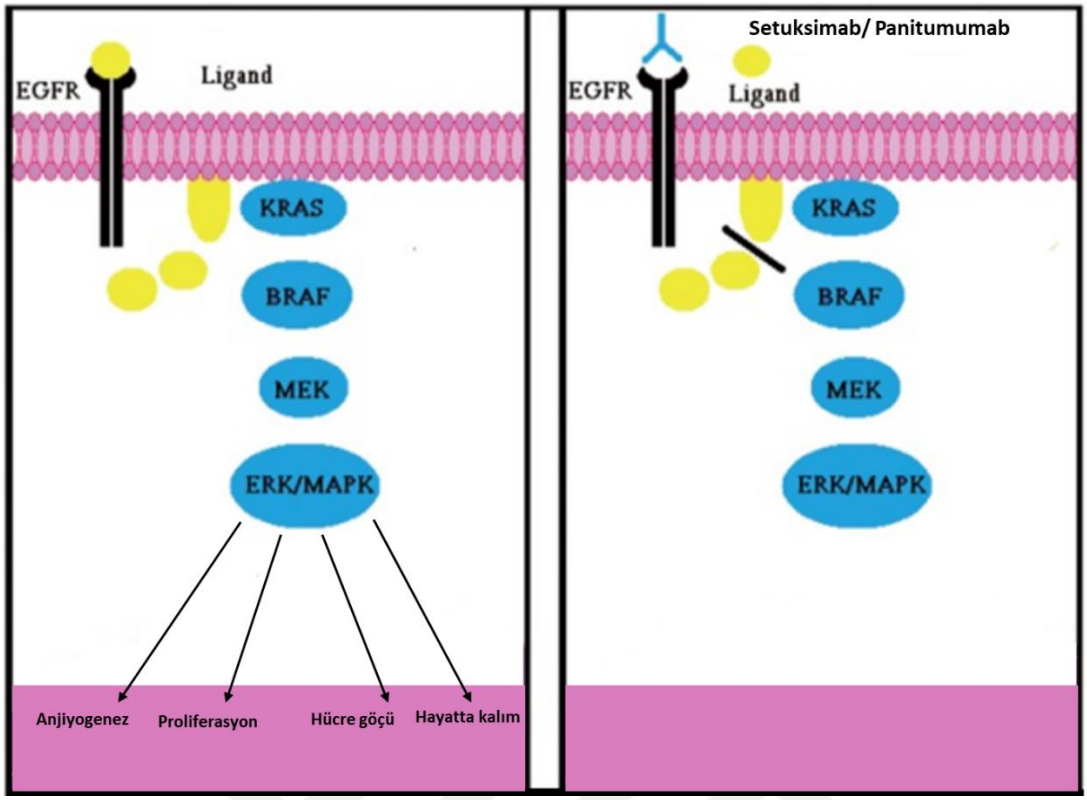
2.3.2.1. RAS

İnsan RAS gen ailesi, *KRAS*, nöroblastom RAS viral onkogen homologu (NRAS) ve Harvey sıçan sarkom viral onkogen homologu (HRAS) olmak üzere üç üye içerir. Bu genler KRAS4A, KRAS4B, NRAS, ve HRAS adlı 4 proteini üretmektedir (69). Bu proteinler GTPaz enzim aktiviteleri ile büyüme ve farklılaşma faktörleri gibi hücre dışı sinyalleri

nükleustaki hücre döngüsü proteinlerine iletirler. Böylece hücre büyümesi, farklılaşma, proliferasyon ve hayatta kalımda önemli rol oynarlar (70). RAS ailesinin üyelerindeki işlev kazandıran (gain of function) yanlış anlam (missense) mutasyonları tüm insan kanserlerinin yaklaşık %25'inde bulunmuştur. Bu mutasyonlar genellikle tek nükleotid nokta mutasyonlarıdır ve birkaç hotspot bölgede bulunmaktadırlar. Bu bölgeler: ekzon 2'deki 12 ve 13. kodonlar, ekzon 3'teki 59-61 kodonlar ve ekzon 4'teki 117 ve 146 kodonlardır (71).

KRAS, tüm kanserlerin yaklaşık %20' sinde gözlenen, en sık mutasyona uğramış izoformdur. Bununla birlikte NRAS ve HRAS mutasyonları, kanserlerin sırasıyla yaklaşık %8 ve 3'ünde bulunmaktadır. Kolorektal kanserde ise KRAS mutasyon oranı %30-50'dir (72). KRAS mutasyonlarının yaklaşık %80'i 2. Ekzonun 12. Kodonunda ve %15'i 4. Ekzon 146. Kodonda görülmektedir. (73, 74) KRAS mutasyonunun prognostik değeri çeşitli araştırmalarda değerlendirilmiştir. Birçok çalışma, metastatik KRK'da KRAS mutasyonu ile kötü prognoz arasındaki ilişkiyi bildirmiştir (18).

İnsan epitel kanserlerinin çoğu, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesi reseptörlerinin aktivasyonu ile karakterize edilmektedir. EGFR, hücre içi sinyallerini tetikleyen, böylelikle kanser hücrelerinin çoğalmasını, farklılaşmasını ve metastazını kontrol eden protein tirozin kinaz reseptörlerinden biridir. KRK hastalarında EGFR ifadesi fazladır. Bu fazla eskpresyon malignitenin ilerlemesi ve kötü prognozla ilişkilidir. EGFR'nin ekstrasellüler domainine yönlendirilen, insanlaştırılmış monoklonal antikorlar olan setuksimab ve panitumumab'ın onaylanması ile metastatik KRK hastalarına yönelik klinik fayda gözlenmiştir (Şekil 2.7.). Daha sonra, EGFR durumunun tedavinin etkinliğini öngörmediği gözlemlenmiştir. Bunun aksine, RAS-RAF-MEK-ERK yolağında yapısal aktivasyonla sonuçlanan KRAS genindeki mutasyonların anti-EGFR tedavisine dirence aracılık ettiği gözlemlenmiştir. Bu anti-EGFR tedavisinden önce RAS testinin zorunlu olduğu anlamına gelmektedir (75).



Şekil 2.7. Anti-EGFR hedefli tedavi mekanizması (76)

2.3.2.2. BRAF

RAF gen ailesi ARAF, BRAF ve RAF1 adlı üç serin/treonin kinaz içermektedir. BRAF bir serin/ treonin protein kinazı kodlar ve RAS / RAF / MEK / ERK mitojenle aktifleştirilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolağındaki proliferasyon, farklılaşma, sağkalım mekanizmalarını yöneten gendir.(60) *BRAF* mutasyonu KRK vakalarının yaklaşık %7-10'ununda bulunmaktadır. *BRAF* protoonkogeni 7. Kromozomda bulunmaktadır ve 18 ekzondan oluşur (77). Vakaların yaklaşık %95'inde 600. Kodonda mutasyon (BRAF V600E) meydana gelir. Bu mutasyon sonucunda valin aminoasidi glutamik asite dönüşür. BRAF V 600E mutasyonu, BRAF kinaz aktivasyonunu önemli derecede arttırır ve böylece MERK1 ve MERK2'nin fosforilasyonuna ve aktivasyonuna sebep olur. MERK1 ve MERK2, ERK1 ve ERK2'yi fosforlar ve aktive eder. ERK hücre döngüsünü regüle etmektedir ve mutasyon sonucunda ERK hücresel proliferasyon ve apoptozun baskılandığı biz dizi hücresel substratın fosforlanmasına neden olur (78).

BRAF mutasyonu yaş, kadın cinsiyeti, sağ tümör lokasyonu, kötü farklılaşma (poor differentiation) ile ilişkilendirilmiştir. RAF mutasyonları ayrıca periton ve lenf düğümlerine yayılma eğilimi ve akciğer metastazı olasılığı düşük olan farklı bir metastaz paterni ile

ilişkilidir (60, 78). *BRAF* mutasyonu taşıyan vakalar epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) hedefleyen terapötiklerden faydalanmamaktadırlar. Birinci basamak kemoterapi tedavisinde, iki seçenek bulunmaktadır. Bu tedavilerden ilkinde, 5-florourasil, irinotekan ve oksaliplatinin üçlü kemoterapi kombinasyonu bevacizumab ilavesiyle kullanılmaktır. Diğer seçenek ise çift kemoterapi ile birlikte bevacizumab kullanımıdır. Birinci basamak tedavide başarısız olan vakalarda (hasatların çok düşük yüzdesi), ikinci basamak tedavi uygulanmaktadır. Bugüne kadar, ikinci basamak tedavide en iyi sonuçlar vemurafenib, setuksimab ve irinotekanın bir kombinasyonu ile elde edilmiştir(79).

2.3.2.3. APC

APC (Adenomatozis polipozis koli) geni, KRK karsinogenez sürecinde bulunan önemli bir tümör baskılayıcı gendir. *APC* geni 5q21-q22 kromozomunda bulunur ve 21 ekzonu kapsar. *APC* geninin kodlanan bölgesinin yaklaşık %75'i 15. ekzonda bulunmaktadır ve hücreler arası iletişim, transkripsiyon, proliferasyon gibi önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Ana fonksiyonu ise, protein beta-katenin interaksiyonu ile Wnt- sinyal yolağının regülasyonudur (80, 81).

APC geni APC proteinini kodlamaktadır. Bu protein Wnt- sinyal yolağında (β-katenin bağımlı) fonksiyonel bir role sahiptir. Ayrıca Wnt-sinyal yolağından bağımsız olarak kolorektal tümörün gelişmesini ve baskılanmasını inhibe edebilir. APC kromozom ayrımına yardımcı olur, hücresel polariteyi ve göçü oluşturur ve DNA replikasyonunu bastırır. Hipermutasyona uğramayan (non-hypermutated) KRK gelişiminin erken evrelerinde, KRK tümörlerinin yüksek bir kısmının APC geninde somatik inaktive edici mutasyonların bulunduğu gösterilmiştir. APC mutasyonları, mikrotübüller/aktin hücre iskeletinin deregülasyonunu tetiklemektedir. Ayrıca, APC mutasyonları sitoplazma ve hücre zarı arasındaki β-katenin ve E-cadherin dağılımlarının deregülasyonu ile hücre yapışmasını azaltarak hücre göçünü arttırır (82).

APC genindeki germ-line mutasyonlar KRK gelişimine sebep olan, başlıca kalıtsal yatkınlık olayı olan ailesel adenomatöz polipozis (FAP) sendromuna sebep olmaktadır. FAP hastalığında *APC* germ-line mutasyonlarının %95'inden anlamsız (nonsense- %28) ya da güdük bırakıcı (truncating) çerçeve kayması (frameshift-%67) mutasyonlar sorumludur. Somatik APC mutasyonları ise KRK tümörlerinin %80'inden fazlasında bulunmaktadır. Vakaların yaklaşık %30- 40'ında kromozom 5q'nun heterozigotluk kaybı (LOH) rapor

edilmiştir. Her iki APC alelinin mutasyonu ve *APC* gen fonksiyonunun kaybı, sporadik KRK'larda malign transformasyonun ilk adımıdır. Bu mutasyonlar, neoplazinin en erken aşamasında küçük adenomlarda belirlenebilir ve adenomdan karsinoma gelişim sürecinde stabil bir seviyede kalabilir. Son çalışmalar somatik *APC* mutasyonlarının mutasyon küme bölgesi (MCR) olarak adlandırılan,1285 ve 1580 kodonlarını kapsayan bir alanda zenginleştiğini göstermiştir. Mutasyonların bazıları nokta mutasyonları, insersiyon ve delesyon mutasyonlarıdır ve güdük bırakıcı (truncated) proteinlerinin oluşumuna sebep olurlar (81, 82).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda KRK'de Wnt sinyal yolağını hedefleyen terapötik stratejilerin geliştirilmesine odaklanılmış ve çeşitli küçük moleküllerin bu yolağın farklı bileşenlerini hedefleyerek Wnt sinyal aktivitesini etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (83). Bununla birlikte, Wnt yolağı inhibitörlerinin normal bağırsak epitelyumu üzerindeki potansiyel toksisitesi ve hedef dışı etkilerden dolayı ileride klinik uygulamalarının sınırlandırılabileceği gösterilmiştir. İzojenik insan kolonik epitelyal hücre hattı (HCEC) kullanılarak yapılan bir çalışmada, TASIN-1 (truncated APC Seçici İnhibitörü) adlı küçük bir molekül tanımlanmıştır. TASIN-1 yabanıl tip *APC* hücrelerini korurken, truncated *APC*'leri hedef alarak hücreleri öldürmektedir. Bu keşif, truncated *APC* KRK'lerin tedavisi için, potansiyel olarak kemoterapötik veya moleküler olarak hedeflenmiş diğer ajanlarla kombinasyon halinde ya da radyoterapi ile kombinasyon halinde daha spesifik tedavilerin uygulanmasının önünü açmıştır (81).

2.3.2.4. TP53

TP53 geni bir transkripsiyon faktörünü kodlar ve hücresel stres, DNA onarımı, apoptoz ve anjiyogenezden sorumludur. İnsan malignitelerinin %50'si kadarı tümör baskılayıcı gen olan *p53*'te mutasyon içermektedir, KRK vakalarında ise bu oran %50-70'dir. Tümör baskılayıcı genlerdeki sürücü (driver) mutasyonlar proteinin fonksiyonunun ya da ifadesinin kaybolmasına sebep olmaktadır. *TP53* fonksiyon kaybı, tümör oluşumunda kritik öneme sahiptir ve *TP53* genindeki değişiklikler (genellikle protein aşırı ekspresyonu ile sonuçlanan mutasyonlar) kolon kanserinde, sıklıkla CIN fenotipi ile ilişkili ve MSI tümör fenotipi ile ters korelasyon göstermektdir. *TP53* genindeki işlev kazandıran (gain-of-function) mutasyonların, tümörün baskılanması yerine tümör oluşumunu hızlandırmaya yardımcı olan protein izoformlarını ürettiği belirlenmiştir. Birçok çalışma *TP53* mutasyonlarının KRK'da kötü prognozla ilişkili olduğunu bildirmiştir (84, 85). Bu mutasyonun sadece KRK

dönüşümünde değil, aynı zamanda tümör agresifiliği ve yayılımında etkili olduğu kanıtlanmıştır. Son yıllarda, geliştirilmekte olan p53 yolağını modüle eden bir dizi küçük molekül inhibitörü geliştirilmektedir. Bu bileşiklerin bazıları, KRK'de potansiyel terapötik ajanlar olarak test edilmiştir. MDM2 proteini p53'ün aminoterminaline ve ubikitinlerine bağlanarak kanser hücrelerinde p53'ün işlevinin yitirilmesine sebep olur. MDM2'nin farmakolojik inhibitörleri, p53 proteininin stabilizasyonu yoluyla anti-kanser aktiviteleri için kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadırlar. Örneğin MI-219 geliştirilmiş farmakokinetik profile ve MDM2'ye daha yüksek bağlanma afinitesine sahip, gelişmiş bir MDM2-p53 inhibitörüdür. MI-219, HCT-116 kolon kanseri hücre hattında apoptozu indüklemede bir ajan olarak güçlü bir etki göstermiştir. Ayrıca MI-219'un kemoterapötik ilaç Oxaliplatin ile kombinasyonu, p53 aracılı apoptotik yanıtta yüksek etkinlik sağlamıştır (86).

2.4. KOLOREKTAL KANSERDE PROGNOSTİK GEN PANELLERİ

2.4.1. COLOPRINT

KRK dünyada en yaygın görülen kanserlerden biridir ve kanser sebepli ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır. KRK'da 5 yıllık sağkalım oranları evre II hastalarında %72-83 iken, evre III hastalarında ise %42-83'tür. Hastalığın erken teşhiş edilmesi durumunda birçok hasta ameliyat ile tedavi edilebilir. Son yıllarda yapılan randomize çalışmalarda, özellikle evre III hastalarında ameliyat ve adjuvan kemoterapi uygulanan hastaların sağkalım avantajlarının olduğu gösterilmiştir (87, 88).

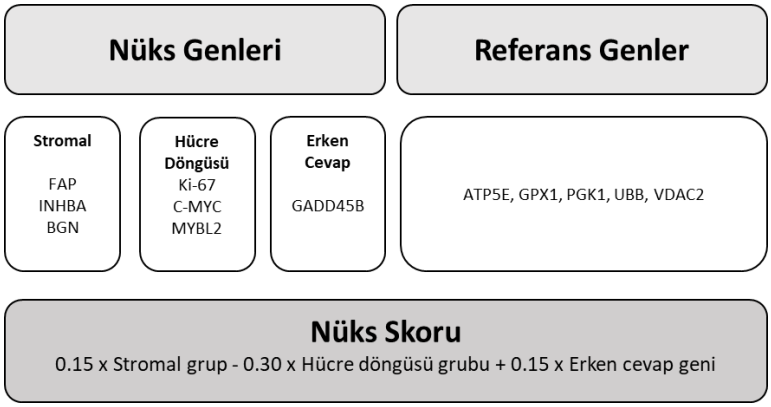
Gen ifade profili oluşturma ya da çok yönlü faktörlerin ve teknolojilerin kombinasyonu gibi analizler, bireysel prognozla ilgili daha güvenilir bilgiler sağlamaktadır. Meme kanserinde bu tür testlerin başarılı bir şekilde geliştirilmesi ve klinikte yaygın olarak kullanımı, bu yaklaşımın klinik faktörlerden daha çok bilgi sağlayacağını göstermiştir. Daha sonraki yıllarda KRK için benzer gen ifade profilleri geliştirilmiştir (88).

2010 yılında erken evre KRK hastalarında hastalığın nüksünü tahmin edebilecek, güvenilir bir gen ifade sınıflandırıcısı geliştirmek amacıyla mikrodizin tabanlı bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Evre I-III 188 hastadan alınan taze donmuş (fresh-frozen) tümör dokusu kullanılarak Agilent platformunda gen ifade profilleri analiz edilmiştir. 40.000'den fazla genin ifadesei metastaz içermeyen sağkalım ile ilişkilendirilmiştir ve ColoPrint prognostik sınıflandırıcısını oluşturmak amacıyla 18 gen kümesi tanımlanmıştır. Daha sonra sonuçlar, 206 tane evre I, II, III KRK vakasından oluşan bağımsız bir çalışma ile valide edilmiştir.

Hastaların %60'sı düşük risk, %40'ı ise yüksek risk olarak tanımlanmıştır. Düşük risk hastalarda 5 yıllık nükssüz sağkalım oranı %87,6 iken yüksek risk hastalarda %62,2'dir. ColoPrint kemoterapi olmadan güvenle tedavi edilebilecek evre II hastaların tanımlanmasını kolaylaştırmıştır. Ayrıca hastalığın nüksetme riski hakkında daha doğru bilgi sağlamaktadır ve kemoterapi alabilecek düşük riskli hastalarım seçilimini kolaylaştıran önemli bir prognostik faktördür (89).

2.4.2. ONCOTYPE DX COLON

Moleküler biyolojideki gelişmeler, kanser hastaları için bireysel risk değerlendirilmesini sağlayan tümör biyobelirteçlerinin tanımlanmasını sağlamıştır. Oncotype DX Colon evre II ve evre III hastalarının nüks riskini değerlendiren çok genli ifade profili testidir. Toplam 1851 evre II ve evre III hastalarına ait, parafine gömülmüş tümör bloklarından elde edilen RNA'lar kullanılarak kantitatif ters transkripsiyon-PCR yöntemi ile 761 genin ifade analizi yapılmıştır. 48 genin nüks riski ile önemli derecede anlamlı olduğu bulunmuştur. Bu 48 gen içerisinden, kanserle ilişkili nüksten bağımsız sağkalım prognozu için 7 gen ve 5 tane referans gen seçilmiştir (Şekil 2.8). Nüks riskini öngeren bir nüks skoru (recurrence score) belirlemek için, 5 referans gene göre normalize edilmiş 7 nüks geninin ifade seviyelerini 12 gen testine entegre etmek amacıyla bir algoritma geliştirilmiştir (90).



Şekil 2.8. 12 gen kolon kanser nüks skoru ve algoritması (91)

Analitik prosedürlerin standardize edilmesi ile, 12-gen kolon kanser testi 3000'den fazla vakayı kapsayan 3 bağımsız çalışma ile doğrulanmıştır. OncoType DX kolon kanser testi cerrah ve onkologlara nüks riskinin değerlendirilmesinde ve adjuvan kemoterapinin uygulanıp uygulanmayacağı konusunda karar vermede hastaya yönelik kişiselleştirilmiş risk değerlendirilmesinin yapılmasını sağlamaktadır (91).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Kolorektal kanser dünya genelinde en sık görülen gastrointestinal kanser türüdür(92). Görülme sıklığı ve yüksek ölüm oranları, kolorektal kansere yönelik tanı ve tedavi çalışmaların önemini arttırmaktadır. Günümüzde tanı ve tedavide gelişmeler kaydedilmiş olsa da nüks ve metastaz gibi nedenlerden dolayı kolorektal kanser ölüm oranı yüksek bir hastalık olmaya devam etmektedir(93).

Tedavinin başarılı olmasındaki en önemli faktör erken teşhis ve uygun tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kullanılan biyobelirteçlerdir. Klinikte rutin olarak kullanılan ve yapılan çalışmalarda bildirilen aday biyobelirteçler, hastalığın heterojen yapısı ve tümör gelişiminde rol alan karmaşık süreçler nedeniyle yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle kolorektal kanserin oluşum ve gelişim süreçlerinde yer alan moleküler yolakları/genleri sistem biyolojisine uygun entegre yaklaşımlarla ortaya çıkarılması ve bu anahtar moleküllerin biyobelirteç potansiyellerinin araştırılması önem arz etmektedir. Kolorektal kanserin moleküler patolojisinin ortaya çıkarılması, teşhise ve/veya prognoza yönelik güvenilir sonuçlara ulaşmayı sağlayan biyobelirteçlerin tanımlanması hem uygun tedavi stratejilerinin izlenmesine hem de tedaviye yanıtın arttırılmasına katkı sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasının hipotezi, "Epigenetik regülatörler olan miRNA'lar KRK'nın transkriptom profilini etkilemektedirler ve KRK ile normal kolorektal doku arasında ifade farkı gösteren miRNA-mRNA çiftleri KRK için prognostik biyobelirteç olma potansiyeli taşımaktadırlar" şeklinde ifade edilebilir.

Tez çalışması kapsamında, ekibimizin önceki projelerinde analiz edilen ve kolorektal kanserde kopya sayısı analizleriyle açıklanamayan gen ifade profilindeki değişimlerden sorumlu olan epigenetik modifikasyonların incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, Gene Expression Omnibus (GEO) ve ArrayExpress veri tabanlarında yer alan ve kolorektal kanserde daha önce bildirilmiş global miRNA araştırmalarına ait verilerin, meta analiz yöntemiyle değerlendirilmesi ile kolorektal kanser gelişimi ve patogenezinde etkin rol alan miRNA ve hedefledikleri mRNA'lar tanımlanmıştır. Amaç doğrultusunda;

1. Literatürde kolorektal kansere yönelik miRNA profilleme çalışmalarının ham ve/veya işlenmiş verileri meta-analiz ile biraraya getirilerek ekibimiz tarafından tamamlanan 109S477 nolu TÜBİTAK projesine ait transkriptom verisi ile entegre edilmiştir.

2. Biyobelirteç potansiyeli taşıyan miRNA'lar belirlenerek ilgili miRNA'ların hedeflediği genler ve bu genlerin yer aldığı yolaklar belirlenmiştir. Belirlenen yolaklarda anahtar rolü olan ve biyobelirteç potansiyeli taşıyan miRNA ve mRNA'lar qRT-PCR yöntemi ile valide edilmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. MİKRODİZİN VERİSİ

Kolorektal kanserde (KRK) yapılan miRNA mikrodizin çalışmalarına ait ham veriler Gene Expression Omnibus (GEO) ve Array Express veritabanlarından toplanmıştır. Affymetrix platformuna ait E-MTAB-752, E-GEOD-35834 ve GSE68377 veri setleri, Agilent platformuna ait ise GSE35982 ve E-MTAB-813 veri setleri KRK' da farklı ifade edilen miRNA'ların tespiti için seçildi. Seçilen veri setlerinin toplam 161 deneysel örnek (85 tümör ve 76 kontrol) içermektedir. (Çizelge 4.1.)

Çizelge 4.1. miRNA entegre analiz çalışmasında kullanılan veri setleri

Çalışmanın Kodu	Çalışmanın Adı	Platform	Tümör Örnekleri	Kontrol Örnekleri	Dosya Formatı	Dergi	Yayınlanma tarihi
E-MTAB-752	Colon Cancer miRNA expression profiles	Affymetrix GeneChip miRNA 2.0 Array	19 Tümör	19 Normal	CEL	PLoS One	2012
E-GEOD-35834	Impact of miRNAs modulation on regulatory networks and pathways involved in colon cancer and metastasis development	Affymetrix miRNA Array 2.0	78miR(31TCRC+24liver M)+80mRNA	23 Normal	CEL	BMC Genomics	2013
E-MTAB-813	Complex Patterns of Altered MicroRNA Expression during the Adenoma-Adenocarcinoma Sequence for Microsatellite-Stable Colorectal	Agilent Human miRNA Microarray Kit (V3) 8x15K G4470C	21Tümör	21 Normal	TXT (single chip)	Clin CancerRes	2011
GSE35982	Identifying microRNA-mRNA regulatory networksin colorectal cancer by a combination of expression profile and	Agilent-021827 Human miRNA Microarray	8miR+8mRNA	8miR+8mRNA	TXT (single chip)	BMC Systems Biology	2013

	bioinformatics analysis						
GSE68377	microRNA and snoRNA expression profile in the solitary colorectal cancer	Affymetrix GeneChip miRNA 1.0 array	7 Tümör	7 Normal	CEL	Cancer Biol Ther	2015

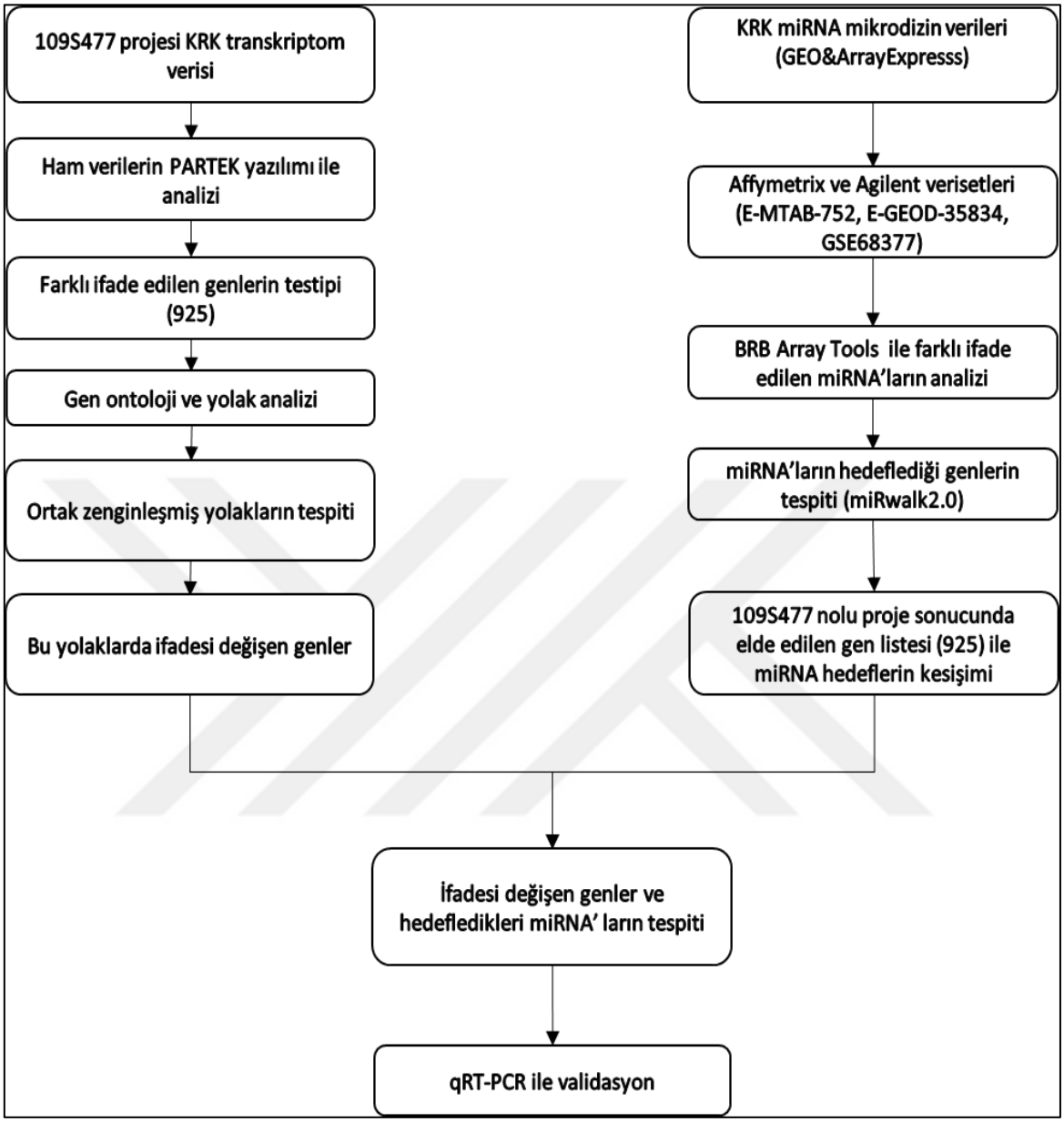
4.1.2. HASTA MATERYALLERİ

Bu tez çalışmasında, daha önce 109S477 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında kullanılan hasta materyalleri kullanılmıştır. "Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı parafin doku arşivinden, ailesinde (birinci derece akrabalarında) kanser hikayesi bulunmayan kolorektal karsinom hastalarına ait rezeksiyon materyalleri dahil edilmiştir. Tez çalışması kapsamında konvansiyonel adenokarsinom ile müsinöz ve taşlı yüzük hücreli adenokarsinomların formalinle fiksasyonu (sabitleme) yapılıp parafine yerleştirilen (Formalin-Fixed Paraffin Embedded = FFPE) materyallerininden oluşan toplam 40 kolorektal karsinom çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tümör örnekleri için belirli bir diferansiasyon derecesi dikkate alınmamış olup grade I-III kapsamında ilgili kriterlerdeki tüm kolorektal karsinomlar dahil edilmiştir. Tez çalışması kapsamında kontrol örnekleri olarak toplanan 40 kolorektal karsinomun kendi normal hücreleri (match-paired=eşli çiftler=toplam 80 örnek) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan normal hücreler cerrahi sınırın dışında tümöre en uzak hücrelerden seçilmiştir" (94).

