ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

# KOLOREKTAL KANSERDE ADAY PROGNOSTİK BİYOBELİRTEÇLERİN ARŞİV MATERYALLERİNDE DOĞRULANMASI

Sulgun Charyyeva

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili

Haziran

2021

**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.

Sulgun Charyyeva

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Kolorektal Kanserde Aday Prognostik Biyobelirteçlerin Arşiv Materyallerinde Doğrulanması

Sulgun Charyyeva

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili

Kolorektal kanser (KRK) dünyade ve Türkiye'de en sık görülen üçüncü ve en ölümcül ikinci kanser olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda KRK'nın tanısı ve prognozu açısından biyolojik belirteçlerin kullanımı yaygın hale gelmiştir. Bu bağlamda ekibimiz tarafından yapılan ön çalışmalar sonucu hücre dışı matris etkileşim yolağında görev gören *COL1A1, COL5A1, FN1* ve *THBS2* genlerinin yüksek ifadesinin KRK'nın teşhis ve seyrinin öngörülmesinde faydalı olabileceği ortaya konmuştur.

Bu doğrultuda tez çalışması kapsamında 200 KRK tümör ve 70 kontrol FFPE dokularından RNA izolasyonu yapılıp qRT PCR yöntemiyle bu dört genin ekspresyon verisi önceki çalışmalar ile birlikte incelenmiştir. Diğer tarafadan 200 KRK tümör örneğinin mRNA verisine ek olarak bu genler protein seviyesinde immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiş ve hayatta kalım ile ilişkilendirilmiştir.

Yapılan analizler sonucu normal mukoza ile kıyasla tümör hücrelerinde *COL1A1* geni için 200 tümör, 130 tümör ve 70 tümör vs 70 kontrol karşılaştırmalarında 2.1, 2.2 ve 3.8 kat artış ($p>0.0001$); *COL5A1* geni için 1.8, 2.2 ve 1.8 kat artış ($p>0.0001$); *FN1* geni için 9.0 kat ($p=0.0015$), 13.1 kat ($p=0.0010$) ve 1.6 kat artış ($p>0.0257$); THBS2 geni için 4.8 kat ($p=0.0001$), 6.6 kat ($p<0.0001$) ve 1.9 kat artış ($p=0.0007$) gözlemlenmiştir. Buna ek olarak tümör hücrelerinde *COL1A1* ve *COL5A1* genlerinin yüksek ekspresyonu KRK hastalarının genel, nükssüz ve uzak metastazsız sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir ve evre belirteci yanında sağkalımın tahminlerinde bağımsız bir faktör olabileceği gösterilmiştir. Diğer yandan *FN1*'in yüksek ifadesi daha kötü uzak metastazsız sağkalım ile bağdaştırılarak uzak metastazın tahmininde bağımsız bir prognostik belirteç olabileceği öngörülmüştür. Sonuç olarak, ileri çalışmalar gerektirmekle beraber çalışma kapsamında *COL1A1, COL5A1* ve *FN1* genlerinin potansiyel prognostik belirteçler olabileceği ortaya konmuştur.

2021, 128 sayfa



**Anahtar kelimeler:** Kolorektal kanser, biyobelirteç, FFPE, gen ekspresyonu, immünohistokimya.

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Validation Of Candidate Prognostic Biomarkers In Archive Colorectal Cancer Specimens

Sulgun Charyyeva

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Hilal Ozdag Sevgili

Colorectal cancer (CRC) is the third most common and the second deadliest cancer in the world as well as in Turkey. In recent years, the use of biological markers for the diagnosis and prognosis of cancer has become widespread in the clinic. In this context, as a result of our preliminary studies, it was revealed that high expression of the genes *COL1A1, COL5A1, FN1* and *THBS2*, which are involved in the ECM interaction pathway, could be useful for the diagnosis and prognosis of CRC.

Within the scope of the thesis study, RNA from 200 CRC tumors and 70 control FFPE tissues was isolated and the expression data of these four genes were examined together with previous studies. On the other hand, in addition to the mRNA data of 200 CRC tumor samples, these genes were evaluated immunohistochemically at the protein level and associated with the patient survival data.