4.1.3. HÜCRE HATTI

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir (qRT-PCR) reaksiyonlarında, primer verimliliği hesaplamalarında ve istatiksel analizlerde kullanılmak üzere Caco-2 (ATCC HTB-37) hücre hattı kullanılmıştır.

4.2. YÖNTEM



Şekil 4.1. Yöntem iş akışı

4.2.1. MİRNA MİKRODİZİN VERİLERİNİN ENTEGRE ANALİZİ

4.2.1.1. miRNA Verilerin Normalizasyonu, Filtrasyonu ve Karşılaştırılması

Affymetrix platformuna ait .CEL dosyaları indirildi ve BRB Array Tools programına yüklendi. Verilerin ön işlemesi (pre-processing) RMA metodu kullanılarak yapıldı. Karşılaştırma yapılacak tümör ve kontrol grupları belirlendi ve bu gruplar arasında farklı ifade edilen miRNA' lar $p \leq 0.05$ ve fold change $\geq 1,5$ filtreleri kullanılarak belirlendi. Agilent platformuna ait veriler Quartile normalizasyon metodu ile normalize edildi ve

Affymetrix verilerinin analizinde kullanılan filtreler kullanılarak farklı ifade edilen miRNA'lar belirlendi.

4.2.1.2. Ortak miRNA'ların Tespiti ve Hedeflerinin Belirlenmesi

Analizler sonucunda Affymetrix ve Agilent verilerinde KRK' da farklı ifade edilen miRNA' lar tespit edildi. Bu iki platforma ait farklı ifade edilen miRNA listeleri kesiştirildi ve ortak miRNA'lar bulundu. Bir miRNA birden çok mRNA'yı hedefleyerek mRNA'nın ekspresyonunun azalmasına ya da tamamen degredasyonuna sebep olabildiği bilgisi dikkate alınarak miRWalk 2.0 (http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/) kullanılarak her bir miRNA' nın hedeflediği genler bulundu.

4.2.1.3. mRNA Transkriptom Verilerinin Analizi

109S477 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında 49 tümör ve 49 eşli kontrol örneği kullanılarak mikrodizin çalışması gerçekleştirilmişti. Ham mikrodizin verileri PARTEK yazılımı ile analiz edildi ve farklı ifade edilen 925 gen listesi elde edildi. DAVID yolak analizi ile bu genlerin zenginleştiği yolaklar ve bu yolaklarda ifadesi değişen genler belirlendi. Daha sonra miRNA-meta analiz çalışmasıyla bu genler entegre edildi.

4.2.1.4. Farklı İfade Edilen mRNA Verilerimiz ile miRNA Hedeflerinin Entegrasyonu

109S477 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında 49 KRK tümör ve eşleştirilmiş normal dokuları kullanılarak mikrodizin yöntemi ile farklı ifade edilen mRNA' lar daha önce tespit edilmişti. Bu transkriptomik veri sonuçları (925 gen) meta analiz sonucunda miRNA'ların hedeflediği gen listeleriyle karşılaştırıldı. Bunun sonucunda meta analiz ile 109S477 verilerinde bulunan ve regüle eden- regüle edilen aday genler belirlendi. Böylece qRT-PCR validasyonunda kullanılacak miRNA' lar ve hedefledikleri genler tespit edildi.

4.2.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ

Tez çalışmasında kullanılan Caco-2 hücre hattının kültür edildiği besiyeri için kullanılan malzemeler Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. CaCo-2 hücre hattı kültür besiyeri içeriği

Hücre hattı	Gerekli malzemeler
Caco-2	DMEM with 4.5 g/L Glucose, without L-Glutamine (Lonza, 12-614F)
	%20 FBS
	%20 FBS
	2 mM L-Glutamine
	1X MEM NEAA
	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
	5 µg/ml Plasmocin

4.2.2.1. Dondurulmuş hücrelerin açılması ve ekimi

- Hücrelerin açılması için ilk olarak kültür besiyeri 37˚C'de ısıtıldı ve santrijüj +4˚C'ye ayarlandı.
- Sıvı azottan alınan Caco-2 hücresi buz üzerinde hücre kültürü odasına getirilerek su banyosuna konuldu ve yaklaşık 2 dk inkübe edildi.
- 1 ml hücre süspansiyonu, 4 ml önceden ısıtılmış kültür besiyerine eklenip karıştırıldı ve 15 ml falkon tüpe aktarıldı.
- 1,500 rpm 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellette kalan hücreler taze kültür besiyerinde çözüldükten sonra T75'lik kültür kaplarına aktarıldı.
- Mikroskop altında kontrol edildikten sonra 37 °C %5 CO_2 inkübatörüne kaldırıldı.

4.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması

- Ekilen hücreler her gün mikroskop altında kontrol edildi ve %80 doluluğa ulaşan hücreler pasajlandı.
- Pasajlama işlemi yapılmadan önce kültür besiyeri, PBS ve Tripsin edta su banyosunda 37˚C'de yarım saat inkübe edildi.
- Hücreler üzerine ilk olarak 10 ml PBS eklendi, hücreler yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı.
- T75'lik falsklar içerisine 4 ml Tripsin edta eklende ve 37oC inkübatörde yaklaşık 3 dakika beklenildi.

- İnvert mikroskop altında hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrışıp ayrışmadığı kontrol edildi.

- Ayrışan hücrelerin üzerine 8 ml kültür besiyeri eklendi ve 15 ml'lik falkon içerisine alındı. 1,500 rpm'de +4oc'de 5 dk santrifüj edildi.

- Pellette kalan hücreler taze kültür besiyerinde çözüldükten sonra 1:3 oranında T-75 flaska ekildi. Mikroskop altında kontrol edildikten sonra 37 °C %5 CO_2 inkübatörüne kaldırıldı.

4.2.3. RNA İZOLASYONU

4.2.3.1. Parafine Gömülü Dokulardan Ayrıştırılan Tümör Ve Normal Hücrelerden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, deparafinizasyon basamağı dışında Qiagen RNeasy FFPE ticari kiti (Katalog No: 73504) kullanılarak üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda yapılmıştır. Deparrafinizasyon işlemi Belder N(2016) makalesine göre yapılmıştır.

Deparaffinizasyon

1. Deparafinize edilecek lamlar şalelere yerleştirilir.

2. Şalelere lamlardaki doku kesitlerini aşacak şekilde ksilen eklenir.

3. Kesitler 10 dk deparafinize edilir.

4. Taze ksilen dolu kapta 2 ve 3. adımlar tekrarlanır

5. Lamlar %100'lük alkol ile doldurulmuş şaleye alınır ve 5 dk inkübe edilerek ksilenin uzaklaşması sağlanır.

6. 5. adım taze %100'lük alkol dolu şalede tekrarlanır.

7. Lam kutusu alkol dolu kaptan çıkarılır, distile suda 30 sn yıkanır ve alkolün kesitler üzerinden tamamen uçması beklenir.

8. RNaz ZAP ile temizlenmiş bistüriler yardımı ile mikroskop altında tümörlü bölgeler kazınarak hücreler RNazsız tüplere alınır.

Kit Protokolü

1. Tümörlü bölgenin disekte edildiği tüplere 240 ul Buffer PKD eklenir ve vortekslenir.
2. 1 dk 11,000 x g (10,000 rpm)'de santrifüj edilir.
3. 10 ul Proteinaz K alt, temiz faza eklenir (to the lower, clear phase). Pipetaj ile dikkatlice karıştırılır.
4. 56 ℃'de 15 dk, daha sonra 80 ℃'de 15 dk inkübe edilir.

Eğer çalkalama özelliği bulunmayan bir ısı bloğu kullanılıyorsa her 3-5 dk'da bir örnek vorteks ile karıştırılır. Tek bir ısı boloğu kullanılıyorsa, 56 ℃ inkübasyondan sonra ısı bloğu 80 ℃' ye ulaşana kadar örnek oda sıcaklığında bekletilir.

5. Alt, renksiz fazı (the lower, uncolored phase) yeni bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpe transfer edilir.
6. Buz üzerinde 3 dk inkübe edilir. Daha sonra 15 dk 20,000 g'de (13,500 rpm) santrifüj edilir.
7. Süpernatant dikkatli bir şekilde, pellete dokunmadan yeni bir mikrosantrifüj tüpüne (kit içerisinnde yok) transfer edilir.
8. Total örnek hacminin onda biri kadar (yaklaşık 16 ul ya da 25 ul) DNase Booster Buffer ve 10 ul DNase I stock solusyonundan eklenir. Tüp ters-düz edilerek karıştırılır. Tüpün kenarında kalan sıvıların toplanması için kısa bir santrifüj yapılır.
9. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilir.
10. 500 ul Buffer RBC binding koşullarını ayarlamak amacıyla eklenir ve lizat iyice karıştırılır.
11. 1750 ul etanol (%100) örneğe eklenir ve pipetaj ile iyice karıştırılır.
12. 700 ul örneği (oluşabilecek olan çöküntüleri de içeren) 2 ml'lik tüpe yerleştirilmiş RNeasy MinElute spin kolona aktarılır. Kapak dikkatlice kapatılır ve 15 saniye ≥8000 xg (≥10,000 rpm) santrifüj yapılır. Tüpe akan sıvı uzaklaştırılır. Kolon aynı tüpe konulur.

13. Basamak tüm örnek RNeasy MinElute spin kolondan geçene kadar tekrar edilir. Aynı collection tüp ile devam edilir.

14. 500 ul Buffer RPE kolona eklenir. Kapağı dikkatlice kapatılır ve 15 s ≥8000 xg (≥10,000 rpm) santrifüj yapılır. Sıvı uzaklaştırılır. Aynı collection tüp ile devam edilir.

15. 500 ul Buffer RPE kolona eklenir. Kapağı dikkatlice kapatılır ve 2 dk ≥8000 xg (≥10,000 rpm)'de membranın yıkanması için santrifüj yapılır. Sıvı collection tüp ile birlikte uzaklaştırılır.

Santrifüjden sonra RNeasy MinElute spin kolon, collection tüpünden uzaklaştırılırken çok dikkatli olunmalıdır. Kolon sıvı ile temas etmemelidir. Teması durumunda etanol spin kolona bulaşır.

16. RNeasy MinElute spin kolon yeni bir 2 ml'lik colloection tüpe yerleştirilir. Spin coloumnun kapağı açık şekilde maksimum hızda 5 dk santrifüj yapılır. Collection tube akan sıvı ile birlikte uzaklaştırılır.

17. RNeasy MinElute spin kolon yeni bir 1.5 ml'lik colloection tüpe yerleştirilir. 14-30 ul RNase-free su memrana değmeden doğrudan kolona eklenir. Kapağı kapatılır ve en yüksek hızda 1 dk santrifüj yapılır.

4.2.3.2. Hücre Hattından Rna İzolasyonu

1. Hücreler 1 ml Qiazol içerisine alınır.

2. Hücrelerin gruplanma ve yapışma ihtimaline karşı vorteks yapılır ve hücreler ince uçlu enjektörden geçirilir.

3. 1000 ul Trizol ve örnek karışımı için 1/5 oranında (200 ul) kloroform eklenir.

4. Kloroform eklendikten sonra tüpler sertçe çalkalanır ve 1-2 dk beklenir.

5. 13300 rpm'de +4˚C'de 15 dk santrifüj edilir.

6. Berrak faz pipetle alınır.

7. Başlangıç trizol miktarının yarısı kadar (500 ul) izopropanol eklenir, pipetaj yapılır ve oda sıcaklığında 10 dk beklenir.

8. 13300 rpm'de +4˚C'de 15 dk santrifüj edilir.

9. Süpernatant pellete dikkat edilerek boşaltılır ve pelletin kuruması beklenir.

10. Başlangıç trizol miktarı kadar %70'lik etanol ile 10,000 rpm'de +4˚C'de 15 dk santrifüj edilir.

11. Süpernatant pellete dikkat edilerek boşaltılır ve 10. Basamak tekrarlanır.

12. Süpernatant boşaltılır ve tüpün ağzı açık şekilde pellet kurumaya bırakılır.

13. 20 ul nükleazsız su ile pellet çözdürülür.

4.2.3.3. RNA'nın Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini

RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometre ile. RNA 260 nm, protein 280 nm, fenol ve diğer bileşikler ise 230 nm dalga boyunda maksimum absorbans değeri vermektedir. RNA'nın saflığı A260/280 ve A230/280 oranları dikkate alınarak değerlendirilmektedir. 260/280 oranının ~2 olması, A260/ A230 oranının ise 1,8-2,2 aralığında olması gerekmektedir. Tez çalışması kapsamında A260/280 ve A230/280 oranları için ilgili aralıklar dikkate alınmıştır.

4.2.3.4. RNA Bütünlüğünün Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlüğü %1'lik garoz jel elektroforezinde yürütülerek değerlendirilmiştir. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar ve hazırlanma şekilleri aşağıdaki gibidir:

- **5X TBE (Tris-HCI, Borik Asit, EDTA)**

-54 g Trisma Base (AppliChem, Katalog no. A2264,100),

-27,5 g Borik Asit (Sigma, Katalog no. B6768),

-20 ml 0.5 M EDTA'nın (pH=8,0) 800 ml deiyonize su içerisinde manyetik karıştırıcı ile çözülmesi sağlanır ve daha sonra 1000 ml'ye tamamlanır. 5X TBE'nin deiyonize su ile 1/5 oranında seyreltilmesi ile 1X TBE sölüsyonu hazırlanır ve 1X TBE ise agaroz jel hazırlanarak RNA örnekleri ve PZR ürünlerinin yürütülmesinde kullanılır.

- **DNA Merdiveni (100 bp DNA Ladder)**

DNA merdiveni (Thermofisher Gene Ruler, Katalog no SM241) üzerine 166 µl 6X Loading Dye (Fermantas, R0611) ve 734 µl distile su ilave edilir. Vorteks yardımı ile karıştırılır.

- **%1'lik agaroz jel hazırlanması**

0,6 g agaroz (Biomax, Katalog no. 144503PR) hassas terazi ile tartılır ve üzerine 60 ml 1X TBE eklenir. Hazırlanan agaroz ve TBE karışımı mikrodalga fırın ile homojen hale gelene kadar çözdürülür. Üzerine 7 ul RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (Intron Biotechnology, Katalog no. 21141) eklenir ve jel tablasına dökülür. Taraklar yerleştirilir ve jelin donması için 30 dk beklenir.

4.2.4. CDNA SENTEZİ

4.2.4.1. miRNA-cDNA Sentezi

miRNA ifade validasyonu için qRT-PCR deneylerinde kullanılmak üzere cDNA sentezi miRCURY LNA RT Kit (Katalog no. 339340) kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 4.3. Bir örnek için reverse transcriptase reaksiyonunun kurulumu

Reaktif	Hacim
5× miRCURY RT Reaction Buffer	2 µl
Rna-sız su	4.5 µl
10X miRCURY RT Enzyme Kit	1 µl
Synthetic RNA spike-in control	0.5 µl
RNA kalıp (5ng/ul)	2 µl
Toplam reaksiyon hacmi	10 µl

- Karışım buz üzerinde hazırlanır. 42˚C'de 60 dk daha sonra 95˚C'de 5 dk inkübe edilir.
- cDNA sentezi sonrasında ürünler -20'de muhafaza edilir.

4.2.4.2. mRNA-cDNA Sentezi

miRNA'ların hedeflediği genlerin ifade validasyonu deneylerini gerçekleştirilmek üzere izole edilen RNA örneklerinden Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Katalog no: 04896866001) cDNA sentezi yapıldı. Başlangıç materyali olarak 500 ng RNA kullanıldı. Kit içeriği ve protokolü aşağıdaki gibidir:

Çizelge 4.4. Bir örnek için cDNA sentezi denatürasyon reaksiyonu kurulumu

Reaktif	Hacim	Final konsantrasyon
Total RNA veya poly (A)+mRNA	değişken	500 ng RNA
Anchoed-oligo(dT)18 Primer,50 pmol/µl	1 µl	2.5 µM
Random Hexamer Primer, 600 pmol/µl	2 µl	60 µM
Su	değişken	Son hacim = 13 µl olacak şekilde
Toplam	13 µl	

- Hazırlanan örnek-primer karşımı 65°C' de 10 dk inkübe edilir. İnkübasyonun ardından hemen buz üzerine alınır.

Çizelge 4.5. Bir örnek için reverse transcriptase reaksiyonunun kurulumu

Reaktif	Hacim	Final konsantrasyon
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x conc.	4 µl	1x 8 mM MgCl2
Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl	0.5 µl	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each	2 µl	1 mM herbiri
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20U/µl	0.5 µl	10 U
Toplam	20 µl	

- Tabloya göre mix hazırlanır. Denatürasyon işleminden sonra RNA örneğinin bulunduğu karışıma aktarılır ve santrifüj yapmadan, pipetaj ile karıştırılır.
    - 25°C'de 10 dk,
    - 55°C'de 30 dk,
    - 85°C'de 5 dk inkübe edilir. Ardından sentezlenen cDNA örnekleri -20'de muhafaza edilir.

4.2.5. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR)

miRNA qRT-PCR deneylerinde 20 tümör ve 20 eşli sağlıklı doku örneğinden elde edilen 1:80 oranında dilue edilmiş cDNA örnekleri kullanıldı. miRCURY LNA SYBR® Green

PCR Kit (Katalog no.339346) ve miRCURY LNA miRNA PCR Assay (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, SNORD44) kullanıldı. Reaksiyon üç teknik tekrar ile kuruldu.

Çizelge 4.6. Bir örnek için miRNA qRT-PCR reaksiyon bilgileri

Komponent	**Hacim**
2x miRCURY SYBR® Green Master Mix	5 µl
cDNA örneği	4 µl (1:80 oranında seyreltik)
RNasız su	1 µl
Toplam hacim	10 µl

Çizelge 4.7. miRNA-qRT-PCR program bilgileri

Aşamalar	**Süre**	**Sıcaklık**	**Artış hızı**	**Döngü sayısı**
Isı aktivasyonu	2 min	95°C	Maximal/fast mode	
Denatürasyon	10 s	95°C	Maximal/fast mode	
Bağlanma ve Uzama	60 s	56°C	Maximal/fast mode	45 döngü
Erime Eğrisi Analizi		60–95°C		

Çizelge 4.6.'de yer alan miktarlara göre reaksiyon mixi hazırlandı. Plate içine dağıtılmış olan cDNA'lar üzerine mix eklendi ve plate seal ile kapatıldıktan sonra santrifüj ile karıştırıldı. qRT-PCR deneylerinde Roche Light Cycler 480 cihazı kullanıldı.

mRNA qRT-PCR deneylerinde LightCycler® 480 SYBR Green I Master mix (Katalog no. 0488735201) ve Çizelge 4.5.'e göre sentezlenen cDNA örnekleri kullanıldı. qRT-PCR reaksiyonlarında kullanılan reaksiyon ve program bilgileri Çizelge 4.9.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Bir örnek için mRNA qRT-PCR bilgileri

Komponent	**Hacim**
SYBR® Green Master Mix, 2x konsantrasyon	5 µl
cDNA örneği (5 ng/ul)	2 µl
İleri primer (10 pmol)	0,5 µl
Geri primer (10 pmol)	0,5 µl
RNasız su	3 µl
Toplam hacim	10 µl

Çizelge 4.9. mRNA qRT-PCR program bilgileri

Program adı	**Sıcaklık**	**Acquisition Mode**	**Süre**	**Döngü sayısı**	**Analiz modu**
Pre-inkübasyon	95°C	none	5 dk	1	None
Amplifikasyon	95°C	none	10 sn	45	Quantification mode
	primere bağlı değişken	none	30 sn		
	72°C	single	30 sn		
Melting curves	95°C	none	5 sn	1	Melting curve

	65°C	none	1dk		
	97°C	continous	-		
Soğuma	40°C	none	10 sn	1	None

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. MİRNA ENTEGRE ANALİZ BULGULARI

GEO ve ArrayExpress veri tabanlarından indirilen Affymetrix E-MTAB-752, E-GEOD-35834 ve GSE68377 veri setlerinin analizi sonucunda 110 farklı ifade edilen miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA' ların 63'ünün tümör dokusunda ifadesi artarken 47'sinin tümör dokusunda ifadesi azalmıştır. İfadesi değişen bazı miRNA'lara ait BRB Array Tools analiz sonuçları aşağıdaki gibidir:

Çizelge 5.1. Affymetrix verilerinde ifadesi artan miRNA'lar

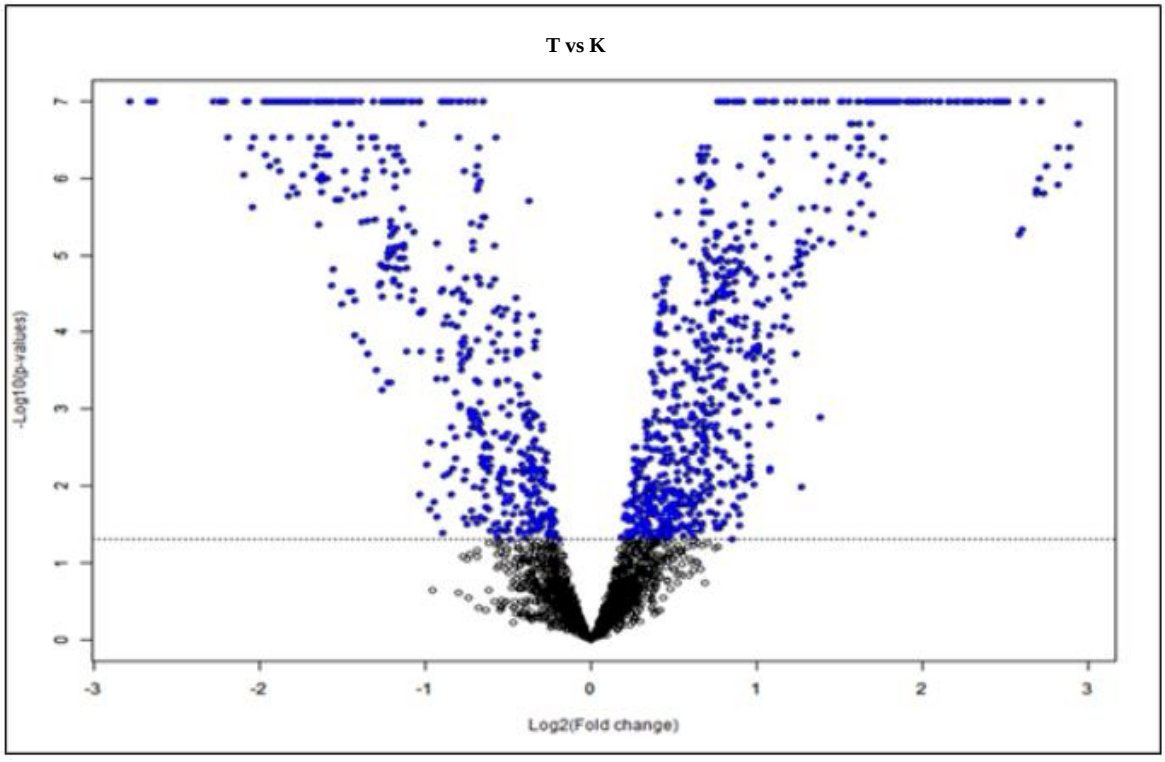
ProbeSet	Kat Değişimi	Parametrik p-değeri	FDR	Geom mean of intensities in tumor	Geom mean of intensities in normal
hsa-miR-31_st	6	5,40E-06	4,39E-05	48,74	8,13
hsa-miR-1246_st	4,86	< 1e-07	< 1e-07	63,36	13,04
hsa-miR-183_st	3,94	< 1e-07	< 1e-07	16,13	4,09
hsa-miR-182_st	3,83	< 1e-07	< 1e-07	220,14	57,52
hsa-miR-503_st	3,46	< 1e-07	< 1e-07	13,11	3,79
hsa-miR-18a_st	3,42	1,00E-07	1,37E-06	195,78	57,21
hsa-miR-1308_st	3,11	4,00E-07	4,63E-06	482,11	154,99
hsa-miR-224_st	2,93	< 1e-07	< 1e-07	9,84	3,36
hsa-miR-21_st	2,93	4,00E-07	4,63E-06	226,36	77,14
hsa-miR-18b_st	2,88	< 1e-07	1,37E-06	14,39	5
hsa-miR-21-star_st	2,52	< 1e-07	< 1e-07	21,16	8,4
hsa-miR-708_st	2,3	9,38E-05	0,000517	22,57	9,81
hsa-miR-19a_st	2,15	8,43E-05	0,000472	9,83	4,56
hsa-miR-886-5p_st	2,15	0,0004443	0,00207	26,31	12,22
hsa-miR-29b-1-star_st	2,14	1,70E-06	1,55E-05	6,81	3,18
hsa-miR-92a-1-star_st	2,14	3,80E-06	3,23E-05	7,85	3,66
hsa-miR-106b-star_st	2,14	0,0008062	0,00358	29,56	13,84
hsa-miR-720_st	2,11	0,0062816	0,0218	25,5	12,11
hsa-miR-552_st	2,05	4,54E-05	0,000273	8,85	4,32

Çizelge 5.2. Affymetrix verilerinde ifadesi azalan miRNA'lar

miRNA Probe set	Kat Değişimi	Parametrik p-value	FDR	Geom mean of intensities in tumor	Geom mean of intensities in normal
hsa-miR-768-5p_st	0,69	0,0121283	0,0382	442,96	646,39
hsa-miR-147b_st	0,66	0,0002374	0,00116	3,06	4,65
hsa-miR-1_st	0,64	0,0011563	0,00496	2,42	3,76
hsa-miR-30c_st	0,63	1,10E-06	1,06E-05	265,62	421,74
hsa-miR-214_st	0,63	0,0015372	0,006 3	223,47	356

hsa-miR-363_st	0,63	0,0105869	0,0341	4,39	6,93
hsa-miR-139-3p_st	0,62	1,20E-06	1,14E-05	2,43	3,89
hsa-miR-574-3p_st	0,62	0,0001261	0,000671	178,62	288,23
hsa-let-7e_st	0,61	6,80E-06	5,42E-05	616,39	1007,22
hsa-miR-490-3p_st	0,61	0,0014151	0,0059	2,32	3,78
hsa-miR-125b_st	0,43	9,30E-06	7,03E-05	356,91	834,51
hsa-miR-143_st	0,42	< 1e-07	< 1e-07	1410,1	3359,55
hsa-miR-378-star_st	0,42	8,00E-07	8,27E-06	8,51	20,22
hsa-miR-10b_st	0,38	< 1e-07	1,37E-06	20,83	54,5
hsa-miR-375_st	0,37	0,0001098	0,000592	158,6	426
hsa-miR-150_st	0,36	1,00E-07	1,37E-06	58,32	163,31
hsa-miR-133a_st	0,36	8,00E-07	8,27E-06	3,88	10,86
hsa-miR-145_st	0,35	< 1e-07	< 1e-07	1688,64	4843,33
hsa-miR-486-5p_st	0,35	4,27E-05	0,000257	23,87	67,62

BRB Array Tools programı ile analiz edilen affymetrix veri setlerinde normal ve tümör dokularında ifadesi değişen miRNA'ların Volcano plot grafiği çizilmiştir (Şekil 5.1). Grafikte ifade değişimi anlamlı olan miRNA'lar ($p<0,05$) mavi renk ile belirtilirken ifade değişimi anlamsız olan miRNA'lar ($p>0,05$) siyah renk ile belirtilmektedir.



Şekil 5.1. Affymetrix veri setlerinde farklı ifade edilen miRNA'ların Volcano plot grafiği

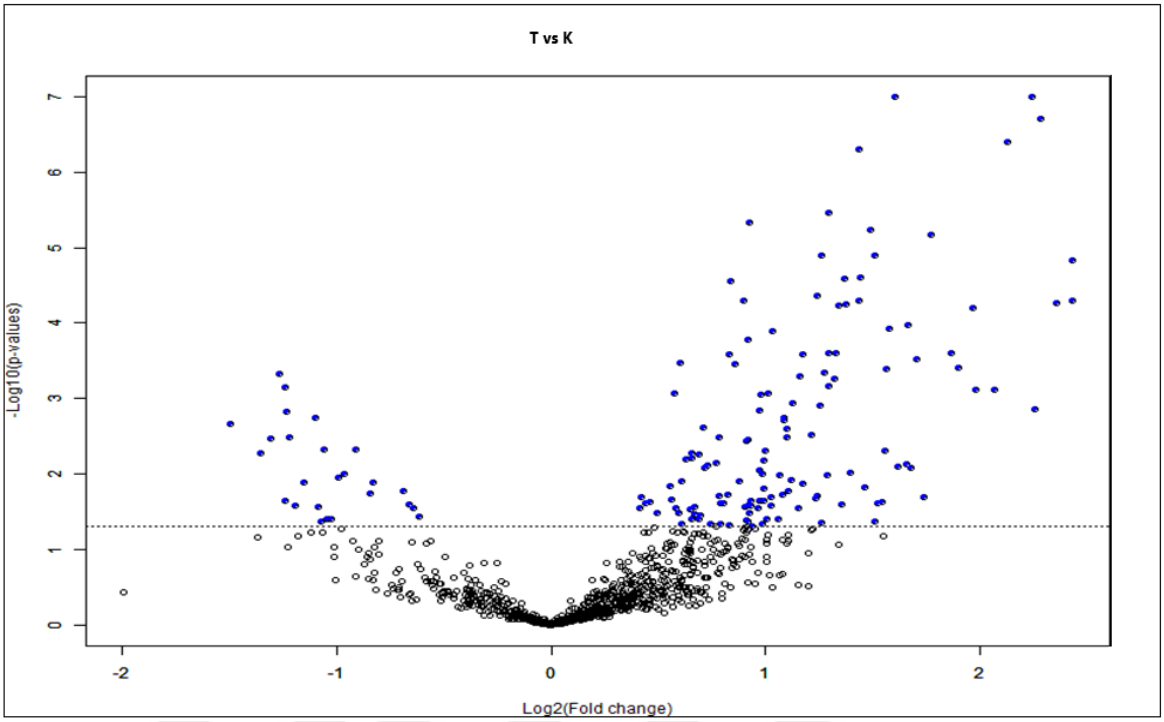
Agilent platformuna ait GSE35982 ve E-MTAB-813 veri setlerinin BRB Array Tools programı ile analizi sonucunda hasta ve kontrol örnekleri arasında farklı ifade edilen 90

miRNA belirlenmiştir. Bu miRNA'ların 75'inin ifadesi tümör dokularında artarken 15'inin ifadesi tümör dokularında azalmıştır.

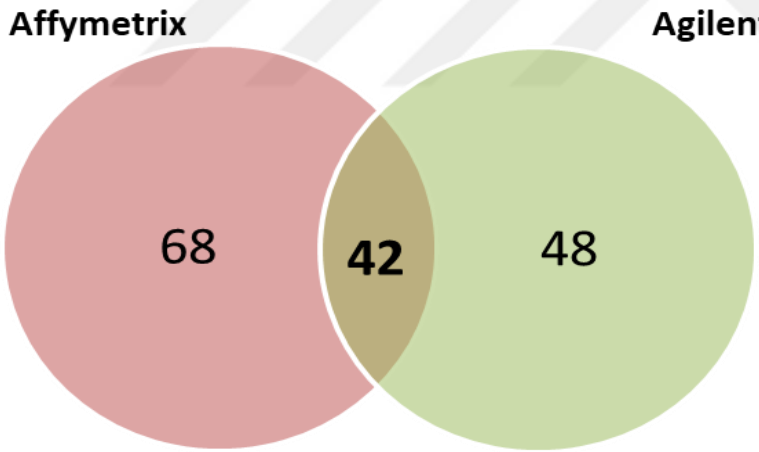
Çizelge 5.3. Agilent verisetinde ifadesi değişen miRNA'lar

MicroRNA	Kat Değişimi	Parametrik p-değeri	FDR	G.mean of Intensities in Tumors	G.mean of Intensities in Normal
hsa-miR-135b	5.385	5.35E-05	0.00252	14.22	2.78
hsa-miR-886-3p	5.384	0.0001289	0.00472	160.68	78.63
hsa-miR-224	4.733	2.00E-07	6.35E-05	57.78	11.87
hsa-miR-183	3.952	0.0 07527	0.0162	18.22	4.61
hsa-miR-21	3.904	6.42E-05	0.00266	4006.15	1026.06
hsa-miR-96	3.738	0.0013924	0.026	19.94	4.18
hsa-miR-424	3.406	0.0002465	0.00787	29.63	8.12
hsa-miR-409-3p	3.276	0.0003062	0.00884	3.21	0.98
hsa-miR-483-3p	3.2	0.0082609	0.0972	6.24	1.95
hsa-miR-30a*	-2.038	0.03934	0.26	3.18	6.48
hsa-miR-145	-2.084	0.00471	0.0663	304.87	635.42
hsa-miR-551b	-2.227	0.01301	0.133	2.29	5.1
hsa-miR-150	-2.356	0.00345	0.0513	24.96	61.74
hsa-miR-133b	-2.359	0.00326	0.05	7.6	17.75
hsa-miR-195	-2.41	0.00047	0.0115	82.17	198.01
hsa-miR-1-3p	-2.559	0.0053	0.0701	24.46	62.6
hsa-miR-139-5p	-2.825	0.00215	0.036	3.14	8.87

BRB Array Tools programı ile analiz edilen agilent veri setlerinde normal ve tümör dokularında ifadesi değişen miRNA'ların Volcano plot grafiği çizilmiştir (Şekil 5.2.). Grafikte ifade değişimi anlamlı olan miRNA'lar ($p<0,05$) mavi renk ile belirtilirken ifade değişimi anlamsız olan miRNA'lar ($p>0,05$) siyah renk ile belirtilmektedir.



Şekil 5.2. Agilent veri setlerinde farklı ifade edilen miRNA'ların Volcano plot grafiği

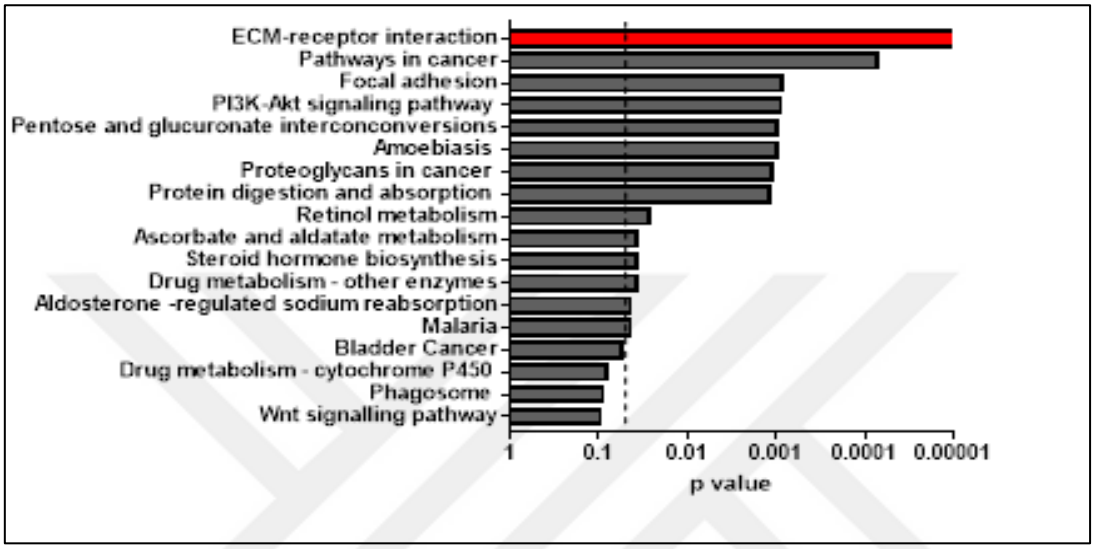


Şekil 5.3. Affymetrix ve Agilent verilerinde ortak bulunan miRNA sayısı

miRNA Affymetrix ve Agilent mikrodizin verilerinin analizi sonucunda bulunan ve ortak olan miRNA'ların (Şekil 5.3.) hedeflendiği genler miRwalk 2.0 veritabanı kullanılarak belirlenmiştir. İlgili genler ile 109S477 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında belirlenen farklı ifade edilen genler (FİG) kesiştirilerek ve yolak analizi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda belirlenen miRNA'lar, hedefledikleri ters korelasyon ifade gösteren genler ve bulundukları yolaklar EK 1. Farklı ifade edilen miRNA'lar, TERS korele genler ve bulundukları yolaklar'deki tabloda verilmiştir.

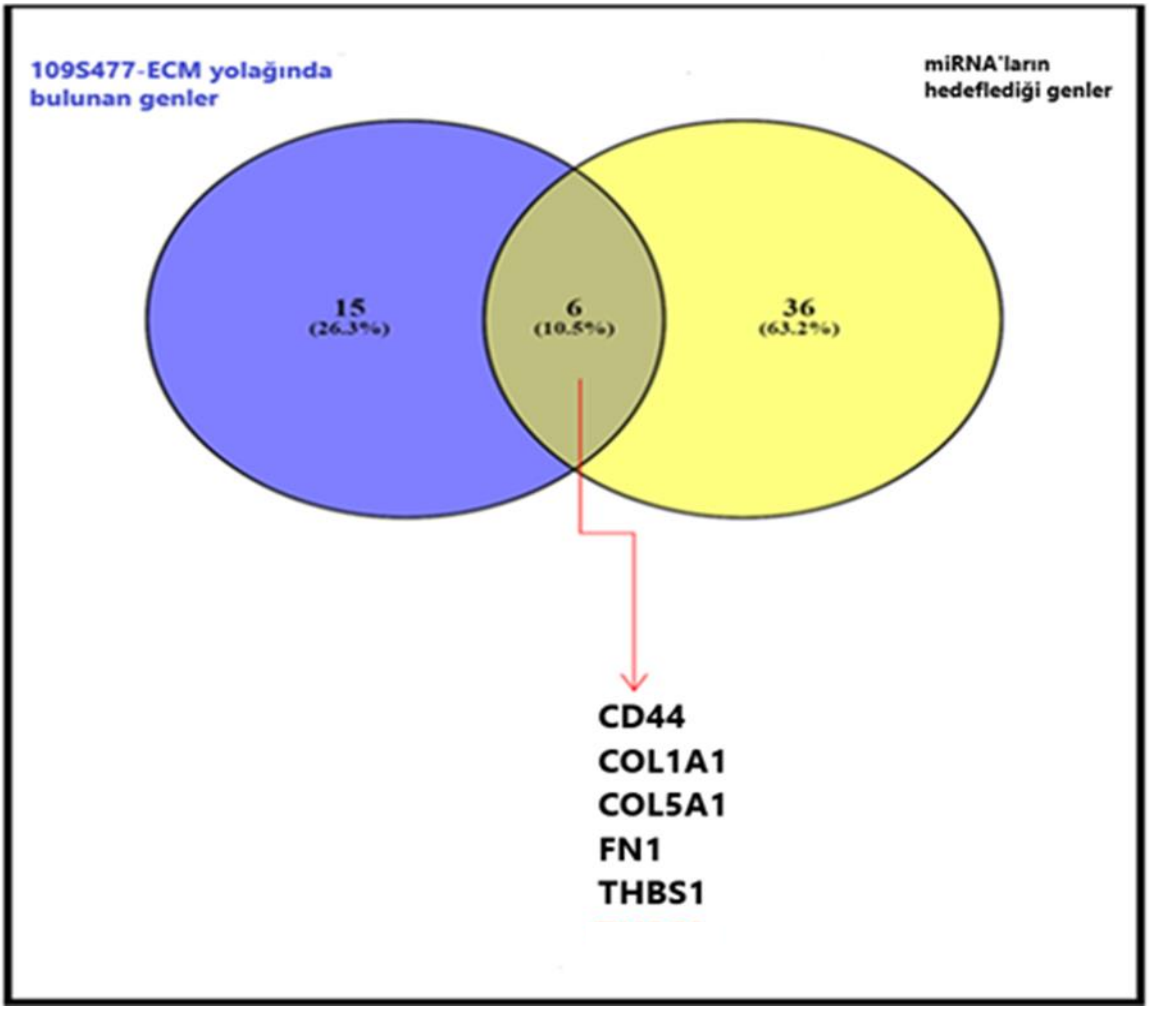
5.1.1. 109S477 TRANSKRİPTOM VERİLERİNİN ANALİZİ VE MİRNA ANALİZLERİ İLE ENTEGRASYONU

109S477 numaralı proje kapsamında KRK'da farklı ifade edilen genler (925) PARTEK programı kullanılarak belirlenmiştir. Bu genlerin DAVID programı ile yapılan yolak analizi sonucunda ECM-reseptör etkileşim yolağı ön plana çıkmıştır (Şekil 5.4.).



Şekil 5.4. Gen listesinde zenginleşen yolaklar

Yolak analizi sonrasında ECM-receptor interaction yolağına yoğunlaşılmıştır. Bu yolakta bulunan genler ve miRNA entegre analiz çalışması sonrası elde edilen sonuçlar entegre edildiğinde yolakta bulunan, ifadesi değişen ve miRNA'lar tarafından regüle edildiği düşünülen genler ve regüle eden miRNA'lar yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir (Şekil 5.5.).



Şekil 5.5. ECM-reseptor etkileşim yolağında bulunan önemli genler

Bu iki veri setinde ifadesi önemli derecede değişen genler, kat değişimleri, ilgili genleri regüle eden miRNA'lar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 5.4. ECM yolağında bulunan genler, regüle edildikleri miRNA'lar ve ifade değişim değerleri

Hedef Gen	**109S477-kat değişimi**	**miRNA**	**Affymetrix-kat değişimi**	**Agilent-kat değişimi**
CD44	2,04554	miR-145-5p	-2,868	-2.084
		mir-30a	-2,256	-2.038
		hsa-miR-1-3p	-1,554	-2.559
COL1A1	7,46996	hsa-miR-133a-3p	-2,799	-1.794
COL5A1	3,74258	hsa-miR-145-5p	-2,868	-2.084
FN1	2,70179	hsa-miR-1-3p	-1,554	-2.559
THBS1	-2,9164	hsa-mir-17	1,84	2.709
		hsa-mir-19a	2,156	2.156
		hsa-miR-182-5p		4,812

İleri analizlere alınmasına karar verilen hsa-miR-145-5p, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-182-5p miRNA'larının hedeflediği genlere ayrıca bakıldığında aşağıdaki tablo elde edilmiştir.

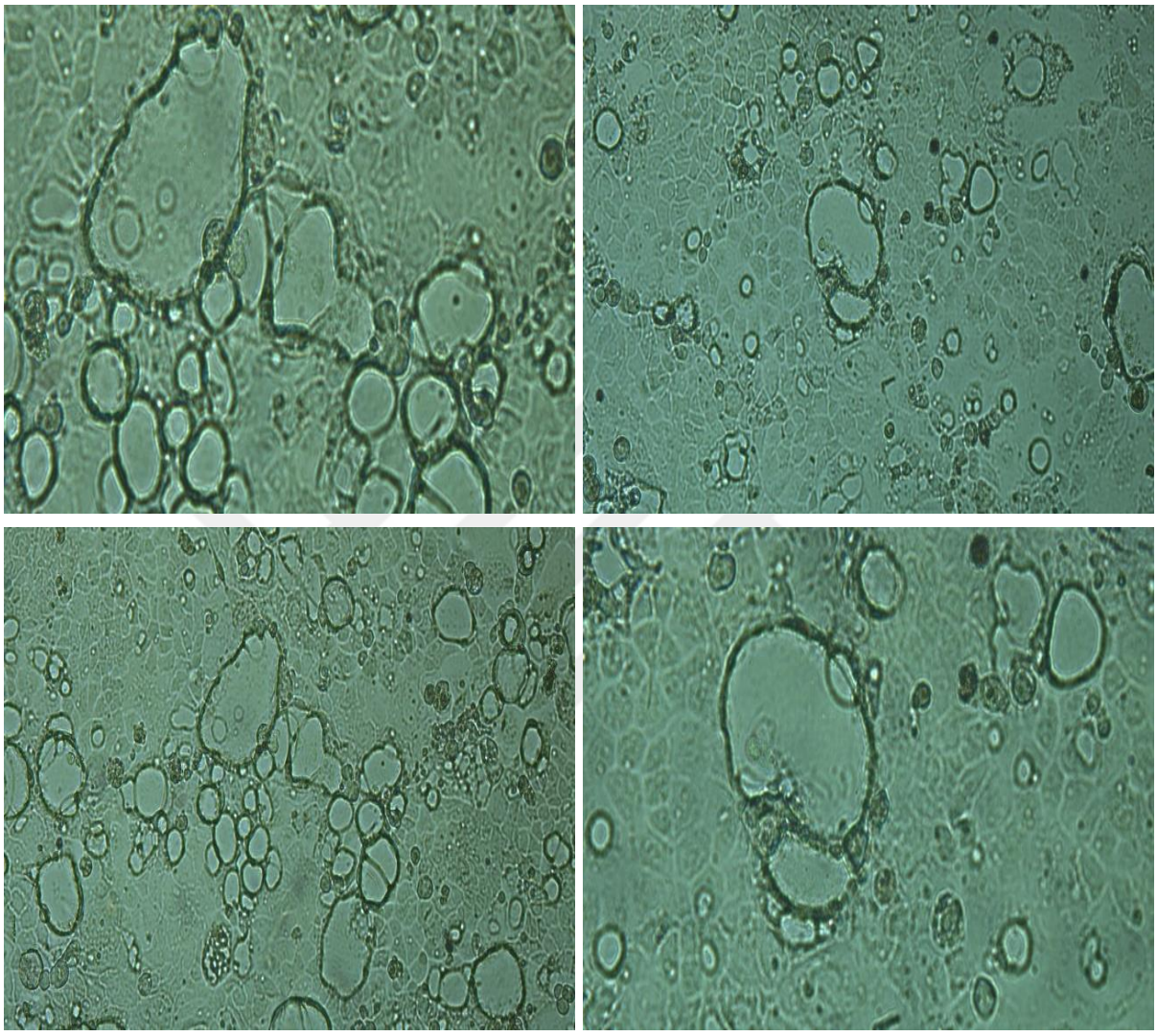
Çizelge 5.5. miRNA entegre analiz çalışması sonucunda seçilen miRNA'lar ve hedefledikleri genler

miRNA	Affymetrix-kat değişimi	Agilent-kat değişimi	Hedef gen	109S477-kat değişimi
hsa-miR-145-5p	-2.868	-2.084	CCND1	2,34638
			VEGFA	2,96671
			MMP1	4,31942
			STAT1	2,25168
			CD44	2,04554
			SERPINE1	3,62393
			SOD2	2,04265
			COL5A1	3,74258
hsa-miR-1-3p	-1.554	-2.559	CD44	2,04554
			CCND1	2,34638
			FN1	2,70179
			TIMP3	2,67179
hsa-miR-133a-3p	-2.799	-1.794	VEGFA	2,96671
			THBS2	20,2049
			COL1A1	7,46996
			BCL2L1	2,26022
hsa-miR-182-5p		4.812	PDCD4	-2,70497
			THBS1	-2,9164

Laboratuvarımızda daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda miR-145-5p, hsa-mir-182-5p miRNA'larının validasyonu qRT-PCR yöntemiyle gerçekleştirilmiş ancak bu miRNA'ların hedefi olan ve yapılan analizler ile belirlenen *COL5A1* ve *THBS1* genlerinin ifade değişim validasyon deneyleri gerçekleştirilmemiştir. Bundan dolayı ECM- reseptör etkileşim yolağında bulunan, ifadesi artan *COL5A1* ve ifadesi azalan THBS1 genlerinin validasyonu tez kapsamına dahil edilmiştir. Bu genler dışında yine bu yolakta bulunan, ifadesi artan *CD44, COL1A1, FN1*, genleri validasyon deneyleri için seçilmiştir. ECM- reseptör etkileşim yolağında bulunmayan ancak miRNA'ların ortak hedefi olan, ifadeleri önemli oranda artan *CCND1* ve *VEGFA* genleri de validasyon çalışmalarına dahil edilmiştir. Bu genleri regüle ettiği düşünülen hsa-mir-1-3p ve hsa-mir-133a-3p miRNA'ları ise qRT-PCR deneylerinde valide etmek için seçilen miRNA'lardır. miRNA regülasyonundan bağımsız olarak, transkriptom mikrodizin verisinde önemli derecede artış olduğu gözlemlenen *SPP1* geni de qRT-PCR vaalidasyon çalışmalarına dahil edilmiştir.

5.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYİ BULGULARI

Caco-2 hücre hattı kullanılarak yapılan hücre kültürü deneylerinde, yeterli doluluğa ulaşan hücrelerin RNA izolasyon işleminden önce invert mikroskopta görüntülenmiştir (Şekil 5.6.).



Şekil 5.6. Caco-2 hücreleri invert mikroskop görüntüleri

5.3. RNA İZOLASYONU BULGULARI

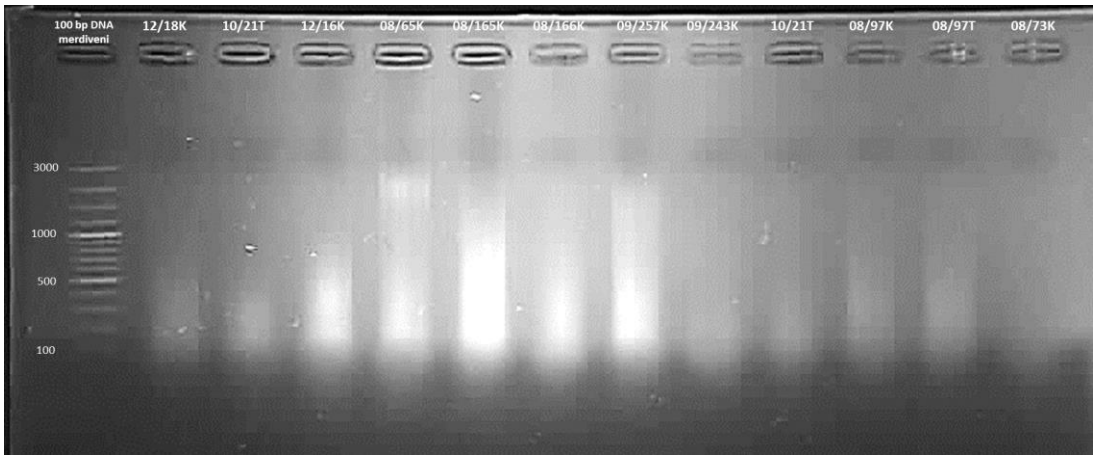
Qiagen FFPE RNeasy İsolation kiti ile yapılan izolasyon deneylerinde RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla kantitatif analizi spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000) ile gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyon sonuçlarının bir kısmı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Çizelge 5.6.).