As a result, in groups: 200 tumor vs 70 control, 130 tumor vs 70 control, and 70 tumor vs paired 70 control *COL1A1* was increased 2.1, 2.2 and 3.8 fold ($p>0.0001$); *COL5A1* was increased 1.8, 2.2 and 1.8 fold ($p>0.0001$); *FN1* was increased 9.0-fold ($p=0.0015$), 13.1-fold ($p=0.0010$) and 1.6-fold ($p>0.0257$); *THBS2* was increased 4.8-fold ($p=0.0001$), 6.6-fold ($p<0.0001$) and 1.9-fold ($p=0.0007$) respectively, in tumor cells compared to normal mucosa. Moreover, the high expression of *COL1A1* and *COL5A1* genes in tumor cells has been associated with overall, recurrence-free and distant metastasis-free survival of CRC patients, and it has been shown that it may be an independent factor in the prediction of survival as well as the TNM stage. In addition, high expression of *FN1* was associated with worse distant metastasis-free survival, and it was predicted that it could be an independent prognostic marker in the prediction of distant metastasis. In conclusion, although it requires further studies, it has been revealed that *COL1A1*, *COL5A1* and *FN1* genes can be potential prognostic markers within the scope of the study.



2021, 128 pages

**Keywords:** Colorectal cancer, biomarker, FFPE material, gene expression, immunohistochemistry.

**TEŞEKKÜR**

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi, tecrübesi ve sonsuz sevgisiyle beni yönlendiren, bilimsel araştırmanın ne olduğu, neye dikkat edilmesi gerektiği ve nasıl kendimi geliştirebileceğime dair yol gösteren ve her adımda destek çıkan değerli hocam Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili'ye,

Türkiye'de yüksek lisans eğitimim boyunca beni maddi olarak destekleyen Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na,

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim AÜ Biyoteknoloji Enstitüsü Sistem Biyolojisi İleri Araştırma Birimi' ne, AÜ Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalına ve tüm çalışanlarına ve hocalarına,

Tez çalışmamda kullanılan materyallerin toplanmasında ve değerlendirilmesinde emeğini esirgemeyen değerli patolog uzmanları Hale Karadağ, Hilal Özakıncı ve Seher Yüksel'e, ve hocalarım Prof. Dr. Arzu Ensari, Prof. Dr. Berna Savaş'a ve Prof. Dr. Işınsu Kuzu'ya,

Tez kapsamında yapılan kesit alımı işlemlerinde destek olan AÜ Patoloji ABD Moleküler Patoloji laboratuvarları çalışanları ve sevgili arkadaşlarım Burcu Çevik, Şinasi Aygün, Merve Bakırcı Besler ve Yasemin Şahin'e,

İmmünohistokimyasal analizler esnasında elinden gelen yardımı sunan ve eğiten AÜ Patoloji ABD İmünoloji laboratuvarları çalışanları Filiz Yeşilyurt, Nur Koyunoğlu Bilge ve Nadire Sevinç'e,

Tez çalışmam boyunca istatistiksel analizlerin yapılmasında tecrübelerini esirgemeyen genç ve sevgili hocam Dr. Nevin Belder'e,

Yüksek lisansım boyunca yanyana çalıştığımız Genombilim ekibi üyelerine, özellikle hocam Seda Taşır Yılmaz'a, Edibe Ece Abacı ve Berşan Seçil Durel'e

Genombilim labında çalışmaya başladığımda ilk tanıştığım ve her ne kadar işlerim yolunda gitmeyecek diye düşünsem dahi bana destek olan arkadaşım Laleh Madayen'e

Tüm tez süresince bana eşlik eden ve bilgileri, kültürüyle beni zenginleştiren sevgili arkadaşlarım Senem Noyan'a, Burcu Dolapçı'ya, Günseli Babaoğlu'ya, Begüm Karaoğlu'na, Yağmur Özge Eryılmaz'a ve Ayşegül Yücel Polat'a,

Dünyaya geleli beni karşılıksız seven ve her adımda, yaptığım tüm hatalarımı göz ardı ederek maddi-manevi destekleyen sevgili aileme, annem Bibi Yağmurova'ya, ablam ve kardeşlerim Suray ve Ogulcan Charyyeva'ya ve Murat Charyyev'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım,