Çizelge 5.6. RNA izolasyon sonuçları

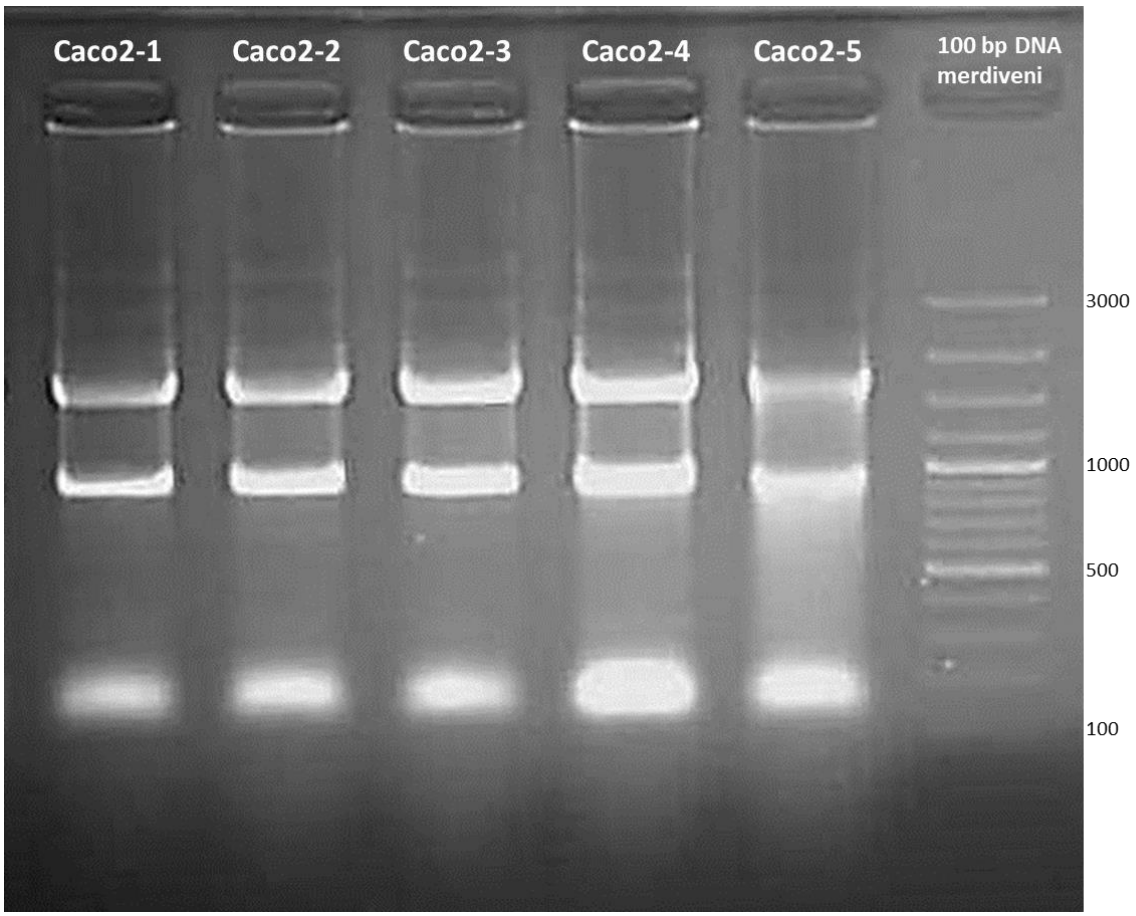
Örnek	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
09/131T	106,38	2,66	1,329	2	1,98
10/12T	146,44	3,661	1,834	2	1,97
08/165K	435,46	10,887	5,462	1,99	1,82
08/166K	285,72	7,143	3,731	1,91	1,49
08/74K	316,5	7,913	3,945	2,01	1,83
09/93K	360,78	9,02	4,404	2,05	1,93
08/119K	404,59	10,115	5,16	1,96	1,7
09/131K	358,41	8,96	4,379	2,05	1,89
10/109K	394,3	9,857	4,951	1,99	1,91
10/145K	366,4	9,16	4,533	2,02	1,94
12/10K	417,91	10,448	5,162	2,02	1,94
08/104K	286,76	7,169	3,601	1,99	1,74
09/19K	463,59	11,59	5,571	2,08	1,91
08/140K	264,7	6,617	3,354	1,97	1,81
10/32K	464,68	11,617	5,855	1,98	1,87
09/257T	397,18	9,929	5,012	1,98	1,99
09/243T	137,78	3,444	1,935	1,78	1,46
12/12K	322,22	8,055	4,007	2,01	1,83
10/21T	207,54	5,188	2,59	2	1,37
12/16K	375,95	9,399	4,576	2,05	1,94
12/18K	368,42	9,211	4,572	2,01	1,95
08/97K	188,22	4,705	2,328	2,02	2,1
08/97T	315,35	7,884	3,932	2,01	2,09
10/129T	407	10,175	4,996	2,04	2,1
08/95K	270,98	6,775	3,5	1,94	1,72
08/95T	347,52	8,688	4,345	2	2,12
08/98K	269,17	6,729	3,268	2,06	1,87
10/35T	97,51	2,438	1,205	2,02	1,87
Caco-2	829,8	20,745	10,215	2,03	2,25

5.4. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ BULGULARI

İzole edilen RNA örneklerinin kalitatif analizi %1'lik agaroz jel elektroforezinde, 100 V hızda yürütülerek gerçekleştirilmiştir. Tümör ve normal dokulardan izole edilen RNA'lar degrede formda elde edilmiştir (Şekil 5.7.). Caco-2 hücre hattından izole edilen RNA'lar ise intakt formda elde edilmiştir (Şekil 5.8.).



Şekil 5.7. İzole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi



Şekil 5.8. CaCo-2 hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi

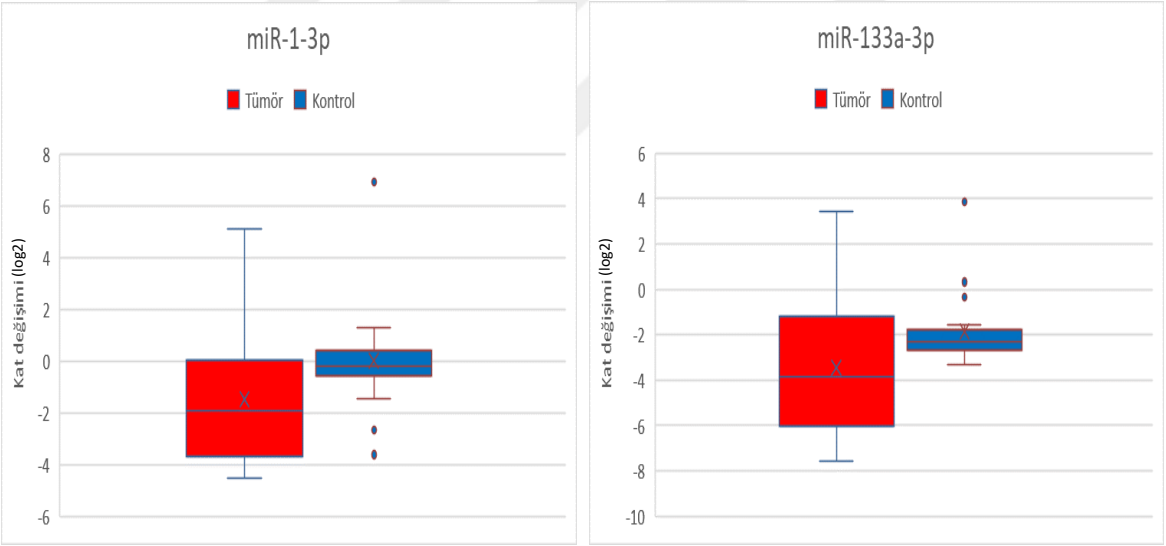
5.5. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR) BULGULARI

5.5.1. miRNA-QRT PCR BULGULARI

Meta analiz çalışması sonrasında qRT-PCR deneylerinde miR-1-3p ve miR-133a-3p primerleri ifade validasyonları için seçilmiştir. Bu primerler meta-analiz çalışmasına göre ifadesi azalan miRNA'lardır. Referans gen olarak SNORD44 kullanılmıştır. 20 tümör ve 20 kontrol örneği kullanılarak üç teknik tekrar ile kurulan reaksiyon sonuçları $2^{\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 5.7. ve Şekil 5.9'de gösterilmektedir.

Çizelge 5.7. miRNA qPCR analiz sonuçları

	miRNA ID	Kat değişimi	p-value
1	hsa-miR-1-3p	**0.27**	0.053392
2	hsa-miR-133a-3p	**0.33**	0.247610
3	SNORD44	1.00	N/A

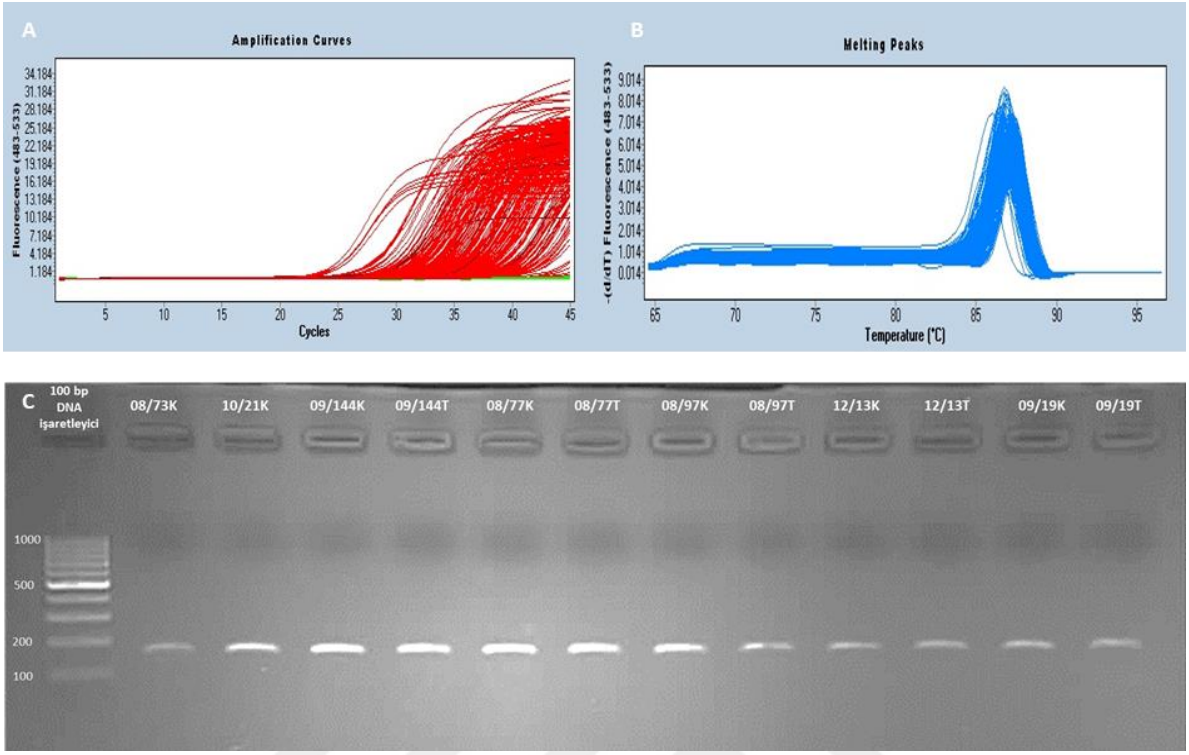


Şekil 5.9. miR-1-3p ve miR-133a-3p'nin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi

5.5.2. MRNA-QRT PCR BULGULARI

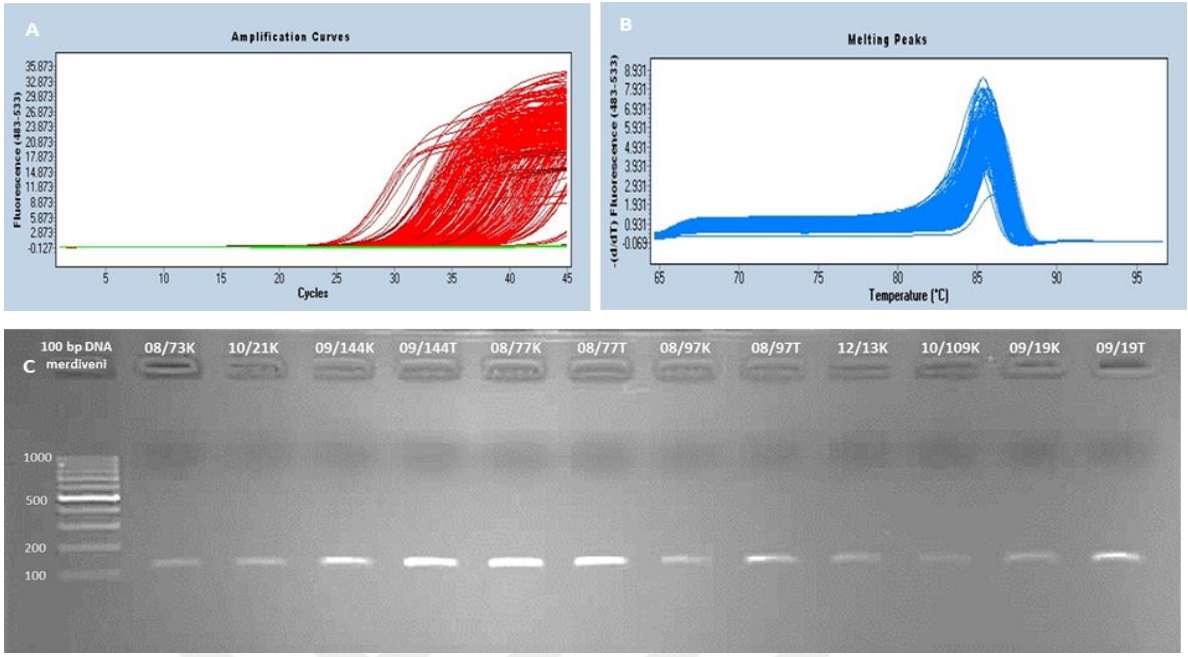
40 hasta ve eşleştirilmiş 40 sağlıklı kontrol örneği kullanılarak qRT-PCR deneyleri gerçekleştirilmştir. Reaksiyonlara ait amplifikasyon eğrileri, erime eğrileri ve qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi aşağıda verilmektedir. Erime eğrisi analizleri ve jel görüntülerine göre amplifikasyonların başarılı geçtiği gözlemlenmiştir.

COL1A1 genine ait kalitatif analiz sonuçları Şekil 5.10.'da gösterilmektedir.



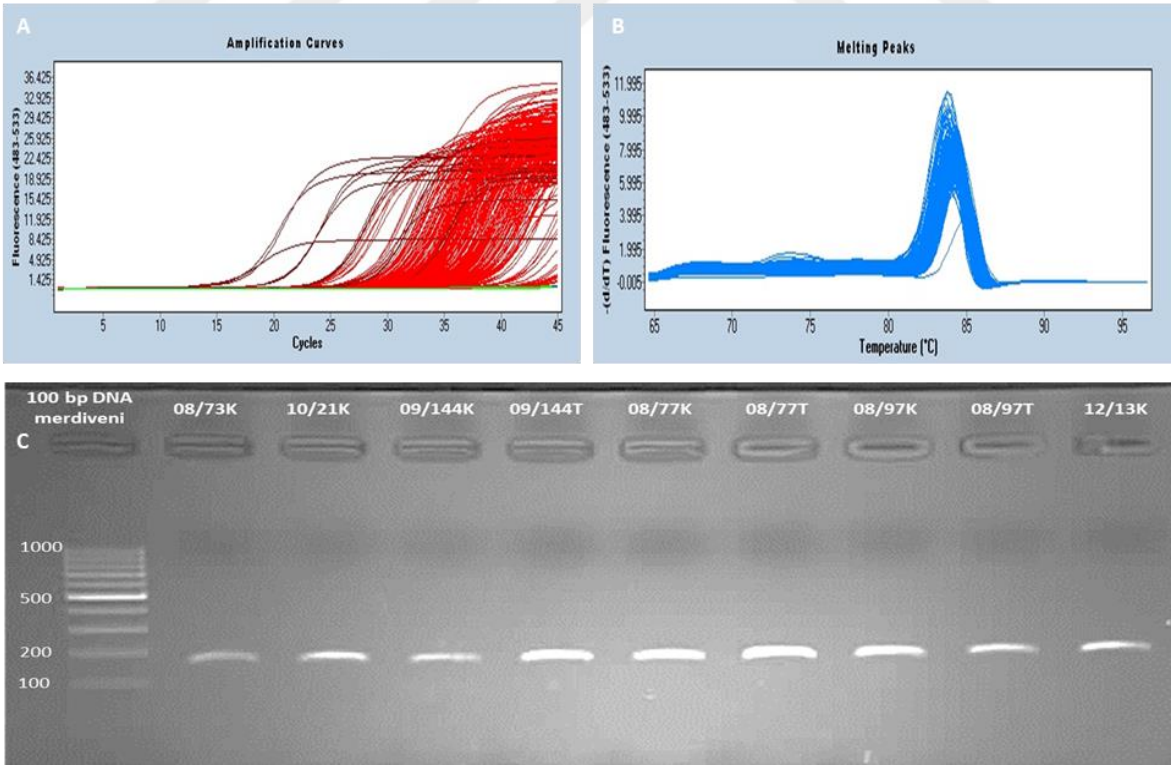
Şekil 5.10. **A-***COL1A1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *COL1A1* genine ait erime eğrileri **C**- *COL1A1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

COL5A1 genine ait kalitatif analiz sonuçları Şekil 5.11.'da gösterilmektedir.



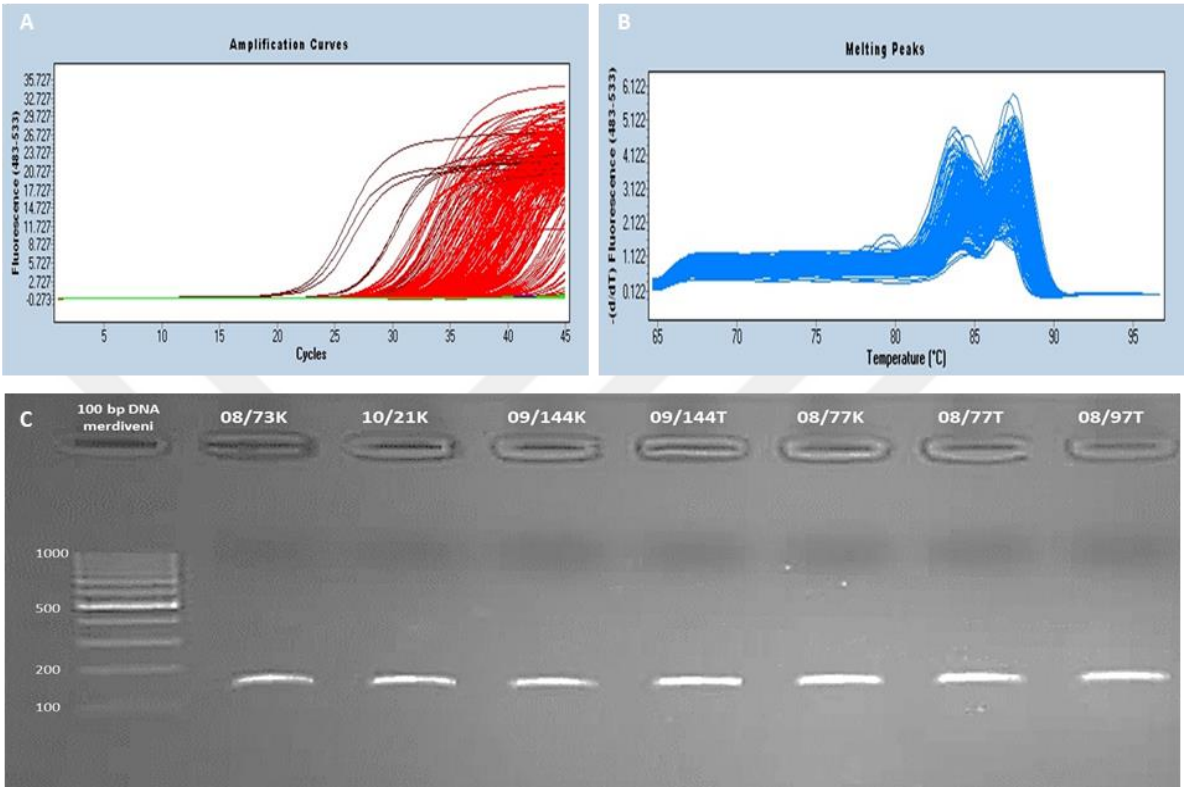
Şekil 5.11. **A**-*COL5A1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B**- *CO51A1* genine ait erime eğrileri **C**- *COL5A1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

FN1 genine ait kalitatif analiz sonuçları Şekil 5.12.'da gösterilmektedir.



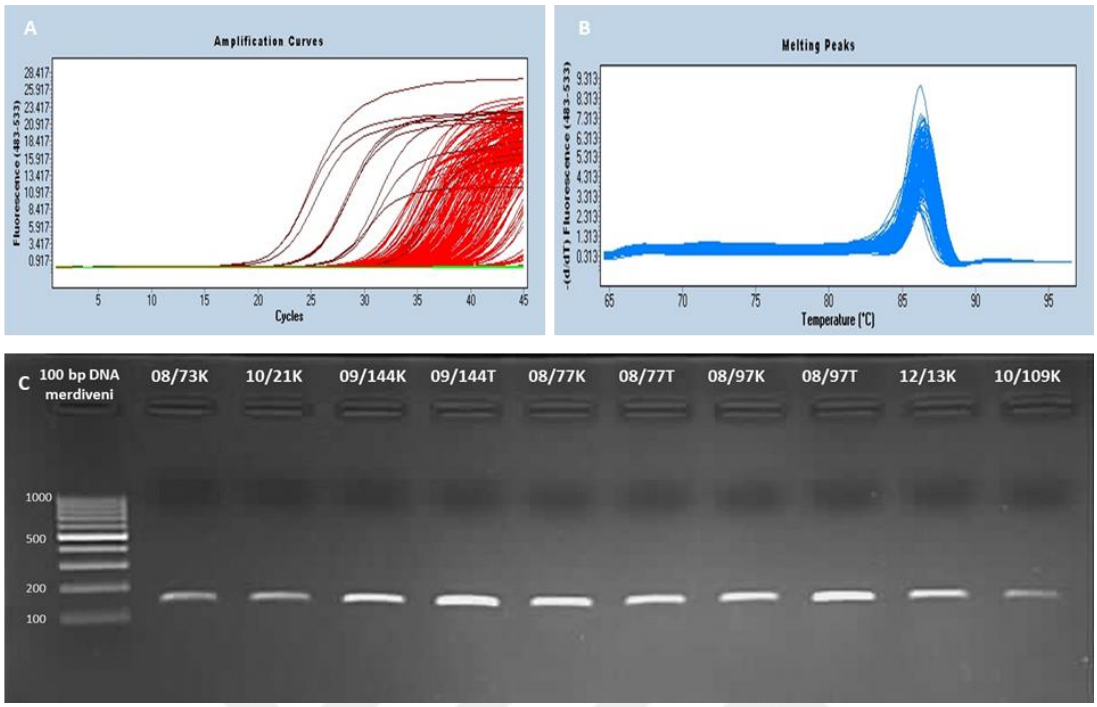
Şekil 5.12. **A**-*FN1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B**- *FN1* genine ait erime eğrileri **C**- *FN1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

CD44 ait kalitatif analiz sonuçları Şekil 5.13.'da gösterilmektedir. Erime eğrisi analizlerinde erime sıcaklığı birbirine çok yakın olan iki pik görünmektedir. Ancak qRT-PCR ürünlerinin jel elektroforezi ile reaksiyon sonucunda tek ürün oluştuğu belirlenmiştir. Bu farklılığın RNA'daki GC oranıyla ilgili olduğu düşünülmektedir.



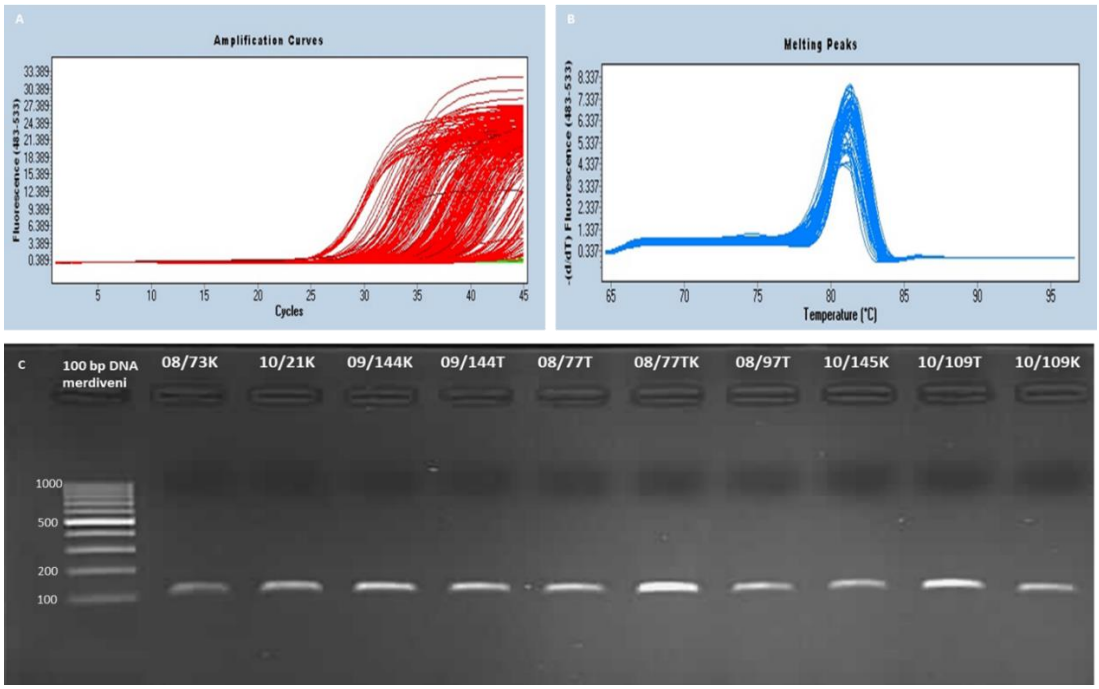
Şekil 5.13. **A**-*CD44* genine ait amplifikasyon eğrileri **B**- *CD44* genine ait erime eğrileri **C**-*CD44* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

CCND1 genine ait kalitatif analiz sonuçları Şekil 5.14.'de gösterilmektedir.



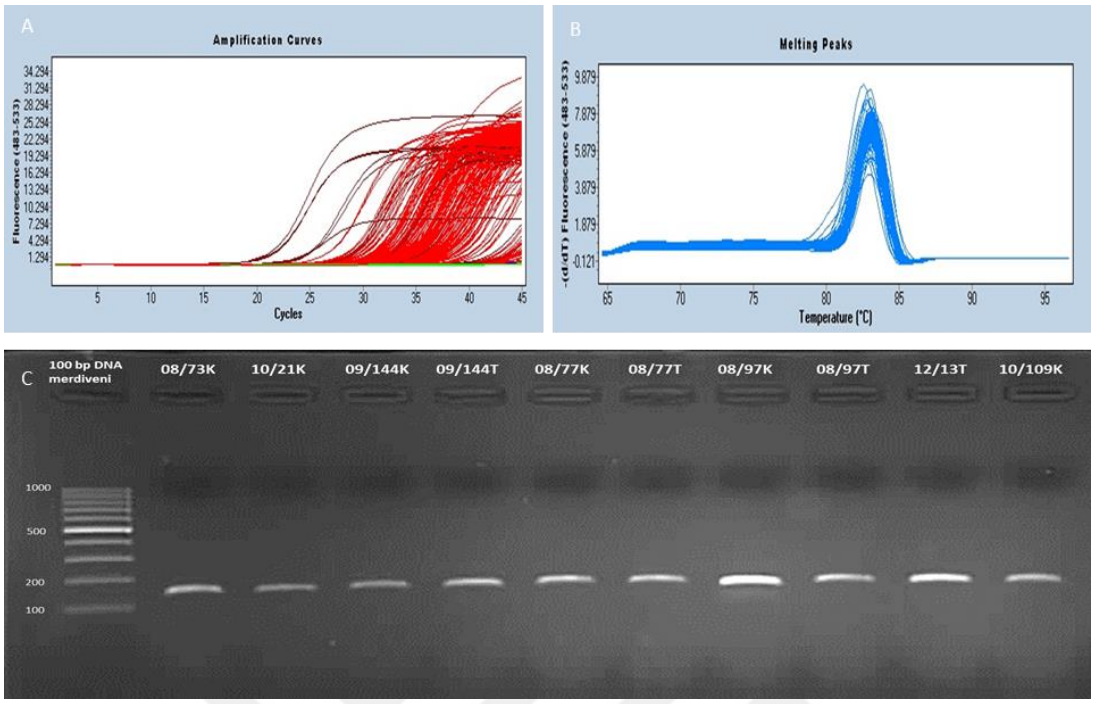
Şekil 5.14. **A-***CCND1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *CCND1* genine ait erime eğrileri **C-** *CCND1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

SPP1 genine ait kalitatif analiz sonuçları Şekil 5.15.'te verilmiştir.



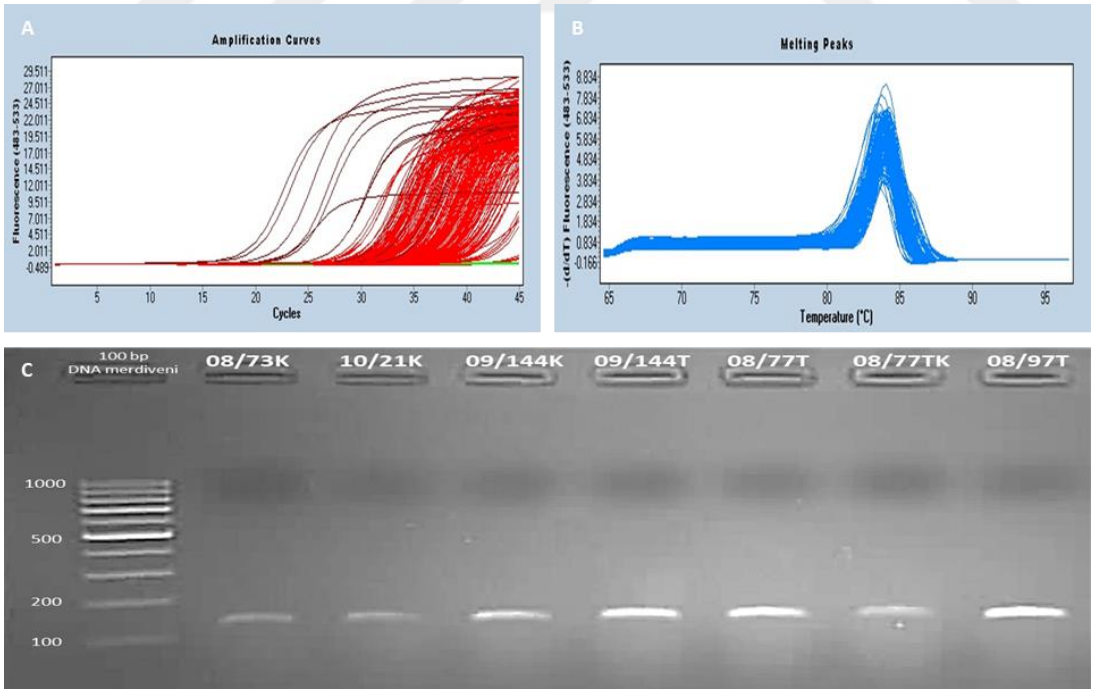
Şekil 5.15. **A-***SPP1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B-** *SPP1* genine ait erime eğrileri **C-** *SPP1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

VEGFA genine ait kalitatif analiz sonuçları Şekil 5.16.' te verilmiştir.



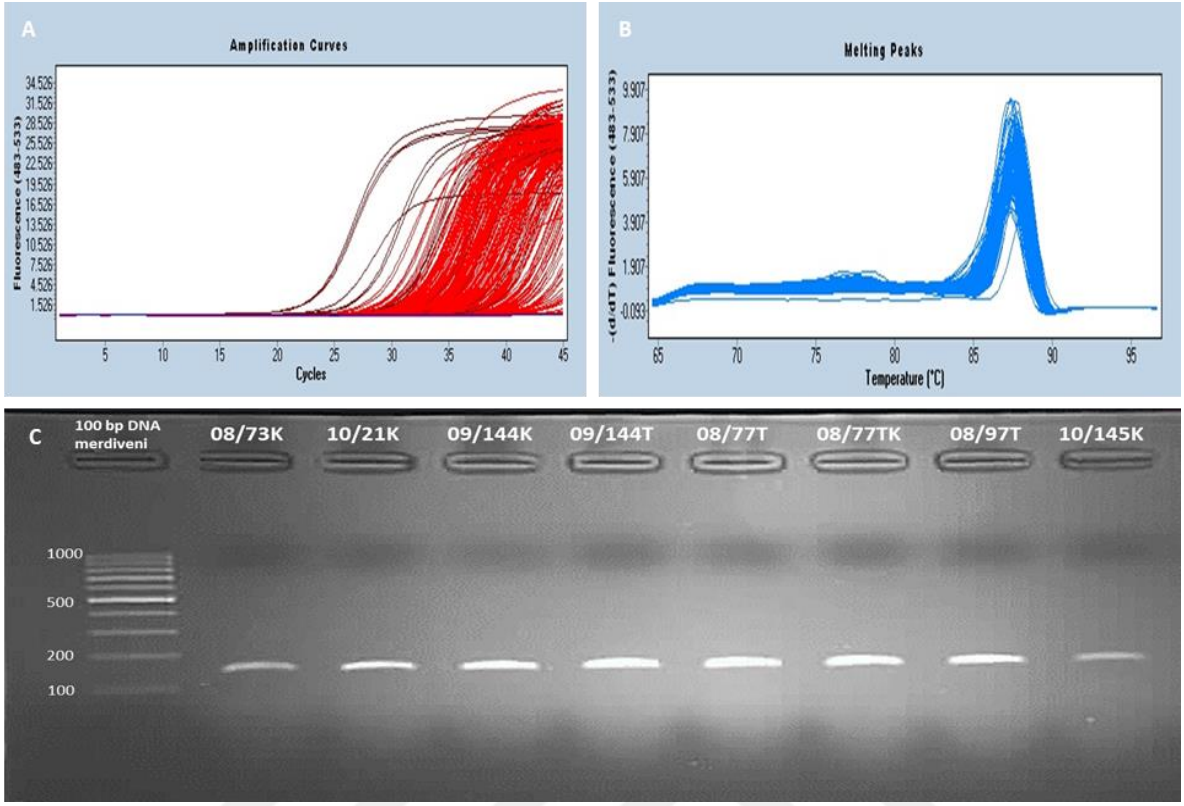
Şekil 5.16. **A**-*VEGFA* genine ait amplifikasyon eğrileri **B**- *VEGFA* genine ait erime eğrileri **C**-*VEGFA* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

BCL2L1 genine ait kalitatif analiz sonuçları Şekil 5.17.'de verilmiştir.



Şekil 5.17. **A**-*BCL2L1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B**- *BCL2L1* genine ait erime eğrileri **C**- *BCL2L1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

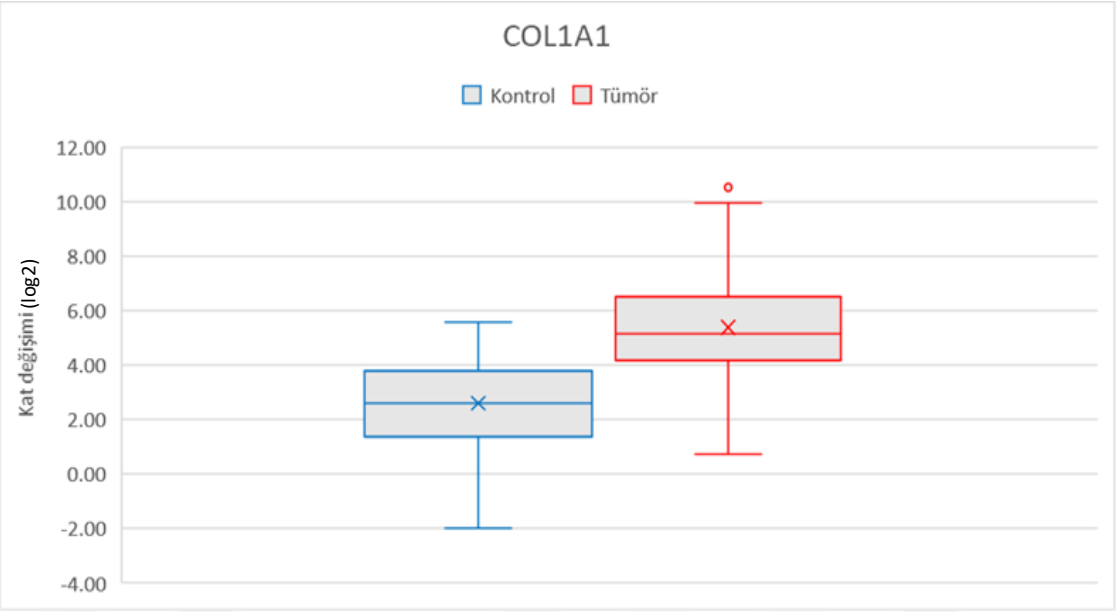
THSB1 genine ait kalitatif analiz sonuçları Şekil 5.18.' de verilmiştir.



Şekil 5.18. **A**-*THBS1* genine ait amplifikasyon eğrileri **B**- *THBS1* genine ait erime eğrileri **C**- *THBS1* qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

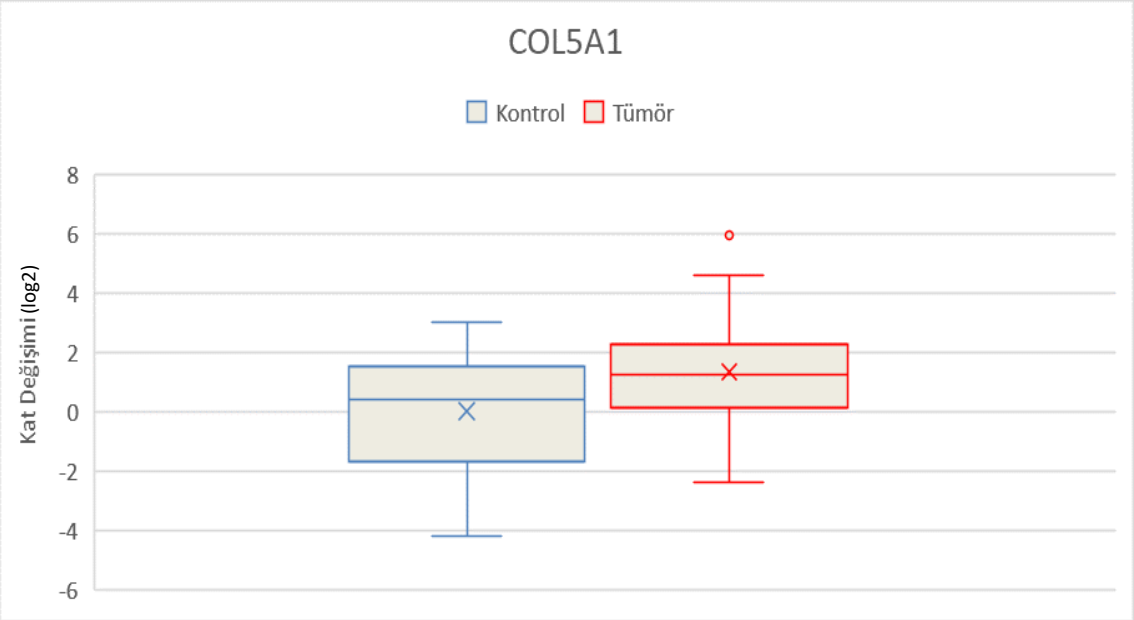
Pfaffl metoduna göre yapılan analizlerde miRNA'lar tarafından regüle edildiği düşünülen genlerin tümör ve kontrol(sağlıklı) dokularda ifade değişimleri belirlenmiştir.

COL1A1 geni miR-133a-3p'nın hedefi olan ve ECM-receptor interaction yolağında bulunan gendir. Mikrodizin verilerinde tümör grubunda kontrol grubuna göre ifadesi artmıştır (Çizelge 5.4.). qRT-PCR yöntemi ile ifade seviyesinde bu farklılık valide edilmiştir (Şekil 5.19.).



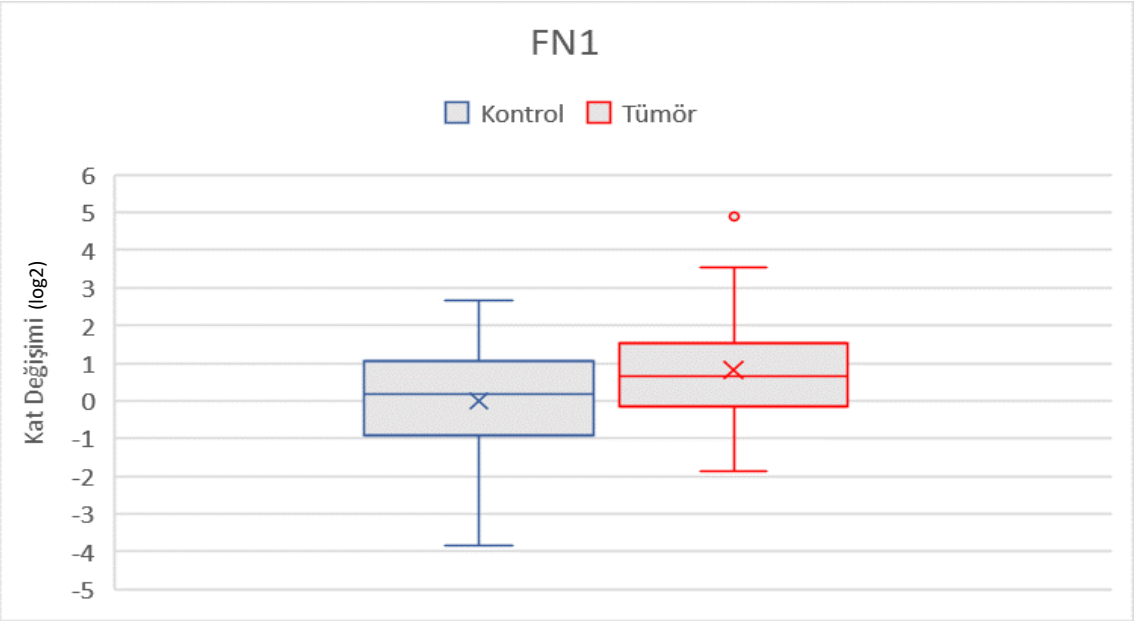
Şekil 5.19. *COL1A1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$)

COL5A1 geni miR-145-5p tarafından regüle edilen bir gendir. Mikrodizin verilerinde tümör grubunda kontrol grubuna göre ifadesi artmıştır (Çizelge 5.4.). qRT-PCR yöntemi ile ifade seviyesinde bu farklılık valide edilmiştir (Şekil 5.20.).



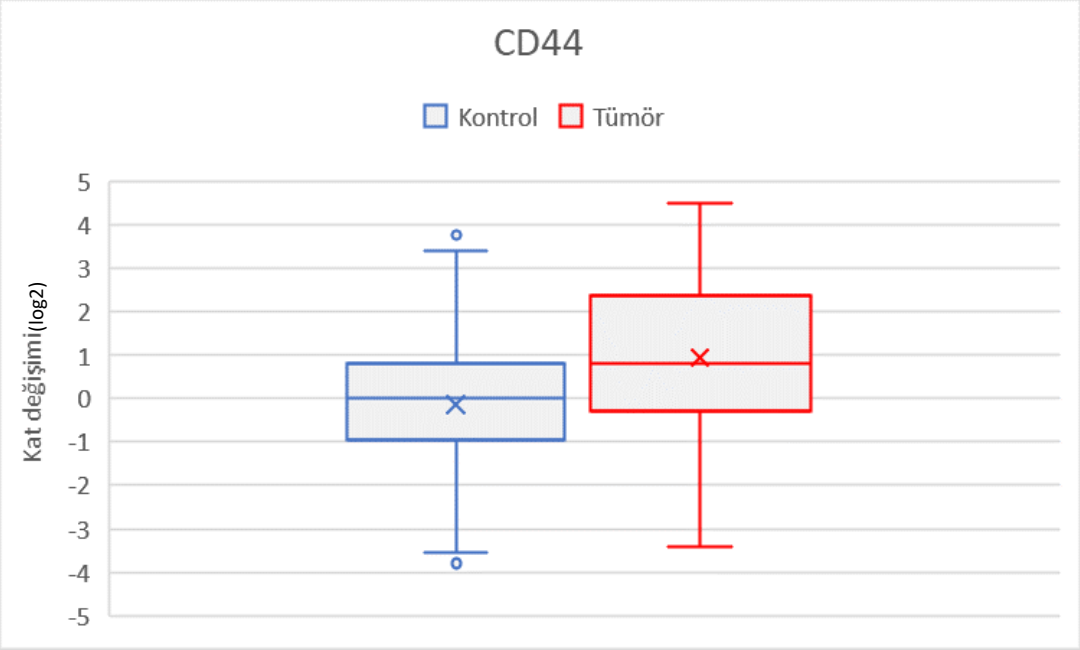
Şekil 5.20. *COL5A1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$)

FN1 geni miR-1-3p tarafından regüle edilen bir gendir. Mikrodizin verilerinde tümör grubunda kontrol grubuna göre ifadesi artmıştır (Çizelge 5.4.). qRT-PCR yöntemi ile ifade seviyesinde bu farklılık valide edilmiştir (Şekil 5.21.).



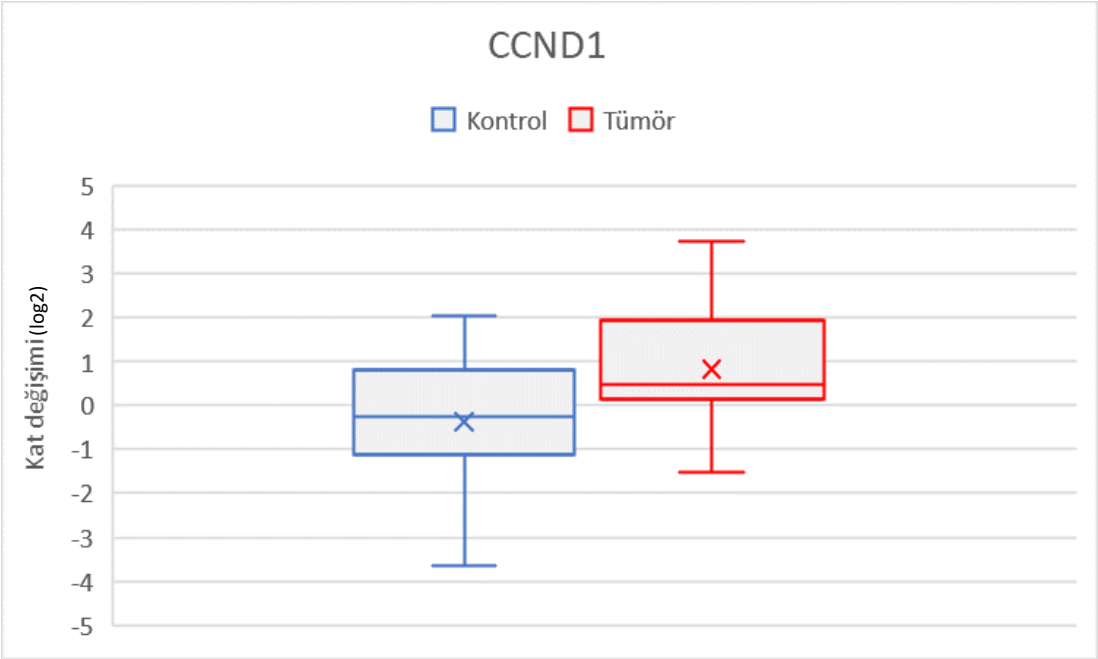
Şekil 5.21. *FN1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$)

CD44 geni miR-1-3p ve miR-145-5p miRNA'ları tarafından tarafından regüle edilen bir gendir. Mikrodizin verilerinde tümör grubunda kontrol grubuna göre ifadesi artmıştır (Çizelge 5.4.). qRT-PCR yöntemi ile ifade seviyesinde bu farklılık valide edilmiştir (Şekil 5.22.).



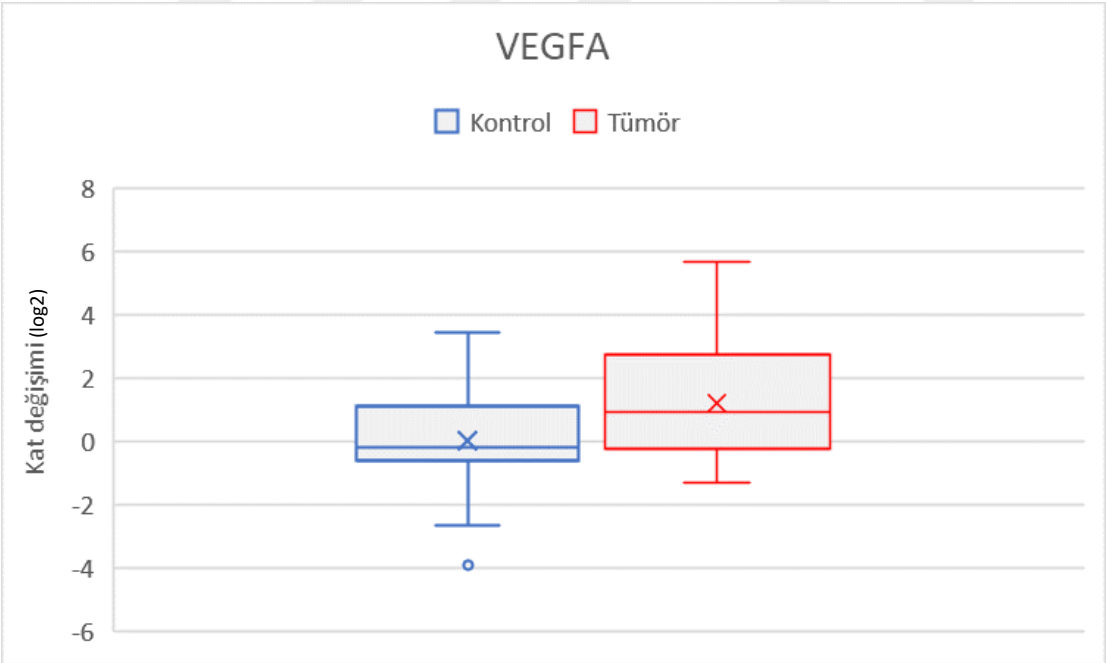
Şekil 5.22. *CD44* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$)

CCND1 geni miR-1-3p ve miR-145-5p tarafından regüle edilen bir gendir. Mikrodizin verilerinde tümör grubunda kontrol grubuna göre ifadesi artmıştır (Çizelge 5.5.). qRT-PCR yöntemi ile ifade seviyesinde bu farklılık valide edilmiştir (Şekil 5.23.).



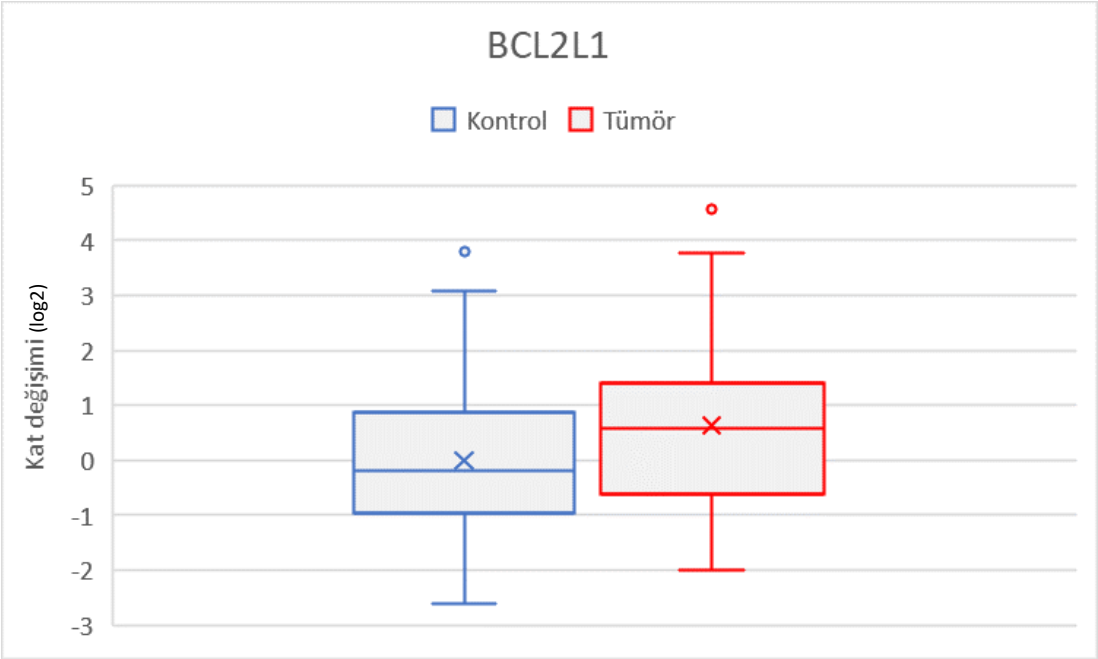
Şekil 5.23. *CCND1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$)

VEGFA geni miR-1-3p ve miR-145-5p tarafından regüle edilen bir gendir. Mikrodizin verilerinde tümör grubunda kontrol grubuna göre ifadesi artmıştır (Çizelge 5.5.). qRT-PCR yöntemi ile ifade seviyesinde bu farklılık valide edilmiştir (Şekil 5.24.).



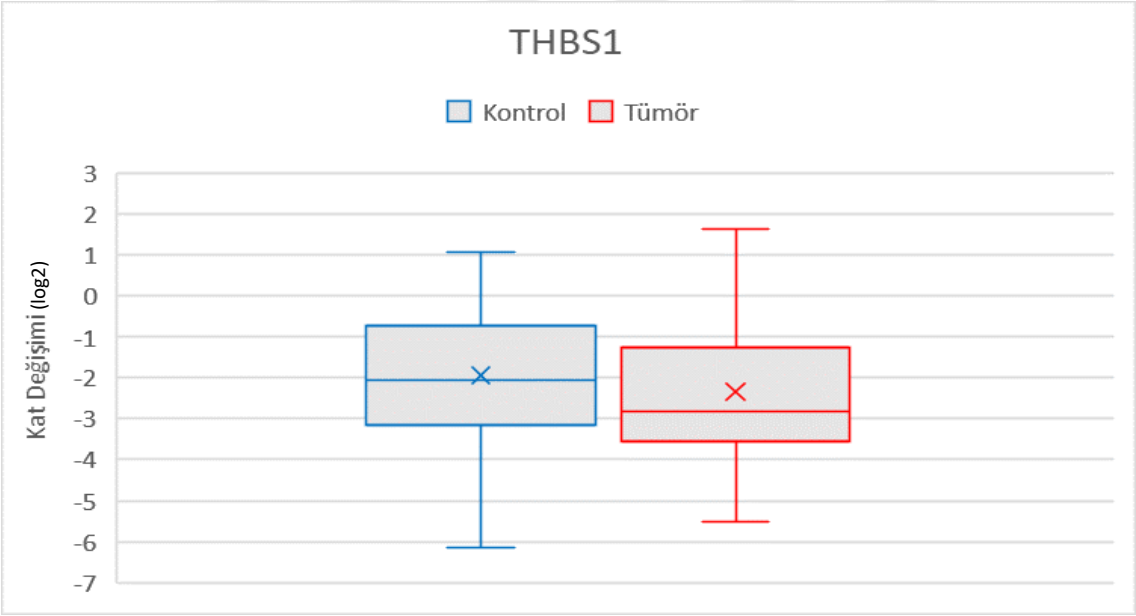
Şekil 5.24. *VEGFA* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$)

BCL2L1 geni miR-133a-3p tarafından regüle edilen bir gendir. Mikrodizin verilerinde tümör grubunda kontrol grubuna göre ifadesi artmıştır (Çizelge 5.5.). qRT-PCR yöntemi ile ifade seviyesinde bu farklılık valide edilmiştir (Şekil 5.25.).