Sülgün Charyyeva

Haziran 2021

**İÇİNDEKİLER**

**ETİK BEYAN** ..... **İ**

**ÖZET** ..... **İİ**

**ABSTRACT** ..... **İİİ**

**TEŞEKKÜR** ..... **İV**

**İÇİNDEKİLER** ..... **Vİ**

**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **X**

**ÇİZELGELER DİZİNİ** ..... **XİV**

**SİMGELER DİZİNİ** ..... **XVİ**

**1. GİRİŞ** ..... **1**

**2. KURAMSAL TEMELLER** ..... **2**

**2.1. KANSER VE BİYOBELİRTEÇLER** ..... **2**

2.1.1. KANSERİN GELİŞİMİ VE BELİRTİLERİ ..... 2

2.1.2. KANSERİN TANI VE PROGNOZUNDA BİYOBELİRTEÇLERİN ÖNEMİ ..... 4

**2.2. KOLOREKTAL KANSER** ..... **8**

2.2.1. KOLOREKTAL KANSERİN EPİDEMİYOLOJİSİ ..... 8

2.2.2. KOLOREKTAL KANSERİN ETİYOLOJİSİ VE RİSK FAKTÖRLERİ ..... 10

2.2.3. KOLOREKTAL KANSERİN HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRILMASI ..... 12

2.2.4. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER TEMELİ ..... 15

2.2.4.1. Kromozomal İnstabilite ..... 16

2.2.4.2. Mikrosatellit İnstabilitesi ..... 17

2.2.4.3. CpG Ada Metilasyonu ..... 17

**2.3. KOLOREKTAL KANSERDE MOLEKÜLER BELİRTEÇLER ..... 19**

2.3.1. PROTEİN BELİRTEÇLERİ ..... 19

2.3.2. DNA BELİRTEÇLERİ ..... 21

2.3.3. RNA BELİRTEÇLERİ ..... 25

**2.4. KOLOREKTAL KANSERDE UYGULANAN PROGNOSTİK VE DİYAGNOSTİK GEN PANELLERİ ..... 28**

2.4.1. COLOGUARD GEN PANELİ ..... 28

2.4.2. COLOPRINT VE ONCOTYPE GEN PANELLERİ ..... 29

2.4.2.1. Oncotype Örneği Üzerinden Biyobelirteç Panelinin Geliştirilmesi ..... 30

2.4.3. COLOTYPE: KONSENSÜS MOLEKÜLER ALTTİP (CMS) SINIFLANDIRMA GEN PANELİ ..... 34

**3. GEREKÇE VE AMAÇ ..... 36**

**4. MATERYAL VE YÖNTEM ..... 38**

**4.1. MATERYAL ..... 38**

**4.2. YÖNTEM ..... 39**

4.2.1. FORMALİNE FİKSE EDİLEN PARAFİNE GÖMÜLEN (FFPE) DOKULARDAN RNA İZOLASYONU ..... 39

4.2.1.1. Mikrodisseksiyon Yöntemiyle FFPE Dokularından Kesit Alımı Ve RNA İzolasyonu ..... 39

4.2.1.2. Elde Edilen RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Olarak Miktar Tayini ..... 42

4.2.1.3. Elde Edilen RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi ..... 43

4.2.2. EŞ ZAMANLI TERS TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON (QRT-PCR) YÖNTEMİYLE SEÇİLEN GENLERİN EKSPRESYON VERİSİNİN ORTAYA KONMASI ..... 44

4.2.2.1. Elde Edilen RNA'lardan cDNA Sentezi ..... 44

4.2.2.2. QRT PCR Reaksiyonunun Gerçekleştirilmesi ve Sonucunun Veri Analizi ..... 45

4.2.3. SEÇİLEN GENLERİN İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA İLE PROTEİN SEVİYESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ ..... 47