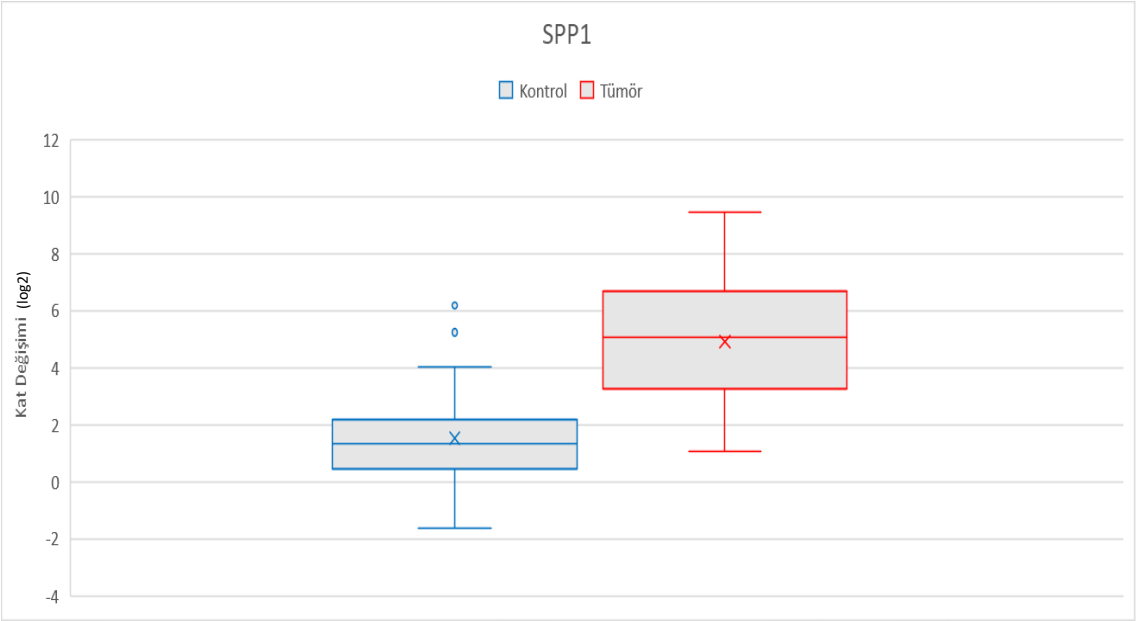
Şekil 5.25. *BCL2L1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$)

THBS1 geni miR-182-3p tarafından regüle edilen bir gendir. Mikrodizin verilerinde tümör grubunda kontrol grubuna göre ifadesi azalmıştır (Çizelge 5.5.). Ancak qRT-PCR analizleri sonucunda anlamlı seviyede farklılık bulunamamıştır (Şekil 5.26.).



Şekil 5.26. *THBS1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p>0,05$)

SPP1 miRNA analiz çalışmasından bağımsız olarak validasyon deneyleri için seçilen bir gendir. 109S477 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında, mikrodizin verilerinin analizi ile tümör ve kontrol grubu karşılaştırıldığında bu genin yüksek derecede arttığı belirlenmiştir. Yapılan qRT-PCR deneyi ile aynı hasta grubunda tümör ve kontrol grupları arasındaki ifade seviyesindeki bu farklılık valide edilmiştir (Şekil 5.27.).



Şekil 5.27. *SPP1* gen ifadesinin tümör ve kontrol gruplarında kat değişimi ($p<0,05$)

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

KRK dünya genelinde en sık görülen üçüncü kanserdir ve yüksek ölüm oranına sahiptir. Hastalığın erken evrede tanısı sağkalımı etkileyen en önemli faktördür. Erken tespit edildiğinde 5 yıllık sağkalım oranı %94 olmasına rağmen hastalığın ilerlemesi durumunda sağkalım oranı %14'e kadar düşmektedir. Hastalığın erken evrelerinde teşhisi ile çoğu hasta cerrahi eksizyonla tedavi edilebilmekte iken, hastalığın derecesine, moleküler alttipine bağlı olarak kemoterapi ve hedefe yönelik ilaç tedavilerine geçilebilmektedir. Buna rağmen KRK yüksek mortalite oranına sahip bir hastalık olmaya devam etmektedir. Hastalığın prognozu ve kullanılacak tedavi yöntemi tümörün boyutu, lenf düğümleri ve uzak organlara metastazı gibi etkenlere göre değişmektedir (95). Teşhis ve uygun tedavinin seçilebilmesinde KRK için tanımlanan biyobelirteçler kritik rol oynamaktadırlar. Bu nedenle, erken teşhis ve prognoz için yeni biyobelirteçlerin geliştirilmesi ve tedaviye yanıtın öngörülmesi, KRK'nin doğru yönetimi için büyük önem taşımaktadır.

Sunulan bu tez çalışmasında araştırma ekibimiz tarafından önceki projelerde belirlenmiş olan aday biyobelirteçlerin meta-analiz ve laboratuvar çalışması ile ön validasyonları gerçekleştirilmiştir.

6.1. MİRNA ENTEGRE ANALİZ ÇALIŞMASININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Araştırma ekibimiz tarafından yürütülmüş olan önceki kapsamlı projede (109S477) 50 sporadik KRK vakasının eşli tümör normal parafine gömülü dokularında öncelikle tümör ile normal kolorektal dokular arasında farklı ifade edilen genleri tespit etmek üzere transkriptom analizi yapılmıştı. Bu çalışmanın ikinci aşamasında ise aynı dokulardan izole edilen DNA örneklerinden arrayCGH analizi gerçekleştirilerek genomboyu kopya sayı değişimleri ortaya çıkarılmış ve ardından transkriptom verisi ile entegre edilerek kopya sayısı değişimleri ile korelasyon gösteren ifade düzeyine sahip genler tespit edilmişti. Yapılan bu tez çalışması kapsamında ise kopya sayısı değişikliği ile açıklanamayan gen ifade seviyelerini etkileyen miRNA-mRNA çiftlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu entegrasyon miRNA meta analiz çalışması verileri ve 109S477 numararalı proje kapsamında elde edilen transkriptom verilerinin biraraya getirilmesi suretiyle yapılmıştır. Kolorektal kanserde etkili olan miRNA'ların tespiti için literatürde bulunan, KRK tümör dokusu ve sağlıklı kontrol materyalleri ile yapılan miRNA mikrodizin çalışmaları belirlenmiştir. Bu hasta grubuna uyan Affymetrix platformuna ait E-MTAB-752, E-GEOD-

35834 ve GSE68377 veri setleri, Agilent platformuna ait ise GSE35982 ve E-MTAB-813 ve mikrodizin verileri meta analiz çalışması için seçilmiştir. Mikrodizin verileri BRB Array Tools programı kullanılarak analiz edilmiştir. Veriler iki ayrı platforma ait olduğu için, Affymetrix ve Agilent verileri ayrı ayrı bir araya getirilerek analiz yapılmıştır. Analiz yapılırken $p<0,05$ ve 1,5 kat ifade değişim oranı filtreleri kullanılmıştır. Affymetrix verilerinin analizi sonucunda bulgular kısmında belirtildiği üzere ***63 ifadesi artan miRNA ve 47 ifadesi azalan miRNA*** tespit edilmiştir ($p<0,05$). Agilent verilerinin analizi sonucunda ise ***75 ifadesi artan ve 15 ifadesi azalan miRNA*** tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu analiz sonuçları kesiştirilerek iki platformda da ortak olarak bulunan ve ***KRK'da ifadesi anlamlı derecede değişen 42 miRNA belirlenmiştir***. Bu 42 miRNA'nın hedeflediği ve gen ifade seviyelerini regüle edilen mRNA'ların tespiti miRwalk 2.0 veritabanı kullanılarak yapılmıştır. Tespit edilen miRNA'lar ile 109S477 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında daha önce elde edilmiş transkriptom verilerinin entegrasyonu ile ters korele ifade seviyesi gösteren miRNA-mRNA çiftleri belirlenmiştir (EK-1).

Daha önce yürütmüş olduğumuz KRK transkriptom verisinin analizi ile elde edilen farklı ifade edilen gen listesi yolak analizine tabi tutulduğunda ECM-reseptor etkileşim yolağı ön plana çıkmıştır ve validasyon için miRNA tarafından regüle edilen genlerin seçiminde öncelikle bu yolakta bulunan ve istatistiksel olarak anlamlı seviyede farklı ifade edilen genler incelenmiştir. Bu kapsamda *COL1A1, COL5A1, FN1, CD44* ve *THBS1* genleri validasyon deneyleri için seçilmiştir. Bu genleri hedefleyen miRNA'lar miR-145-5p, hsa-miR-30a, hsa-miR-1-3p, hsa-mir-133a-3p, hsa-mir-145-5p, hsa-mir-17, hsa-mir-19a, hsa-mir-182-3p'dır (Çizelge 5.4.). hsa-mir-145-5p ve hsa-mir-182-5p laboratuvarımızda daha önce qRT-PCR yöntemi ile valide edilen miRNA'lardır. Bu iki miRNA'ya ek olarak tez kapsamında valide edilmek üzere hsa-mir-1-3p ve hsa-mir-133a-3p miRNA'ları seçilmiştir (Çizelge 6.1.). Bu miRNA'ların ifadelerinin tümör gruplarında kontrol gruplarına göre azaldığı tespit edilmiştir.

hsa-mir-145-5p , hsa-mir-1-3p, hsa-mir-133a-3p miRNA'ları tarafından regüle edilen *VEGFA, CCND1, BCL2L1* genleri Pathway in cancer yolağında bulunan ve qRT-PCR ile validasyon için seçilen genleridir. Validasyon için seçilen bir diğer gen *SPP1*'dir. *SPP1* yapılan miRNA meta-analiz çalışmasından bağımsız olarak valide edilmek üzere seçilmiştir. 109S477 numaralı proje kapsamında transkriptom verilerine göre ifadesi tümör grubunda 9,76 kat artmaktadır ($p<0,05$). Bu anlamlı seviyede artışın validasyonu ile *SPP1* geninin KRK'da aday biyobelirteç olma potansiyeli bulunmaktadır.

Çizelge 6.1. Meta analiz çalışmasının sonucunda seçilen miRNA-mRNA çiftleri

Seçilen miRNA'lar	Affymetrix-kat değişimi	Agilent-kat değişimi	Validasyona alınan genler
hsa-mir-1-3p	-1.554	-2.559	*CD44*
			CCND1
			FN1
hsa-mir-145-5p*	-2.868	-2.084	*CD44*
			CCND1
			COL5A1
			VEGFA
hsa-mir-133a-3p	-2.799	-1.794	*VEGFA*
			COL1A1
			BCL2L1
hsa-mir-182-5p*		4,812	*THBS1*

*Ekibimizin önceki çalışmalarıyla valide edilen miRNA'lar

6.2. QRT-PCR ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Validasyon deneyleri sonucunda miRNA-mRNA çiftlerine ait kat değişimleri Çizelge 6.2.'de verilmiştir.

Çizelge 6.2. qRT-PCR sonucunda kat değişimleri

Seçilen miRNA'lar	Validasyon sonucu kat değişimi	Validasyona alınan genler gen	Genlerin Mikrodizin Analiz (109S477)-Kat değişimi	Genlerin validasyon sonucu kat değişimi
hsa-miR-1-3p	-3.74	CD44	2.05	2.08
		CCND1	2.35	2.45
		FN1	2.70	2.00
hsa-miR-145-5p*	1.25	CD44	2.05	2.08
		CCND1	2.35	2.45
		COL5A1	3.74	2.72
		VEGFA	2.97	3.20
hsa-miR-133a-3p	-3.05	VEGFA	2.97	3.20
		COL1A1	7.47	12.00
		BCL2L1	2.26	1.73
hsa-miR-182-5p*	13.80	THBS1	-2.92	-0.80

6.2.1. MİR-1-3P VE HEDEF GENLERİ

miR-1-3p insanda kanser dahil pek çok hastalıkla ilişkilendirilerek tanımlanan ilk miRNA'dır. Kas proliferasyonu ve farklılaşması gibi iskelet ve kalp dokusunda önemli etkileri bulunan miR-1-3p'nin kanser sürecinde de önemli rolleri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda KRK'da miR-1-3p'nin tümör baskılayıcı işlevi olduğu gösterilmiş ve bu miRNA'nın düşük seviyede ifadesinin karaciğer metastazı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir

(96, 97). Tez kapsamında miRNA mikrodizin verilerinin analizine göre hsa-miR-1-3p ifadesinin Affymetrix platformunda yürütülmüş çalışmalarda 1,55 kat ve Agilent platformunda yürütülmüş çalışmalarda ise 2.56 kat azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 6.1.). 20 tümör ve 20 kontrol örneği kullanılarak yapılan qRT-PCR deneyleri sonucunda tez kapsamındaki örneklemde hsa-miR-1-3p ifadesi tümör grubunda kontrol grubuna göre 3,74 kat azalmıştır (p=0,053). Böylelikle hsa-miR-1-3p'nin KRK vakalarında ifadesinin azaldığı valide edilmiştir. Literatür ile benzer şekilde elde edilen sonuçlara göre miR-1-3p'nin KRK'de tümör oluşumunda etkili olabileceği öngörülmektedir. Ayrıca 111 vaka ve hücre hattı materyalleri kullanılarak yapılan bir çalışmada miR-1'in düşük ifade seviyesi KRK'da tümör boyutunun büyüklüğü ve lenf nödüllerine metastaz ile ilişkilendirilmiştir (97). Bundan dolayı tez kapsamında düşük ifade seviyesi valide edilen miR-1-3p metastaz süreçlerinde de rol oynayabileceği öngörülmektedir.

hsa-miR-1-3p'nin potansiyel hedeflerinden biri olan *CD44* geninin tümör ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, gen ifade seviyesinin tümör grubunda 2,08 kat arttığı belirlenmiştir (Çizelge 6.2.). Böylelikle **CD44'ün transkriptom verisinde belirlenen ifade artışı ve miR-1-3p ile ters korele ilişkisi tez kapsamında valide edilmiştir**. *CD44*, epitelyal, mezenkimal ve hematopoietik hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde ifade edilen, tip I transmembran glikoprotein ailesidir. *CD44* tümör gelişimi ve metastazında rol oynayan ve KRK'da çok çalışılan bir gendir. *CD44* kolorektal kanserde yüksek oranda ifade edilmektedir. Adenomdan karsinoma geçiş sürecinde bu artış APC/β-catenin tümör baskılayıcı fonksiyonun kaybı ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda *CDD44*'ün fazla ekspresyonu kötü prognoz, lenf nodüllerinin metastazı ve uzak organlara metastazla ilişkisi ortaya konmuştur (98). Yapılan tez çalışması ile Türk popülasyonunda da *CD44* genindeki tümör dokusundaki artış doğrulanmıştır (p=0,016). ***KRK'de karsinogenez sürecinin ilk aşamasında APC mutasyonu ile normal epitel dokunun adenoma geçişi gözönüne alındığında CD44 ve hsa-miR-1-3p ilişkisi bu miRNA'nın biyobelirteç potansiyelinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir.***

CCND1 (cyclin D1) hücre döngüsü ile ilişkili *CCND1* geni tarafından kodlanan bir nükleoproteindir. *CCND1* hücre döngüsünde G1'den S fazına geçişi indükler ve hücre proliferasyonunu teşvik etmektedir. Bundan dolayı onkogenezde önemli bir rolü bulunmaktadır. *CCND1*, kanser hücresinde genellikle gen amplifikasyonu ya da kromozomun translokasyonu ile bozulmaktadır. Bu da kanser gelişimine sebep olabilmektedir (99). hsa-miR-1-3p tarafından regüle edildiği düşünülen bu genin ifadesinin

yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda tümör grubunda kontrol grubuna kıyasla 2,45 kat arttığı belirlenmiştir (p= 0,00092) (Çizelge 6.2.). ***Böylelikle mikrodizin transkriptom verisindeki ifade artışı ve hsa-miR-1-3p ile ters korele ilişkisi valide edilmiştir***. Bu miRNA'ların düşük ifade düzeyi *CCND1* geninin fazla eksprese edilmesine sebep olabilir. Bu da KRK'da etkili bir miRNA-mRNA ilişkisini göstermektedir. *CCND1* geninin hücre döngüsündeki rolü, kanser hücresi karakteristik özelliklerinden olan kontrolsüz bölünme sürecinde önemli olduğundan hsa-miR-1-3p ifadesindeki değişimlerin KRK'de tümör gelişim sürecinin takibinde biyobelirteç olarak kullanım potansiyelini desteklemektedir.

FN1 (fibronektin 1), hücre yapışması, farklılaşması ve göçünde görev alan, birçok hücre tipi tarafından ifade edilen FN ailesinin üyesidir. *FN1*'in integrin transmembran reseptörleri aracılığıyla fizyolojik ve patolojik süreçlerde meydana gelen ECM (hücre dışı matris) değişikliklerine katıldığı gösterilmiştir. *FN1* proteinlerinin ekspresyonunun yumurtalık kanseri, böbrek kanseri ve tiroid kanserinde tümör gelişimi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (100). Ancak KRK gelişimi ve ilerlemesindeki etkileri hala belirsizdir. Tez kapsamında meta analiz çalışması ile *FN1* geninin hsa-miR-1-3p tarafından regüle edildiği belirlenmiştir. Transkriptom verisinde tümör ve kontrol gruplarının kıyaslanması sonucunda ifade seviyesinde artış bulunan *FN1* geninin qRT-PCR deneyi ile gen ifade seviyesindeki bu artış valide edilmiştir. qRT-PCR analizleri sonucunda *FN1* ifadesinin tümör dokusunda kontrol grubuna göre 2 kat arttığı belirlenmiştir (p=0,027) (Çizelge 6.2.). hsa-miR-1-3p ve *FN1* arasındaki negatif korelasyonun doğrulanması hücre farklılaşması gibi biyolojik süreçleri anlamamıza katkı sağlamaktadır. Özellikle metastaz gibi süreçlerde tümör hücresinin tutunması ve uygun mikroçevrede gelişimi için *FN1* ifadesindeki artışın önemli bir belirteç olabileceği öngörülmektedir. hsa-miR-1-3p ve *FN1* etkileşimi daha önce hiçbir KRK çalışmasında incelenmemiştir. Bu etkileşim KRK karsinogenez sürecinde etkili olabilecek ve biyobelirteç olma potansiyeline sahip bir etkileşimdir.

6.2.2. MİR-145-5P VE HEDEF GENLERİ

Ekibimiz tarafından yapılan önceki çalışmalarda hsa-miR-145-5p'nin ifadesinin tümör dokularında azaldığı qRT-PCR yöntemi ile belirtilmiştir. miR-145 kanserde tümör baskılayıcı olarak rol oynamaktadır. Meta analiz çalışması ile hsa-miR-145-5p'nin hedefleri olarak *CD44, CCND1, COL1A1* ve *VEGFA* genleri belirlenmiştir. *CD44* ve *CCND1* genlerinin validasyon deneyleri sonuçları miR-1-3p ve Hedef Genleri bölümünde detaylı açıklandığı üzere uyumludur. hsa-miR-145-5p tarafından regüle edilen bir diğer gen *VEGFA*

(Vascular endothelial growth factor A)'dır. *VEGFA* tümör büyümesi, metastaz ve anjiyogenez ile ilişkilendirilmiştir (101). KRK'de *VEGFA* yeni damar oluşumu, tümör anjiyogenezi, invazyonu ve yayılmasında önemli bir etkiye sahiptir ve KRK'da *VEGFA* seviyesinin arttığı bilinmektedir. *VEGFA* malignitenin yayılma kabiliyetinin artması ve kötü prognozla ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda miR-203, miR-497, miR-199a gibi *VEGFA*'yı hedefleyen miRNA'ların anti-tümör etkisi çalışılmıştır (102). ***Tez kapsamında VEGFA ifadesinin tümör ve kontrol grupları kıyaslandığında 3,2 kat arttığı belirlenmiştir (p=0,019) (*** Çizelge 6.2***.) ve miR-145-5p ile negatif regülasyonu valide edilmiştir.*** Özellikle tümör gelişimi sürecinde tümörü besleyecek damarların düzgün bir şekilde oluşumu, hızlı bölünme yeteneğine sahip tümör hücrelerinin gerekli oksijen ve besin ihtiyacını karşılaması için çok önemlidir. Bu nedenle miR-145-5p'nin *VEGFA*'yı hedefleyerek kolorektal kanser gelişiminde önemli bir etkiye sahip olabileceği ve ifadesindeki değişimlerin belirteç olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

COL5A1 (kollojen tip V alpha 1 zinciri) bir kollojen protein ailesi üyesidir ve ECM oluşumunda rol oynayan ECM'in ana bileşenidir. ECM'in hücre şekli, proliferasyon, göç, farklılaşma, apoptoz ve karsinojenez gibi çok sayıda biyolojik süreçte aktif bir rol oynadığı bilinmektedir. *COL5A1*, baş ve boyun skuamöz hücre karsinomu, mide kanseri, meme kanseri ve seröz yumurtalık kanseri ile ilişkilidir (103). ***Ancak literatürde kolorektal kanserde COL5A1 geni ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.*** Meta analiz çalışması ile *COL5A1* hsa-miR-145-5p'nin hedeflediği gen olarak belirlenmiştir. Transkriptom verisinde ifadesi artan *COL5A1* geninin validasyon deneyleri ile tümör grubunda 2,72 kat arttığı doğrulanmıştır (p=0,013) (Çizelge 6.2.). Metastaz ve farklılaşma gibi süreçlerde tümör hücresinin tutunması ve uygun mikroçevrede gelişimi için gerekli ECM oluşumu ve düzenlenmesi önemlidir. ***Bu kapsamda ECM oluşumundan sorumlu COL5A1 geninin ifadesindeki artışın önemli bir belirteç olabileceği öngörülmektedir.***

6.2.3. MİR-133A-3P VE HEDEF GENLERİ

Tez kapsamında incelenen bir diğer miRNA hsa-miR-133a-3p'dir. miR-133a mide, akciğer, meme ve prostat kanserinde tümör baskılayıcı olarak görev aldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (104). Literatürde hsa-miR-133a-3p'nin KRK'da ifadesinin azaldığı gösterilmiş ve bu azalan ifade kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (105, 106). Ancak tez kapsamında yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda çalışma grubunda hsa-miR-133a-3p'nin tümör grubunda daha düşük düzeyde ifade edilmesi anlamlı bulunamamıştır (p=0,247). hsa-

miR-133a-3p'nin anlamlı derecede ifade değişimi doğrulanmamış olsada bu miRNA tarafından regüle edildiği düşünülen *COL1A1* geninin ifadesinde, qRT-PCR analizi ile tümör grubunda 12 kat artış olduğu belirlenmiştir (p=0,003) (Çizelge 6.2.). Transkriptom mikrodizin verisinde bulunan artış, qRT-PCR ile valide edilmiştir. *COL1A1* (kolajen tip 1 α 1), bağ doku ve embriyonik dokuda bulunan, hücre dışı matrisin önemli bir yapısal bileşeni olan kollajen ailesinin önemli bir üyesidir. Kollajen I insan vücudunda en yaygın olan kollajendir ve kollajen I sentezinin kolon malignitesinde arttığı bildirilmiştir (95). *COL1A1*'in çeşitli tümör tipleri ile ilişkili olduğu ve *COL1A1* ekspresyonunun tümör dokularında ve hücrelerinde yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır (107) Hasta grubumuzda belirlenen ifade düzeyi artışı literatürü desteklemektedir. Çoğu evre II ve III vakası olan hasta grubumuzda *COL1A1* ekspresyonundaki bu artış, *COL1A1*'in KRK prognozunda kullanılabilecek önemli bir biyobelirteç olduğuna işaret etmektedir. hsa-miR-133a-3p'nin hedeflediği bir diğer gen *BCL2L1* (BCL2-like 1) genidir. *BCL2L1*, Bcl-2 proteinleri ailesine aittir ve mitokondriden pro-apoptotik faktörlerin salınımını kontrol ederek mitokondriyal apoptoz yolunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda *BCL2L1* gen ifadesinin tümör grubunda 1,73 kat arttığı belirlenmiştir (p=0,0089) (Çizelge 6.2.). Transkriptom mikrodizin verilerini doğrulayan bu sonuç, *BCL2L1* geninin KRK'de apoptoz sürecinde etkili olabileceğini göstermektedir.

6.2.4. MİR-182-5P VE HEDEF GENİ

Hsa-miR-182-5p ifade değişimi/artışı ekibimiz tarafından valide edilmiştir. Meta analiz çalışması ile tez kapsamında *THSB1* geninin hsa-miR-182-5p tarafından hedeflendiği belirlenmiştir. *THBS1* geni tarafından kodlanan trombospondin-1 (TSP-1), anjiyogenez sürecini negatif yinde etkileyen bir gendir ve tümörün ilerlemesi ve metastazında önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda *THBS1*'in hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Tez kapsamında transkriptom profilinde *THBS1* geninin ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Ancak validasyon deneylerinde bu ifade değişimi anlamlı bulunamamıştır (p=0,12).

6.2.5. SPP1

SPP1 meta analiz çalışmasında herhangi bir miRNA ile etkileşimi bulunamamış ancak transkriptom verisinde ifadesi yüksek seviyede artan (9,715 kat) bir gendir. Tez kapsamında qRT-PCR ile yüksek seviyedeki artış doğrulanmıştır. Salgılanan fosfoprotein 1 (*SPP1*) aynı

zamanda Osteopontin (OPN) olarak da adlandırılmaktadır ve çeşitli kanser hücrelerinde farklı şekilde ifade edildiği bildirilen matriküler bir proteindir ve *SPP1* geni tarafından kodlanır. Kanser hücreleri ve kan, idrar gibi vücut sıvılarında yüksek *SPP1* seyiyeleri tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda KRK'de yüksek seviyedeki ifadesini kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (108). Hasta grubumuzda *SPP1*'in fazla ifadelenmesi literatürü desteklemektedir ve qRT-PCR yönlemi ile bu artış valide edilmiştir (p=0.00026) (Çizelge 6.2.). Bu da *SPP1*'in KRK için önemli bir prognostik biyobelirteç olabileceğine işaret etmektedir.

6.3. SONUÇ

Tez kapsamında valide edilen *COL1A1, COL5A1, FN1, CD44, BCL2L1, VEGFA* ve *SPP1* genleri ve hsa-miR-1-3p'nin KRK'da tümör ve kontrol grupları arasındaki ifade farklılığının tümör oluşumu, apoptoz, anjiyogenez gibi süreçlerde etkili olabileceği öngörülmüştür ve bu genler KRK'da potansiyel biyobelirteç olarak tanımlanmıştır. Literatürde *COL5A1* geni KRK'da biyobelirteç olarak önerilmemiştir ancak *COL1A1, FN1, CD44, BCL2L1, VEGFA ve SPP1* genlerinin KRK'da biyobelirteç olarak önerildiği çalışmalar bulunmaktadır.

Valide edilen genlerin biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için yapılabilecekler: Biyobelirteçlerin klinikte kullanılması için faz çalışması aşamalarını geçmesi gerekmektedir. Bu nedenle ilgili biyobelirteçlerin bağımsız hasta grubunda ve daha geniş örneklemde test edilmesi gerekmektedir. Ek olarak bu genlere ait ifade profilindeki değişimin protein seviyesine yansıyıp yansımadığı test edilebilir. Böylelikle invaziv olmayan yöntemlerle de kolay ve hızlı tespit edilebilir biyobelirteçlerin tanımlanması mümkün hale gelebilir.

miRNA/mRNA çiftlerinin doğrulanması için yapılabilecekler: Tez kapsamında ifade değişim değeri valide edilen miR-1-3p ve önceki yıllarda valide edilen miR-182-5p, miR-145-5p miRNA'larının fonksiyonelliği sonraki çalışmalarda hücre hattı kullanılarak test edilebilir. siRNA kullanılarak gen susturulması ya da miRNA mimic'leri ile ifadenin arttırılması deneyleri ile miRNA/mRNA çiftleri doğrulanabilir. Ayrıca miRNA'ların hedefinde olan protein seviyesindeki değişim Western analizleri ile tespit edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. Prz Gastroenterol. 2019;14(2):89-103. Epub 2019/10/17. doi: 10.5114/pg.2018.81072. PubMed PMID: 31616522; PubMed Central PMCID: PMCPMC6791134.

2. Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Surg. 2009;22(4):191-7. Epub 2010/11/03. doi: 10.1055/s-0029-1242458. PubMed PMID: 21037809; PubMed Central PMCID: PMCPMC2796096.

3. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. The Lancet. 2019;394(10207):1467-80. doi: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0.

4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424. Epub 2018/09/13. doi: 10.3322/caac.21492. PubMed PMID: 30207593.

5. Langman G, Loughrey M, Shepherd N, Quirke P. Association of Coloproctology of Great Britain & Ireland (ACPGBI): Guidelines for the Management of Cancer of the Colon, Rectum and Anus (2017) - Pathology Standards and Datasets. Colorectal Dis. 2017;19 Suppl 1:74-81. Epub 2017/06/21. doi: 10.1111/codi.13708. PubMed PMID: 28632310.

6. Kim B-h, Kim JM, Kang GH, Chang HJ, Kang DW, Kim JH, et al. Standardized Pathology Report for Colorectal Cancer, 2nd Edition. J Pathol Transl Med. 2020;54(1):1-19. doi: 10.4132/jptm.2019.09.28.

7. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. Histopathology. 2020;76(2):182-8. doi: 10.1111/his.13975.

8. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Domati F, Tuccari G. Prognostic significance of grading based on the counting of poorly differentiated clusters in colorectal mucinous adenocarcinoma. Hum Pathol. 2015;46(11):1722-9. Epub 2015/09/08. doi: 10.1016/j.humpath.2015.07.013. PubMed PMID: 26344416.

9. Kuepper C, Großerueschkamp F, Kallenbach-Thieltges A, Mosig A, Tannapfel A, Gerwert K. Label-free classification of colon cancer grading using infrared spectral histopathology. Faraday Discuss. 2016;187:105-18. Epub 2016/04/12. doi: 10.1039/c5fd00157a. PubMed PMID: 27064063.

10. Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? Pathobiology. 2018;85(1-2):72-84. doi: 10.1159/000486721.

11. Lawler M, Johnston B, Van Schaeybroeck S, Salto-Tellez M, Wilson R, Dunlop M, et al. 74 - Colorectal Cancer. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Kastan MB, Doroshow JH, Tepper JE, editors. Abeloff's Clinical Oncology (Sixth Edition). Philadelphia: Content Repository Only!; 2020. p. 1219-80.e15.

12. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. Gastroenterology Res. 2018;11(4):264-73. Epub 2018/08/18. doi: 10.14740/gr1062w. PubMed PMID: 30116425; PubMed Central PMCID: PMCPMC6089587.

13. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019;16(12):713-32. Epub 2019/08/29. doi: 10.1038/s41575-019-0189-8. PubMed PMID: 31455888.

14. Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG. Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. Clin Colorectal Cancer. 2016;15(3):195-203. doi: 10.1016/j.clcc.2016.02.008. PubMed PMID: 26964802.

15. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2017;18(1). Epub 2017/01/21. doi: 10.3390/ijms18010197. PubMed PMID: 28106826; PubMed Central PMCID: PMCPMC5297828.

16. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. The new england journal of medicine. (1533-4406 (Electronic)).

17. Umar A, Boland Cr Fau - Terdiman JP, Terdiman Jp Fau - Syngal S, Syngal S Fau - de la Chapelle A, de la Chapelle A Fau - Ruschoff J, Ruschoff J Fau - Fishel R, et al. Revised

Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. (1460-2105 (Electronic)).

18. Mahasneh A, Al-Shaheri F, Jamal E. Molecular biomarkers for an early diagnosis, effective treatment and prognosis of colorectal cancer: Current updates. Exp Mol Pathol. 2017;102(3):475-83. Epub 2017/05/17. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.05.005. PubMed PMID: 28506769.

19. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. Nat Rev Cancer. 2009;9(7):489-99. Epub 2009/06/19. doi: 10.1038/nrc2645. PubMed PMID: 19536109.

20. Zhou Y, Xia L, Wang H, Oyang L, Su M, Liu Q, et al. Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. Oncotarget. 2018;9(70):33403-15. Epub 2018/10/04. doi: 10.18632/oncotarget.23607. PubMed PMID: 30279970; PubMed Central PMCID: PMCPMC6161799.

21. Boesch M, Spizzo G, Seeber A. Concise Review: Aggressive Colorectal Cancer: Role of Epithelial Cell Adhesion Molecule in Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. Stem Cells Transl Med. 2018;7(6):495-501. Epub 2018/04/19. doi: 10.1002/sctm.17-0289. PubMed PMID: 29667344; PubMed Central PMCID: PMCPMC5980125.

22. Findlay VJ, Wang C, Watson DK, Camp ER. Epithelial-to-mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype: insights from cancer biology with therapeutic implications for colorectal cancer. Cancer Gene Ther. 2014;21(5):181-7. Epub 2014/05/03. doi: 10.1038/cgt.2014.15. PubMed PMID: 24787239; PubMed Central PMCID: PMCPMC4041800.

23. Inamura K. Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. Cancers (Basel). 2018;10(1). Epub 2018/01/25. doi: 10.3390/cancers10010026. PubMed PMID: 29361689; PubMed Central PMCID: PMCPMC5789376.

24. Sawayama H, Miyamoto Y, Ogawa K, Yoshida N, Baba H. Investigation of colorectal cancer in accordance with consensus molecular subtype classification. Annals of Gastroenterological Surgery. 2020;n/a(n/a). doi: 10.1002/ags3.12362.

25. Komor MA, Bosch LJW, Bounova G, Bolijn AS, Delis-van Diemen PM, Rausch C, et al. Consensus molecular subtype classification of colorectal adenomas. The Journal of Pathology. 2018;246(3):266-76. doi: 10.1002/path.5129.

26. Thanki K, Nicholls ME, Gajjar A, Senagore AJ, Qiu S, Szabo C, et al. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. Int Biol Biomed J. 2017;3(3):105-11. Epub 2017/08/22. PubMed PMID: 28825047; PubMed Central PMCID: PMCPMC5557054.

27. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med. 2015;21(11):1350-6. Epub 2015/10/13. doi: 10.1038/nm.3967. PubMed PMID: 26457759; PubMed Central PMCID: PMCPMC4636487.

28. Menter DG, Davis JS, Broom BM, Overman MJ, Morris J, Kopetz S. Back to the Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtype Future. Curr Gastroenterol Rep. 2019;21(2):5. Epub 2019/02/01. doi: 10.1007/s11894-019-0674-9. PubMed PMID: 30701321; PubMed Central PMCID: PMCPMC6622456.

29. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 2012;487(7407):330-7. Epub 2012/07/20. doi: 10.1038/nature11252. PubMed PMID: 22810696; PubMed Central PMCID: PMCPMC3401966.

30. Hao HX, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. Nature. 2012;485(7397):195-200. Epub 2012/05/12. doi: 10.1038/nature11019. PubMed PMID: 22575959.

31. Pino MS, Chung DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. Gastroenterology. 2010;138(6):2059-72. doi: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065.

32. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. The New England journal of medicine. 2009;361(25):2449-60. doi: 10.1056/NEJMra0804588. PubMed PMID: 20018966.

33. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. Gastroenterology. 2015;149(5):1177-90.e3. Epub 2015/07/29. doi:

10.1053/j.gastro.2015.06.047. PubMed PMID: 26216840; PubMed Central PMCID: PMCPMC4589489.

34. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, Thibodeau SN, Dienstmann R, Guinney J, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. Gastroenterology. 2015;148(1):88-99. Epub 2014/10/12. doi: 10.1053/j.gastro.2014.09.041. PubMed PMID: 25305506; PubMed Central PMCID: PMCPMC4274188.

35. Gupta R, Sinha S, Paul RN. The impact of microsatellite stability status in colorectal cancer. Current Problems in Cancer. 2018;42(6):548-59. doi: https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2018.06.010.

36. Satorres C, García-Campos M, Bustamante-Balén M. Molecular Features of the Serrated Pathway to Colorectal Cancer: Current Knowledge and Future Directions. Gut Liver. 2020. Epub 2020/04/29. doi: 10.5009/gnl19402. PubMed PMID: 32340435.

37. Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. Curr Treat Options Oncol. 2015;16(7):30. Epub 2015/06/03. doi: 10.1007/s11864-015-0348-2. PubMed PMID: 26031544; PubMed Central PMCID: PMCPMC4594190.

38. Gavin PG, Paik S, Yothers G, Pogue-Geile KL. Colon cancer mutation: prognosis/prediction--response. Clin Cancer Res. 2013;19(5):1301. Epub 2013/02/12. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-13-0020. PubMed PMID: 23396048.

39. Jia M, Gao X, Zhang Y, Hoffmeister M, Brenner H. Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. Clin Epigenetics. 2016;8:25-. doi: 10.1186/s13148-016-0191-8. PubMed PMID: 26941852.

40. East JE, Atkin WS, Bateman AC, Clark SK, Dolwani S, Ket SN, et al. British Society of Gastroenterology position statement on serrated polyps in the colon and rectum. (1468-3288 (Electronic)).

41. Nambiar PR, Gupta RR, Misra V. An "Omics" based survey of human colon cancer. Mutat Res. 2010;693(1-2):3-18. Epub 2010/08/10. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2010.07.008. PubMed PMID: 20691711.

42. Shendure J. The beginning of the end for microarrays? Nat Methods. 2008;5(7):585-7. Epub 2008/07/01. doi: 10.1038/nmeth0708-585. PubMed PMID: 18587314.

43. Wang K, Huang C, Nice EC. Proteomics, genomics and transcriptomics: their emerging roles in the discovery and validation of colorectal cancer biomarkers. Expert Rev Proteomics. 2014;11(2):179-205. Epub 2014/03/13. doi: 10.1586/14789450.2014.894466. PubMed PMID: 24611605.

44. Zamani M, Hosseini SV, Mokarram P. Epigenetic biomarkers in colorectal cancer: premises and prospects. Biomarkers. 2018;23(2):105-14. Epub 2016/10/30. doi: 10.1080/1354750x.2016.1252961. PubMed PMID: 27788596.

45. Chakraborty S, Hosen MI, Ahmed M, Shekhar HU. Onco-Multi-OMICS Approach: A New Frontier in Cancer Research. Biomed Res Int. 2018;2018:9836256. Epub 2018/11/08. doi: 10.1155/2018/9836256. PubMed PMID: 30402498; PubMed Central PMCID: PMCPMC6192166.

46. Jemal A, Bray F Fau - Center MM, Center Mm Fau - Ferlay J, Ferlay J Fau - Ward E, Ward E Fau - Forman D, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011;61(2):69-90. (1542-4863). doi: 10.3322/caac.20107.

47. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. Nature. 2006;444(7118):444-54. doi: 10.1038/nature05329. PubMed PMID: 17122850.

48. Carvalho B, Diosdado B, Terhaar Sive Droste JS, Bolijn AS, Komor MA, de Wit M, et al. Evaluation of Cancer-Associated DNA Copy Number Events in Colorectal (Advanced) Adenomas. Cancer Prevention Research. 2018;11(7):403. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-17-0317.

49. Ried T, Meijer GA, Harrison DJ, Grech G, Franch-Expósito S, Briffa R, et al. The landscape of genomic copy number alterations in colorectal cancer and their consequences on gene expression levels and disease outcome. Molecular Aspects of Medicine. 2019;69:48-61. doi: https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.07.007.

50. Camps J, Nguyen QT, Padilla-Nash HM, Knutsen T, McNeil NE, Wangsa D, et al. Integrative genomics reveals mechanisms of copy number alterations responsible for

transcriptional deregulation in colorectal cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2009;48(11):1002-17. doi: 10.1002/gcc.20699. PubMed PMID: 19691111.

51. Salari K, Spulak ME, Cuff J, Forster AD, Giacomini CP, Huang S, et al. CDX2 is an amplified lineage-survival oncogene in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(46):E3196-E205. Epub 2012/10/29. doi: 10.1073/pnas.1206004109. PubMed PMID: 23112155.

52. Gemoll T, Habermann JK, Becker S, Szymczak S, Upender MB, Bruch HP, et al. Chromosomal aneuploidy affects the global proteome equilibrium of colorectal cancer cells. Anal Cell Pathol (Amst). 2013;36(5-6):149-61. Epub 2014/01/28. doi: 10.3233/acp-140088. PubMed PMID: 24464829; PubMed Central PMCID: PMCPMC4605604.

53. Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. Biology (Basel). 2016;5(1). Epub 2016/01/12. doi: 10.3390/biology5010003. PubMed PMID: 26751487; PubMed Central PMCID: PMCPMC4810160.

54. Pan Y, Liu G, Zhou F, Su B, Li Y. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. Clin Exp Med. 2018;18(1):1-14. Epub 2017/07/29. doi: 10.1007/s10238-017-0467-0. PubMed PMID: 28752221.

55. Walsh CJ, Hu P, Batt J, Santos CC. Microarray Meta-Analysis and Cross-Platform Normalization: Integrative Genomics for Robust Biomarker Discovery. Microarrays (Basel). 2015;4(3):389-406. Epub 2015/01/01. doi: 10.3390/microarrays4030389. PubMed PMID: 27600230; PubMed Central PMCID: PMCPMC4996376.

56. Pinu FR, Beale DJ, Paten AM, Kouremenos K, Swarup S, Schirra HJ, et al. Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. Metabolites. 2019;9(4). Epub 2019/04/21. doi: 10.3390/metabo9040076. PubMed PMID: 31003499; PubMed Central PMCID: PMCPMC6523452.

57. Hinoue T, Weisenberger DJ, Lange CP, Shen H, Byun HM, Van Den Berg D, et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. Genome Res. 2012;22(2):271-82. Epub 2011/06/11. doi: 10.1101/gr.117523.110. PubMed PMID: 21659424; PubMed Central PMCID: PMCPMC3266034.

58. Gattolliat CH, Uguen A, Pesson M, Trillet K, Simon B, Doucet L, et al. MicroRNA and targeted mRNA expression profiling analysis in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Eur J Cancer. 2015;51(3):409-20. Epub 2015/01/15. doi: 10.1016/j.ejca.2014.12.007. PubMed PMID: 25586944.

59. Yiu AJ, Yiu CY. Biomarkers in Colorectal Cancer. Anticancer Res. 2016;36(3):1093-102. Epub 2016/03/16. PubMed PMID: 26977004.

60. Aghagolzadeh P, Radpour R. New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2016;22(25):5678-93. Epub 2016/07/20. doi: 10.3748/wjg.v22.i25.5678. PubMed PMID: 27433083; PubMed Central PMCID: PMCPMC4932205.

61. Diamandis EP. Cancer Biomarkers: Can We Turn Recent Failures into Success? JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 2010;102(19):1462-7. doi: 10.1093/jnci/djq306.

62. Kamel HFM, Al-Amodi HSB. Cancer Biomarkers. Role of Biomarkers in Medicine: IntechOpen; 2016.

63. Nicholson BD, Shinkins B, Pathiraja I, Roberts NW, James TJ, Mallett S, et al. Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2015;2015(12):CD011134-CD. doi: 10.1002/14651858.CD011134.pub2. PubMed PMID: 26661580.

64. Bolocan A, Ion D, Ciocan DN, Paduraru DN. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. Chirurgia (Bucur). 2012;107(5):555-63. Epub 2012/11/03. PubMed PMID: 23116828.

65. Jelski W, Mroczko B. Biochemical Markers of Colorectal Cancer - Present and Future. Cancer Manag Res. 2020;12:4789-97. Epub 2020/07/02. doi: 10.2147/cmar.S253369. PubMed PMID: 32606968; PubMed Central PMCID: PMCPMC7319530.

66. Scarà S, Bottoni P, Scatena R. CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects. Adv Exp Med Biol. 2015;867:247-60. Epub 2015/11/05. doi: 10.1007/978-94-017-7215-0_15. PubMed PMID: 26530370.

67. Dickinson BT, Kisiel J, Ahlquist DA, Grady WM. Molecular markers for colorectal cancer screening. Gut. 2015;64(9):1485-94. Epub 2015/05/23. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308075. PubMed PMID: 25994221; PubMed Central PMCID: PMCPMC4765995.

68. Iannone A, Losurdo G, Pricci M, Girardi B, Massaro A, Principi M, et al. Stool Investigations for Colorectal Cancer Screening: From Occult Blood Test to DNA Analysis. J Gastrointest Cancer. 2016;47(2):143-51. Epub 2016/02/29. doi: 10.1007/s12029-016-9810-z. PubMed PMID: 26922358.

69. Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. J Cell Sci. 2016;129(7):1287-92. Epub 2016/03/18. doi: 10.1242/jcs.182873. PubMed PMID: 26985062; PubMed Central PMCID: PMCPMC4869631.

70. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. Cancer Res. 2012;72(10):2457-67. Epub 2012/05/17. doi: 10.1158/0008-5472.Can-11-2612. PubMed PMID: 22589270; PubMed Central PMCID: PMCPMC3354961.

71. Maffeis V, Nicolè L, Cappellesso R. RAS, Cellular Plasticity, and Tumor Budding in Colorectal Cancer. Front Oncol. 2019;9:1255. Epub 2019/12/06. doi: 10.3389/fonc.2019.01255. PubMed PMID: 31803624; PubMed Central PMCID: PMCPMC6877753.

72. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, et al. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. Oncologist. 2008;13(12):1270-5. Epub 2008/12/06. doi: 10.1634/theoncologist.2008-0181. PubMed PMID: 19056857.

73. Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S, et al. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. Cancer Biol Ther. 2006;5(8):928-32. Epub 2006/09/14. doi: 10.4161/cbt.5.8.3251. PubMed PMID: 16969076; PubMed Central PMCID: PMCPMC2714972.

74. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol. 2016;27(8):1386-422. Epub 2016/07/07. doi: 10.1093/annonc/mdw235. PubMed PMID: 27380959.

75. Porru M, Pompili L, Caruso C, Biroccio A, Leonetti C. Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities. J Exp Clin Cancer Res. 2018;37(1):57. Epub 2018/03/15. doi: 10.1186/s13046-018-0719-1. PubMed PMID: 29534749; PubMed Central PMCID: PMCPMC5850913 AUTHORS'CONTRIBUTION: MP and LP carried out the experiments presented in Figs 2, 3 and in Table 1. LP prepared the Fig. 1. AB and CL designed experiments and wrote the manuscript. CC discussed data and participated inthe writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. PUBLISHER'S NOTE: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

76. Muhammad S, Jiang Z, Liu Z, Kaur K, Wang X. The role of EGFR monoclonal antibodies (MoABs) cetuximab/panitumab, and BRAF inhibitors in BRAF mutated colorectal cancer. J Gastrointest Oncol. 2013;4(1):72-81. Epub 2013/03/02. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.044. PubMed PMID: 23451330; PubMed Central PMCID: PMCPMC3562627.

77. Molina-Cerrillo J, San Román M, Pozas J, Alonso-Gordoa T, Pozas M, Conde E, et al. BRAF Mutated Colorectal Cancer: New Treatment Approaches. Cancers. 2020;12(6):1571. PubMed PMID: doi:10.3390/cancers12061571.

78. Strickler JH, Wu C, Bekaii-Saab T. Targeting BRAF in metastatic colorectal cancer: Maximizing molecular approaches. Cancer Treatment Reviews. 2017;60:109-19. doi: https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.08.006.

79. Ducreux M, Chamseddine A, Laurent-Puig P, Smolenschi C, Hollebecque A, Dartigues P, et al. Molecular targeted therapy of BRAF-mutant colorectal cancer. Ther Adv Med Oncol. 2019;11:1758835919856494. Epub 2019/06/28. doi: 10.1177/1758835919856494. PubMed PMID: 31244912; PubMed Central PMCID: PMCPMC6582307.

80. Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. World J Gastroenterol. 2014;20(48):18151-64. Epub 2015/01/07. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18151. PubMed PMID: 25561783; PubMed Central PMCID: PMCPMC4277953.

81. Zhang L, Shay JW. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. J Natl Cancer Inst. 2017;109(8). Epub 2017/04/20. doi: 10.1093/jnci/djw332. PubMed PMID: 28423402; PubMed Central PMCID: PMCPMC5963831.

82. Aghabozorgi AS, Bahreyni A, Soleimani A, Bahrami A, Khazaei M, Ferns GA, et al. Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. Biochimie. 2019;157:64-71. doi: https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.003.

83. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. Nat Rev Cancer. 2013;13(1):11-26. Epub 2012/12/22. doi: 10.1038/nrc3419. PubMed PMID: 23258168.

84. Cuyle PJ, Prenen H. Current and future biomarkers in the treatment of colorectal cancer. Acta Clin Belg. 2017;72(2):103-15. Epub 2016/12/06. doi: 10.1080/17843286.2016.1262996. PubMed PMID: 27917697.

85. Tejpar S, Bertagnolli M, Bosman F, Lenz HJ, Garraway L, Waldman F, et al. Prognostic and predictive biomarkers in resected colon cancer: current status and future perspectives for integrating genomics into biomarker discovery. Oncologist. 2010;15(4):390-404. Epub 2010/03/31. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0233. PubMed PMID: 20350999; PubMed Central PMCID: PMCPMC3227961 Bosman: Research funding/contracted research: Pfizer; Heinz-Joseph Lenz: Intellectual property rights/inventor/patent holder: Abraxis; Research funding/contracted research: Genentech, ImClone, Roche, BMS, Merck, Pfizer; Ownership interest: Responsegenetics; Levi Garraway: Consultant/advisory role: Novartis; Research funding/contracted research: Novartis; Frederic Waldman: None; Robert Warren: Research funding/contracted research: NCCN; Andrea Bild: None; Denise Collins-Brennan: None; Hejin Hahn: None; D. Paul Harkin: Employment/leadership position: Almac Diagnostics; Ownership interest: Almac Diagnostics; Richard Kennedy: Employment/leadership position: Almac Diagnostics; Mohammad Ilyas: None; Hans Morreau: None; Vitali Proutski: None; Charles Swanton: None; Ian Tomlinson: None; Mauro Delorenzi: None; Roberto Fiocca: Research funding/contracted research: Pfizer; Eric Van Cutsem: Research funding/contracted research: Pfizer; Arnaud Roth: Honoraria: Pfizer. The content of this article has been

reviewed by independent peer reviewers to ensure that it is balanced, objective, and free from commercial bias. No financial relationships relevant to the content of this article have been disclosed by the independent peer reviewers.

86. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. World J Gastroenterol. 2015;21(1):84-93. Epub 2015/01/13. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.84. PubMed PMID: 25574081; PubMed Central PMCID: PMCPMC4284363.

87. Kopetz S, Tabernero J, Rosenberg R, Jiang Z-Q, Moreno V, Bachleitner-Hofmann T, et al. Genomic Classifier ColoPrint Predicts Recurrence in Stage II Colorectal Cancer Patients More Accurately Than Clinical Factors. The Oncologist. 2015;20(2):127-33. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0325.

88. Tan IB, Tan P. An 18-gene signature (ColoPrint®) for colon cancer prognosis. Nature Reviews Clinical Oncology. 2011;8(3):131-3. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.229.

89. Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. J Clin Oncol. 2011;29(1):17-24. Epub 2010/11/26. doi: 10.1200/jco.2010.30.1077. PubMed PMID: 21098318.

90. Webber EM, Lin JS, Evelyn PW. Oncotype DX tumor gene expression profiling in stage II colon cancer. Application: prognostic, risk prediction. PLoS Curr. 2010;2. Epub 2010/09/30. doi: 10.1371/currents.RRN1177. PubMed PMID: 20877447; PubMed Central PMCID: PMCPMC2940137.

91. You YN, Rustin RB, Sullivan JD. Oncotype DX® colon cancer assay for prediction of recurrence risk in patients with stage II and III colon cancer: A review of the evidence. Surgical Oncology. 2015;24(2):61-6. doi: https://doi.org/10.1016/j.suronc.2015.02.001.

92. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin. 2018;68(1):7-30. Epub 2018/01/10. doi: 10.3322/caac.21442. PubMed PMID: 29313949.

93. Benson AB, 3rd, Venook AP, Cederquist L, Chan E, Chen YJ, Cooper HS, et al. Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl

Compr Canc Netw. 2017;15(3):370-98. Epub 2017/03/10. doi: 10.6004/jnccn.2017.0036. PubMed PMID: 28275037.

94. N. B. Sporadik Kolorektal Kanser Vakalarinda Genom Ebadinda Kopya Sayisi Değişimlerinin ve Transkriptom Profilinin Belirlenmesi Ile Kanserin Gelişmesİnde Ve İlerlemesinde Etken Yeni Genlerin Tanimlanması: Ankara University; 2013.

95. Zou X, Feng B, Dong T, Yan G, Tan B, Shen H, et al. Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis. Journal of Proteomics. 2013;94:473-85. doi: https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.020.

96. Wang JY, Huang JC, Chen G, Wei DM. Expression level and potential target pathways of miR-1-3p in colorectal carcinoma based on 645 cases from 9 microarray datasets. Mol Med Rep. 2018;17(4):5013-20. Epub 2018/02/03. doi: 10.3892/mmr.2018.8532. PubMed PMID: 29393467; PubMed Central PMCID: PMCPMC5865962.

97. Zhu D, Sun Y, Zhang D, Dong M, Jiang G, Zhang X, et al. miR-1 inhibits the progression of colon cancer by regulating the expression of vascular endothelial growth factor. Oncol Rep. 2018;40(2):589-98. Epub 2018/05/31. doi: 10.3892/or.2018.6463. PubMed PMID: 29845255; PubMed Central PMCID: PMCPMC6072287.

98. Wang Z, Tang Y, Xie L, Huang A, Xue C, Gu Z, et al. The Prognostic and Clinical Value of CD44 in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. Frontiers in oncology. 2019;9:309-. doi: 10.3389/fonc.2019.00309. PubMed PMID: 31114754.

99. Balcerczak E, Pasz-Walczak G, Kumor P, Panczyk M, Kordek R, Wierzbicki R, et al. Cyclin D1 protein and CCND1 gene expression in colorectal cancer. European Journal of Surgical Oncology (EJSO). 2005;31(7):721-6. doi: https://doi.org/10.1016/j.ejso.2005.04.005.

100. Cai XA-O, Liu C, Zhang TN, Zhu YW, Dong X, Xue P. Down-regulation of FN1 inhibits colorectal carcinogenesis by suppressing proliferation, migration, and invasion. (1097-4644 (Electronic)).

101. Mo JS, Park WC, Choi SC, Yun KJ, Chae SC. MicroRNA 452 Regulates Cell Proliferation, Cell Migration, and Angiogenesis in Colorectal Cancer by Suppressing

VEGFA Expression. Cancers (Basel). 2019;11(10). Epub 2019/10/28. doi: 10.3390/cancers11101613. PubMed PMID: 31652600; PubMed Central PMCID: PMCPMC6826374.

102. Zhang W, Zou C, Pan L, Xu Y, Qi W, Ma G, et al. MicroRNA-140-5p inhibits the progression of colorectal cancer by targeting VEGFA. Cell Physiol Biochem. 2015;37(3):1123-33. Epub 2015/09/25. doi: 10.1159/000430237. PubMed PMID: 26402430.

103. Liu W, Wei H, Gao Z, Chen G, Liu Y, Gao X, et al. COL5A1 may contribute the metastasis of lung adenocarcinoma. Gene. 2018;665:57-66. doi: https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.066.

104. Li W, Chen A, Xiong L, Chen T, Tao F, Lu Y, et al. miR-133a acts as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting eIF4A1. Tumour Biol. 2017;39(5):1010428317698389. Epub 2017/05/04. doi: 10.1177/1010428317698389. PubMed PMID: 28466778.

105. Weber D, Amar L, Gödde D, Prinz C. Extensive screening of microRNA populations identifies hsa-miR-375 and hsa-miR-133a-3p as selective markers for human rectal and colon cancer. Oncotarget. 2018;9(43):27256-67. Epub 2018/06/23. doi: 10.18632/oncotarget.25535. PubMed PMID: 29930763; PubMed Central PMCID: PMCPMC6007480.

106. Wang LL, Du LT, Li J, Liu YM, Qu AL, Yang YM, et al. Decreased expression of miR-133a correlates with poor prognosis in colorectal cancer patients. World J Gastroenterol. 2014;20(32):11340-6. Epub 2014/08/30. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11340. PubMed PMID: 25170220; PubMed Central PMCID: PMCPMC4145774.