4.2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER..... 48

**5. ARAŞTIRMA BULGULARI ..... 50**

**5.1. RNA İZOLASYONU BULGULARI ..... 50**

5.1.1. ELDE EDİLEN RNA'LARIN MİKTARI ..... 50

5.1.2. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ BULGULARI ..... 50

**5.2. QRT-PCR YÖNTEMİYLE İFADESİ BELİRLENEN GENLERİN DEĞERLENDİRMESİ ..... 52**

5.2.1. TÜMÖR VE KONTROL ÖRNEKLERİNİN VALİDASYON BULGULARI..... 52

5.2.2. 200 TÜMÖR ÖRNEĞİNİN HAYATTA KALIM VE NÜKS-METASTAZ İLİŞKİ BULGULARI ..... 60

**5.3. PARAFİNE GÖMÜLÜ DOKULARIN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA BULGULARI ..... 69**

**6. TARTIŞMA VE SONUÇ..... 76**

**KAYNAKLAR ..... 82**

**EKLER ..... 92**

**EK 1. TÜMÖR ÖRNEKLERİNİN RNA İZOLASYON SONUÇLARI ..... 92**

**EK 2. KONTROL ÖRNEKLERİNİN RNA İZOLASYON SONUÇLARI..... 95**

**EK 3. QRT-PCR REAKSİYONLARINDA KULLANILAN PRİMER BİLGİLERİ .. 96**

**EK 4. QRT-PCR TÜMÖR SONUÇLARI: ORTALAMA CP DEĞERİ ..... 97**

**EK 5. QRT-PCR KONTROL SONUÇLARI: ORTALAMA CP DEĞERİ..... 102**

**EK 6. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMADA UYGULANAN ANTİKOR BİLGİLERİ..... 104**

**ÖZGEÇMİŞ ..... 105**

**TEZDEN ÇIKAN BİLDİRİLER ..... 107**

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanser gelişminin esas özellikleri ..... 2

Şekil 2.2. Globocan 2020: dünyade 2020 yılında görülen yeni kanser vaka ve vefat hasta hikayesi (her iki cinsiyet, tüm yaşlar) (1) ..... 8

Şekil 2.3. 2020 yılı Türkiye kanser verileri (her iki cinsiyet, tüm yaşlar) (1) ..... 9

Şekil 2.4. Kolorektal kanser vaka sınıflandırılması ..... 10

Şekil 2.5. Kolorektal kanserin en yaygın grubu olan adenokarsinomların patolojik görüntüsü (50) ..... 13

Şekil 2.6. Kolon tabakası ve KRK evrelendirmesi (56) ..... 14

Şekil 2.7. Kolon dokusunun iyi diferansiyasyondan az diferansiyasyona doğru geçişi: normal-grade 1- grade 2- grade 3 (54) ..... 15

Şekil 2.8. Adenomun karsinoma dönüşüm mekanizması (57) ..... 15

Şekil 2.9. CpG adacıklarının metilasyonu ve sporadik mikrosatellit instabilite yolağı (66) 18

Şekil 2.10. Kolorektal kanserin gelişiminde yer alan esas sinyal yolakları (77) ..... 23

Şekil 2.11. Kanser biyobelirteçlerinin keşif ve değerlendirme aşamaları (101) ..... 31

Şekil 2.12. Oncotype DX Faz 1 – klinik öncesi keşif aşaması ..... 32

Şekil 2.13. Konsensüs Moleküler Alt Tip (CMS) sınıflandırması ve yer aldığı biyolojik yolakları (114) ..... 34

Şekil 3.1. Çalışmanın akış şeması ..... 36

Şekil 5.1. 20/63-20/77 RNA örneklerinin %1 agaroz jel görüntüsü ..... 51

Şekil 5.2. 20/81-20/95 RNA örneklerinin %1 agaroz jel görüntüsü ..... 51

Şekil 5.3. 20/153-20/166 RNA örneklerinin %1 agaroz jel görüntüsü ..... 52

Şekil 5.4. *B2M* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü..... 53

Şekil 5.5. *HPRT* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü..... 54

Şekil 5.6. *COL1A1* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü..... 55

Şekil 5.7. *COL5A1* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü..... 56