107. Zhang Z, Wang Y, Zhang J, Zhong J, Yang R. COL1A1 promotes metastasis in colorectal cancer by regulating the WNT/PCP pathway. Mol Med Rep. 2018;17(4):5037-42. Epub 2018/02/03. doi: 10.3892/mmr.2018.8533. PubMed PMID: 29393423; PubMed Central PMCID: PMCPMC5865965.

108. Assidi M, Gomaa W, Jafri M, Hanbazazh M, Al-Ahwal M, Pushparaj P, et al. Prognostic value of Osteopontin (SPP1) in colorectal carcinoma requires a personalized

molecular approach. Tumour Biol. 2019;41(9):1010428319863627. Epub 2019/09/11. doi: 10.1177/1010428319863627. PubMed PMID: 31500540.

EKLER

EK 1. FARKLI İFADE EDİLEN MİRNA'LAR, TERS KORELE GENLER VE BULUNDUKLARI YOLAKLAR

miRNA ID	Affy	Agi	Gene ID	FC in 109S477 list	Pathways
hsa-miR-139-5p	-6,88	-2,83	HSP90AA1	2,02905	Estrogen signaling pathway
hsa-mir-497	-3,57	-1,78	HSP90AA1	2,02905	pathway in cancer, PI3K-Akt signaling pathway
		-1,78	CCND1	2,34638	pathway in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, Endometrial cancer, Colorectal cancer, Bladder cancer
		-1,78	VEGFA	2,96671	pathway in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, Bladder cancer
		-1,78	AXIN2	2,35901	pathway in cancer, Endometrial cancer, Colorectal cancer
hsa-mir-378	-3,06	-1,61	F2R	2,01037	Pathways in cancer, PI3K-Akt signaling pathway
			HSP90AA1	2,02905	Pathways in cancer, PI3K-Akt signaling pathway
			VEGFA	2,96671	Pathways in cancer, Renal cell carcinoma, PI3K-Akt signaling pathway
			TGFB2	2,11608	Pathways in cancer, Renal cell carcinoma
hsa-mir-195	-3,05	-2,41	CCND1	2,34638	pathway in cancer, Endometrial cancer, Colorectal cancer, Bladder cancer
			VEGFA	2,96671	pathway in cancer, Bladder cancer
			AXIN2	2,35901	pathway in cancer, Endometrial cancer, Colorectal cancer
hsa-mir-145-5p	-2,87	-2,08	CCND1	2,34638	Pathways in cancer, Proteoglycans in cancer, p53 signaling pathway, MicroRNAs in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, FoxO signaling pathway,Focal adhesion
			VEGFA	2,96671	Pathways in cancer, Proteoglycans in cancer, MicroRNAs in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, Focal adhesion
			MMP1	4,31942	Pathways in cancer
			STAT1	2,25168	Pathways in cancer
			CD44	2,04554	Proteoglycans in cancer, MicroRNAs in cancer

			SERPINE1	3,62393	p53 signaling pathway
			SOD2	2,04265	FoxO signaling pathway
			COL5A1	3,74258	PI3K-Akt signaling pathway, Focal adhesion
hsa-mir-150	-2,80	-2,36	VEGFA	2,96671	Proteoglycans in cancer, Ras signaling pathway, MicroRNAs in cancer
			ELK1	2,04755	Proteoglycans in cancer, Ras signaling pathway
			PLA2G16	2,20188	Ras signaling pathway, Arachidonic acid metabolism
			NOTCH3	2,81924	MicroRNAs in cancer
			PTGIS	2,12231	Arachidonic acid metabolism
hsa-mir-133a-3b	-2,80	-1,79	VEGFA	2,96671	PI3K-Akt signaling pathway, Focal adhesion,
			THBS2	20,2049	PI3K-Akt signaling pathway, Focal adhesion, ECM-receptor interaction
			COL1A1	7,46996	PI3K-Akt signaling pathway, Focal adhesion, ECM-receptor interaction
			BCL2L1	2,26022	PI3K-Akt signaling pathway, ECM-receptor interaction
hsa-mir-375	-2,69	-1,95	yolak analizi sonucu önemli gen yok		
hsa-mir-10b	-2,62	-1,56	yolak analizi sonucu önemli gen yok		
hsa-mir-30a	-2,26	-2,04	WNT5A	2,23228	Proteoglycans in cancer
			CD44	2,04554	Proteoglycans in cancer
			MET	2,35032	Proteoglycans in cancer, Axon guidance
			PLXNA1	2,04482	Axon guidance
hsa-mir-133b	-2,05	-2,36	yolak analizi sonucu önemli gen yok		
hsa-mir-342-5p	-1,87	-1,99	yolak analizi sonucu önemli gen yok		
hsa-mir-1-3p	-1,55	-2,56	CD44	2,04554	Proteoglycans in cancer, MicroRNAs in cancer, ECM-receptor interaction
			CCND1	2,34638	Proteoglycans in cancer, MicroRNAs in cancer, Focal adhesion, PI3K-Akt signaling pathway
			MET	2,35032	Proteoglycans in cancer, MicroRNAs in cancer, Focal adhesion, PI3K-Akt signaling pathway
			FN1	2,70179	Proteoglycans in cancer, Focal adhesion, PI3K-Akt signaling pathway, ECM-receptor interaction
			TIMP3	2,67179	Proteoglycans in cancer, MicroRNAs in cancer
hsa-mir-93	1,32	2,37	BMP2	-4,74775	Pathways in cancer
			MDM2	-3,75246	Pathways in cancer, Proteoglycans in cancer, PI3K-Akt signaling pathway

			PRKACB	-4,07373	Pathways in cancer, Proteoglycans in cancer, Wnt signaling pathway
			TCF7L2	-2,03584	Pathways in cancer, Wnt signaling pathway
			WNT2B	-2,08947	Pathways in cancer, Proteoglycans in cancer, Wnt signaling pathway
hsa-mir-27a	1,32	2,14	PIK3CG	-2,55314	Pathways in cancer, Proteoglycans in cancer, Proteoglycans in cancer, Colorectal cancer, PI3K-Akt signaling pathway
hsa-mir-1280	1,53	1,64	mirwalk sonucu yok		
hsa-mir-148a	1,54	2,12	WNT2B	-2,08947	Pathways in cancer
hsa-mir-92b	1,54	2,26	HMGCR	-2,12813	Biosynthesis of antibiotics
hsa-mir-331-3p	1,56	1,59	PPARD	-2,02996	PPAR signaling pathway
hsa-mir-29a	1,61	1,96	SGK1	-4,02026	PI3K-Akt signaling pathway, FoxO signaling pathway
			MDM2	-4,02846	PI3K-Akt signaling pathway, Pathways in cancer, MicroRNAs in cancer
			FOS	-2,10065	Pathways in cancer
hsa-mir-29b	1,65	2,31	PIK3CG	-2,55314	PI3K-Akt signaling pathway, Pathways in cancer, Focal adhesion, Proteoglycans in cancer, Colorectal cancer
			SGK1	-4,02026	PI3K-Akt signaling pathway
			MDM2	-4,02846	PI3K-Akt signaling pathway, Pathways in cancer, MicroRNAs in cancer
			FOS	-2,10065	Pathways in cancer, Colorectal cancer
			PPARD	-2,02996	Pathways in cancer
hsa-mir-92a	1,65	2,51	MDM2	-4,02846	Pathways in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, p53 signaling pathway
			PPARD	-2,02996	Pathways in cancer, Wnt signaling pathway
hsa-mir-106b	1,68	2,18	TCF7L2	-2,03584	Pathways in cancer, Hippo signaling pathway, Wnt signaling pathway
			PRKACB	-2,13471	Proteoglycans in cancer, Pathways in cancer, Wnt signaling pathway
			MDM2	-4,02846	Proteoglycans in cancer, Pathways in cancer
			BMP2	-4,72228	Pathways in cancer, Hippo signaling pathway
hsa-mir-34a	1,68	2,80	anti-korele gen yok		
hsa-mir-20b	1,72	2,45	TCF7L2	-2,03584	wnt signaling pathway
			PRKACB	-2,13471	wnt signaling pathway

			MDM2	-4,02846	FoxO signaling pathway
hsa-mir-19b	1,76	2,45	FGFR2	-2,21463	MAPK signaling pathway
			FOS	-2,10065	MAPK signaling pathway
			CACNB2	-2,12154	MAPK signaling pathway
			PRKACB	-2,13471	MAPK signaling pathway
hsa-mir-130b	1,77	1,99	HHIP	-2,2979	Hedgehog signaling pathway, Basal cell carcinoma
			TCF7L2	-2,03584	Basal cell carcinoma
hsa-mir-17	1,84	2,71	PRKACB	-2,13471	Proteoglycans in cancer, Pathways in cancer, Wnt signaling pathway
			THBS1	-2,9164	Proteoglycans in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, MicroRNAs in cancer
			BMP2	-4,72228	Pathways in cancer
			MDM2	-4,02846	Proteoglycans in cancer, Pathways in cancer, MicroRNAs in cancer, p53 signaling pathway
			TCF7L2	-2,03584	Pathways in cancer, Wnt signaling pathway
hsa-mir-25	1,88	1,89	MDM2	-4,02846	Prostate cancer
hsa-mir-203	1,89	2,36	mirwalk sonucu yok		
hsa-mir-196b	1,94	1,73	yolak analizi sonucu önemli gen yok		
hsa-mir-424	1,95	3,41	anti-korele gen yok		
hsa-mir-20a	2,00	2,85	BMP2	-4,72228	Pathways in cancer
			MDM2	-4,02846	Pathways in cancer, p53 signaling pathway, Wnt signaling pathway
			TCF7L2	-2,03584	Pathways in cancer
			PRKACB	-2,13471	Wnt signaling pathway
hsa-mir-1290	2,04	2,42	yolak analizi sonucu önemli gen yok		
hsa-mir-552	2,05	3,16	yolak analizi sonucu önemli gen yok		
hsa-mir-720	2,11	1,74	mirwalk sonucu yok		
hsa-mir-19a	2,16	2,16	PRKACB	-2,13471	MAPK signaling pathway
			FOS	-2,10065	MAPK signaling pathway

			CACNB2	-2,12154	MAPK signaling pathway
			THBS1	-2,9164	p53 signaling pathway
hsa-mir-18b	2,88	2,22	MDM2	-4,02846	p53 signaling pathway, cell cycle
hsa-mir-224	2,93	4,73	MDM2	-4,02846	Pathways in cancer, p53 signaling pathway
hsa-mir-21	2,93	3,90	PDCD4	-2,70497	Proteoglycans in cancer, MicroRNAs in cancer
			SGK1	-4,02026	FoxO signaling pathway
hsa-mir-183	3,94	3,95	PDCD4	-2,70497	Proteoglycans in cancer
hsa-mir-182		4,81	PDCD4	-2,70497	Proteoglycans in cancer, MicroRNAs in cancer
			THBS1	-2,9164	Proteoglycans in cancer, MicroRNAs in cancer, ECM-receptor interaction

EK 2. QRT-PCR REAKSİYONLARINDA KULLANILAN PRİMER BİLGİLERİ

Gen	İleri (forward) Primer (5'—3')	Geri (reverse) Primer (5'—3')	Amplikon uzunluğu(bç)	Bağlanma sıcaklığı
FN1	GCTCTATTCCACCTTACAACAC	ACACAACGATGCTTCCTGAG	155	55
COL1A1	AAGAGGAAGGCCAAGTCGAG	AGATCACGTCATCGCACAAC	156	56
COL5A1	GATGTCGCTTACAGAGTCACC	TTGGCTTTCACAGTTGTTAGGA	112	55
BCL2L1	GGTATTGGTGAGTCGGATCG-	TGCTGCATTGTTCCCATAGA	122	55
CCND1	CCCTCGGTGTCCTACTTCAA	GAAGCGGTCCAGGTAGTTCA	148	57
CD44	GGACAAGTTTTGGTGGCACG	TCCGTCCGAGAGATGCTGTA	141	55
SSP1	AACGCCGACCAAGGAAAACT	CTCAGAACTTCCAGAATCAGCCT	111	55
VEGFA	AAGGAGGAGGGCAGAATCAT	CACACAGGATGGCTTGAAGA	144	56
THBS1	GAGAATGCTGTCCTCGCTGT	TCACATCGGTTGTTGAGGCT	145	56

EK 3. ETİK KURUL KARARI

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sporadik Kolorektal kanserlerde epigenomik ve transkriptomik profilin entegrasyonu
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhıye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Hilal ÖZDAĞ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Biyoloji ve Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Araştırması			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sporadik Kolorektal kanserlerde epigenomik ve transkriptomik profilin entegrasyonu
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER.	☐	
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:18-1201-18**	**Tarih:12 Kasım 2018**	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.İrfan SÖYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr Levent VAZICIOĞLU	Kalp ve Damar Cerrahisi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	—
Prof.Dr Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.İnci İLTAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serap ŞİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	—
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	—
Doç.Dr.Derya GÖKMEN	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Pınar HURİ	Biyomedikal Mühendisliği	A.Ü. Mühendislik Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	oylamaya katılmadı
Dr.Öğr.Üyesi Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	H.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dilek BERKTAŞ	Matematik Mühendisliği	Türkiye Kömür İşletmeleri Genel Müdürlüğü	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Edibe Ece Abacı

Doğum Yeri: Hatay

Doğum Tarihi: 16.09.1993

E-posta: edibeece@gmail.com

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Bilgileri

Lisans: Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik (2012-2016)

Lise: Yüksel Acun Anadolu Lisesi (2007-2011)

Bildiriler

O. Cumaogullari, S. Charyyeva, **E. Abaci**, Z. Bilici, H. Ozakinci, O. Ilk, A. Kuzu, H. Ozdag Seven European colorectal cancer predisposing SNPs are associated with CRC and its prognosis in Turkish population European Human Genetics Conference 2019, Gothenburg, İsveç. Abstracts from the 52nd European Society of Human Genetics (ESHG) Conference: Posters. European Journal of Human Genetics. 2019;27(2):1814-920. doi: 10.1038/s41431-019-0493-3.

Sulgun Charyyeva, Ozge Cumaoğulları, **Edibe Ece Abacı**, Özlem İlk, Ayhan Kuzu, Hilal Özdağ. Türkiye Family Based GWAS for Colorectal Cancer Identifies Five Susceptibility and Twelve Prognosis Related Loci in Turkish Population 13th Balkan Congress of Human Genetics 2019, Edirne

Edibe Ece Abaci, Namood-E Sahar, Nevin Belder, Berna Savaş, Arzu Ensari, Ayhan Kuzu, *Hilal Özdağ.* Sporadik Kolorektal Kanserde Global miRNA İfade Profillerinin Entegrasyonu XIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 2018, Antalya, Türkiye

İş Deneyimi

Kurumu: TUBİTAK 106S501 ‘Behçet Sendromu'nda miRNom ve Transkriptom Profillerinin Entegrasyonu, Proje Bursiyeri

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Edibe Ece Abaci, Namood-E Sahar, Nevin Belder, Berna Savaş, Arzu Ensari, Ayhan Kuzu, Hilal Özdağ Integration of global miRNA and mRNA expression profiles in sporadic colorectal cancer

Uluslararası Katılımlı 13. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi

P-019 - INTEGRATION OF GLOBAL MİRNA AND MRNA EXPRESSION PROFILES IN SPORADIC COLORECTAL CANCER

Edibe Ece ABACI[1], Namood-e SAHAR[2], Nevin BELDER[3], Berna SAVAŞ[4], Arzu ENSARİ[5], Ayhan KUZU[6], Hilal ÖZDAĞ[1], [1]

[1]ANKARA UNİVERSİTY BİOTECHNOLOGY INSTİTUTE, [2]COMSATS UNİVERSTY INSTİTUTE OF INFORMATİON TECHNOLOGY, [3]BİLKENT UNİVERSİTY DEPARTMENT OF MOLECULAR BİOLOGY AND GENETİCS, [4]ANKARA UNİVERSİTY SCHOOL OF MEDİCİNE, DEPARTMNET OF MEDİCAL PATHOLOGY, [6]ANKARA UNİVERSİTY SCHOOL OF MEDİCİNE, DEPARTMENT OF GENERAL SURGERY

Colorectal cancer (CRC), a disease with high incidence and mortality rates, has been studied for decades. Due to the heterogeneous nature of the disease, novel biomarkers are needed for its diagnosis, prognosis and treatment of the disease. In this study, we aim to determine miRNA's responsible of CRC development and pathogenesis via integration of meta analysis of previous CRC miRNA profiling datasets with transcriptome profiling data from our CRC patient group.

Herein, for a mechanistic understanding of differential gene expression in CRC tissue, we analyzed miRNA expression profiles of 78 CRC tumors against 62 normal colorectal mucosa samples, using raw data from E-MTAB-752, E-GEOD-35834 (Affymetrix), GSE35982 and E-MTAB-813 (Agilent) datasets obtained from Gene Expression Omnibus and ArrayExpress. Raw samples were normalized using quartile normalization in BRB-ArrayTools. Differential expression of miRNAs was identified using cut-off values of $p \leq 0.05$, fold change ≥ 1.5 and stringent false discovery rates. miRTarBase and miRWalk2.0 databases were explored to identify validated targets. hsa-miR-182, hsa-miR-183, hsa-miR-145, hsa-miR-195 from aforementioned analysis, with potential targets belonging to cancer related pathways, were chosen for further qPCR analysis (n=20 paired tumor normal samples). For statistical analysis, Ln (2^-ΔΔCT expression value) transformation and one sample t-test were used.

We found thirty and thirteen miRNAs commonly upregulated and downregulated respectively, in both Affymetrix and Agilent microarray results. Predicted targets of these miRNAs frequently belong to pathways related to cancer like β-catenin, Phosphoinositol-3Kinase, and TGF-β, to name few. Moreover, the target genes were significantly enriched in clusters related to cell cycle, cell differentiation and regulation of apoptosis. These miRNAs were quantified using qPCR among the same Turkish cohort. Interestingly, miR-182-5p and 183-5p were upregulated in both meta-data analyses and our samples from Turkish cohort. Similarly, miR-145-5p and miR-195-5p were downregulated in meta-data as well as our colorectal cancer samples.

The expression of miR-195-5p and miR-145-5p is significantly correlated. This correlation points out a possible common upstream regulatory event engaged in carcinogenesis. These findings validate that a disrupted miRNA expression profile has a strong likely role to play for aberrant regulation of cancer related genes, both tumor suppressors and oncogenes.

KEYWORDS: SPORADİC COLORECTAL CANCER, MİRNA, EPİGENETİCS, FFPE, META-ANALYSİS

SPORADİK KOLOREKTAL KANSERDE GLOBAL miRNA ve mRNA İFADE PROFİLLERİNİN ENTEGRASYONU

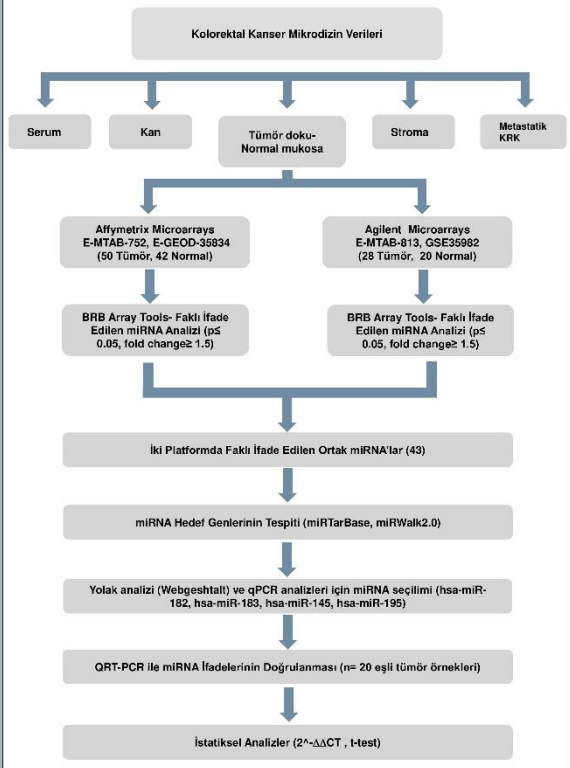
Edibe Ece Abacı[1], Namood-e Sahar[2], Nevin Belder[3], Arzu Ensari[4], Berna Savaş[4], Ayhan Kuzu[5], Hilal Özdağ[1]

1. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü SİSBİYOTEK İleri Araştırma Birimi, 2. COMSATS Bilgi Teknolojileri Enstitüsü, 3. Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik, 4.Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, 5. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı

ÖZET

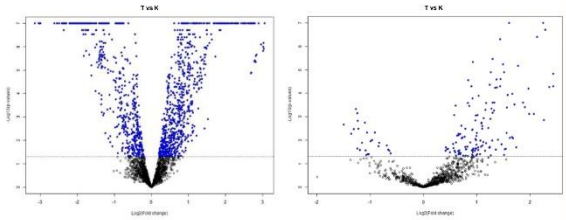
Kolorektal karsinogenez (KRK), dünyada onlarca yıldır çalışılmasına rağmen yüksek insidans ve mortalite oranlarına sahip bir hastalıktır. Bu hastalığın heterojen doğası sebebiyle, hastalığın teşhis, prognoz ve tedavisine yönelik mevcut biyobelirteçlere ek yeni biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Hastalığın heterojen yapısını ortaya çıkarmak üzere bugüne dek kapsamlı birçok araştırmada kolorektal kanserin genomik, transkriptomik ve proteomik profillemesi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, KRK'larda daha önceden yapılmış olan global miRNA araştırmalarının ham verilerini[1-4] meta-analiz yöntemiyle[5] değerlendirilip daha önce kendi KRK örneklem grubumuzdan elde ettiğimiz transkriptom profili ile entegrasyonu sonucunda KRK gelişimi ve patogenezinde etkin miRNA'ların tespiti amaçlanmıştır. Bu amaçla, GEO ve ArrayExpress'de bulunan Affymetrix ve Agilent mikrodizinleri kullanılarak meta analiz çalışması yapılmıştır. Meta-analiz çalışması ile dört miRNA (hsa-miR-182, hsa-miR-183, hsa-miR-145, hsa-miR-195) QPCR analizleri için seçilmiştir. Bu miRNA'ların ifade seviyeleri KRK doku örnekleri (n=20 eşli tümör kontrol örnekleri) kullanılarak qPCR yöntemi ile ölçülmüştür. miR-182-5p ve 183-5p ifade seviyelerinin, hem meta-veri analizlerinde hem de QRT-PCR analizlerinde arttığı, miR-145-5p ve miR-195-5p ifade seviyelerinin ise azaldığı tespit edilmiştir.

MATERYAL-YÖNTEM



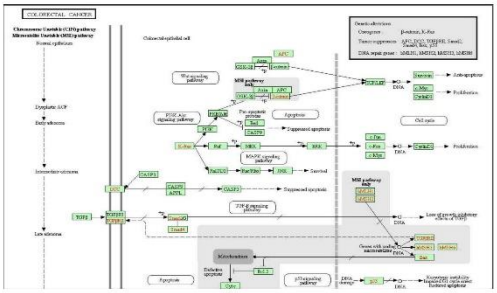
SONUÇLAR

Analizler sonrasında 30 miRNA'nın yüksek seviyede, 13 miRNA'nın ise düşük seviyede ifade olduğu tespit edilmiştir. Affymetrix ve Agilent veri setlerinde farklı ifade edilen miRNA' lara ait Volcano grafikleri çizilmiştir. (Şekil 1)



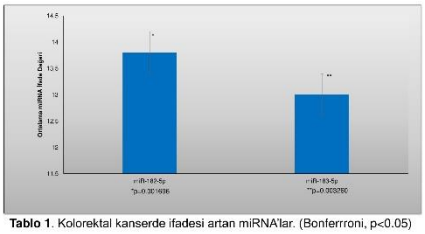
Şekil 1. Affymetrix ve Agilent platformlarına ait farklı ifade edilen genlerin Volcano Grafikleri

Farklı ifade edilen miRNA'ların olası hedeflerinin, özellikle β-katenin, Phosphoinositol-3 Kinase ve Transforming growth factor-β gibi kansere bağlı yolaklara ait olduğu belirlendi. Ayrıca hedef genlerin hücre döngüsü, hücre farklılaşması ve apoptozun düzenlenmesi ile ilgili kümelerde önemli ölçüde zenginleştiği tespit edildi. (Şekil 2)

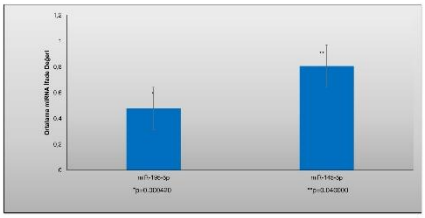


Şekil 2. Farklı ifade edilen miRNA' lar kolorektal kanserde önemli yolakları hedef almaktadır.

Biyoinformatik analizler sonrasında qPCR analizleri için seçilen miR-182-5p ve 183-5p ifade seviyelerinin, hem meta-veri analizlerinde hem de QRT-PCR analizlerinde arttığı, miR-145-5p ve miR-195-5p ifade seviyelerinin ise azaldığı tespit edildi. (Tablo 1- 2)



Tablo 1. Kolorektal kanserde ifadesi artan miRNA'lar. (Bonferrroni, p<0.05)



Tablo 2. Kolorektal kanserde ifadesi azalan miRNA'lar. (Bonferrroni, p<0.05)

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda miR-195-5p ve miR-145-5p ifade profilleri arasında yüksek korelasyon olduğu bulundu. (Tablo 3)

** Korelasyon <0.01 seviyesinde önemlidir.

		log_DDCT183	log_DDCT182	log_DDCT195	log_DDCT145
log_DDCT183	Pearson Correlation	1	.364	.106	.067
	Sig. (2-tailed)		.123	.632	.778
	N	20	19	20	20
log_DDCT182	Pearson Correlation	.364	1	.377	.308
	Sig. (2-tailed)	.123		.251	.380
	N	19	19	19	19
log_DDCT195	Pearson Correlation	.106	.377	1	.729**
	Sig. (2-tailed)	.653	.251		.000
	N	20	19	20	20
log_DDCT145	Pearson Correlation	.067	.308	.729**	1
	Sig. (2-tailed)	.778	.200	.000	
	N	20	19	20	20

Tablo 3. Analiz edilen miRNA' ların korelasyonları

TARTIŞMA

Elde edilen veriler, değişen miRNA ekspresyon profilinin, hem tümör baskılayıcılar hem de onkogenler gibi kanserle ilişkili genlerin anormal bir şekilde düzenlenmesinde güçlü bir rol oynadığını doğrulamaktadır. Burada ayrıca dikkat çeken bir husus miR-195-5p ve miR-145-5p ifade profilleri arasındaki yüksek korelasyondur ki bu durum kolorektal karsinogenezde olası ortak bir upstream regülasyon mekanizmasını işaret etmektedir.

REFERANSLAR

1. Bartley AN, Yao H, Sarkosh BA, ve ark. Complex Patterns of Altered MicroRNA Expression during the Adenoma-Adenocarcinoma Sequence for Microsatellite-Stable Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 2011;17(23):7283.
2. Fu J, Tang W, Du P, ve ark. Identifying MicroRNA-mRNA regulatory network in colorectal cancer by a combination of expression profile and bioinformatics analysis. *BMC systems biology* 2012;6(1):68.
3. Pierpol A, Tavano F, Copetti M, ve ark. Mirna Expression Profiles Identify Drivers in Colorectal and Pancreatic Cancers. *PLoS One*. 2012;7(9):e45985.
4. Pizzini S, Bisognin A, Mandruzzato S, ve ark. Impact of microRNAs on regulatory networks and pathways in human colorectal carcinogenesis and development. *BMC Genomics*. 2013;14(1):589.
5. Ozkan Y, Bekiroc T, Aydos A, Yalug IC, Bozkurt B, Dedeoglu BC. A Ranking-Based Meta-Analysis Reveals Let-7 Family as a Meta-Signature for Grade Classification in Breast Cancer. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126857.