Şekil 5.8. *THBS2* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü..... 57

Şekil 5.9. *FN1* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü..... 58

Şekil 5.10. *COL1A1* geni için tümör ve kontrol grup karşılaştırması: A – 70 tümör ve eşli kontrol, B – 200 tümör ve 70 kontrol, C – 130 tümör ve 70 kontrol ..... 59

Şekil 5.11. *COL5A1* geni için tümör ve kontrol grup karşılaştırması: A – 70 tümör ve eşli kontrol, B – 200 tümör ve 70 kontrol, C – 130 tümör ve 70 kontrol ..... 59

Şekil 5.12. *THBS2* geni için tümör ve kontrol grup karşılaştırması: A – 70 tümör ve eşli kontrol, B – 200 tümör ve 70 kontrol, C – 130 tümör ve 70 kontrol ..... 59

Şekil 5.13. *FN1* geni için tümör ve kontrol grup karşılaştırması: A – 70 tümör ve eşli kontrol, B – 200 tümör ve 70 kontrol, C – 130 tümör ve 70 kontrol ..... 60

Şekil 5.14. *COL1A1* geninin A - vefat eden, B – nüks gösteren ve C – metastaz gösteren gruplarında kat değişimi ..... 61

Şekil 5.15. *COL1A1* Kaplan-Meier sağkalım eğrisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım..... 62

Şekil 5.16. *COL5A1* geninin A - vefat eden, B – nüks gösteren ve C – metastaz gösteren gruplarında kat değişimi ..... 63

Şekil 5.17. *COL5A1* Kaplan-Meier sağkalım eğrisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım ..... 64

Şekil 5.18. *THBS2* geninin A - vefat eden, B – nüks gösteren ve C – metastaz gösteren gruplarında kat değişimi ..... 65

Şekil 5.19. *THBS2* Kaplan-Meier sağkalım eğrisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım ..... 66

Şekil 5.20. *FN1* geninin A - vefat eden, B – nüks gösteren ve C – metastaz gösteren gruplarında kat değişimi ..... 67

Şekil 5.21. *FN1* Kaplan-Meier sağkalım eğrisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım ..... 68

Şekil 5.22. *COL1A1* protein boyanma paterni ..... 69

Şekil 5.23. *COL1A1* 0 ve 1 protein ekspresyonu gruplarının mRNA gen ifadesi ile korelasyonu ..... 70

Şekil 5.24. *COL1A1* protein ekspersyonu sonucunda 0 ve 1'e ayrılan grupların sağkalım ile ilişkisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım ..... 71

Şekil 5.25. *COL5A1* protein boyanma paterni ..... 71

Şekil 5.26. *COL5A1* protein ekspresyonu ile mRNA gen ifadesi korelasyonu: A – skor 0-1-2-3, B – 0 vs 1-2-3 ..... 72

Şekil 5.27. *COL5A1* protein ekspresyonu sonucunda 0 ve 1-2-3'e ayrılan grupların sağkalım ile ilişkisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım .... 73

Şekil 5.28. *FN1* protein boyanma paterni ..... 74

Şekil 5.29. *FN1* protein ekspresyonu ile mRNA gen ifadesi korelasyonu: A – skor 0-1-2-3, B – 0-1-2 vs 3 ..... 74

Şekil 5.30. *FN1* protein ekspresyonu ile sağkalım ilişkisi: 0, 1-2 ve 3 grupları için A – genel sağkalım, 0-2 ve 3 grupları için B – genel sağkalım, C – nükssüz sağkalım, D – uzak metastazsız sağkalım ..... 75

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Klinikte rutin olarak uygulanan kanser biyobelirteçleri (15-38)..... 7

Çizelge 2.2. 2020'de Türkiye ve dünyada görülen yeni kanser vaka ve vefat eden hasta sayısı (her iki cinsiyet, tüm yaşlar) (1) ..... 9

Çizelge 2.3. Kolorektal kanserde uygulanan protein bazlı belirteçler (69-73,75)..... 20

Çizelge 2.4. Kolorektal kanserde uygulanan DNA tabanlı belirteçler (34,69-73,75,76) .... 22

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen olguların klinikopatolojik ve demografik özellikleri. 39

Çizelge 4.2. Agaroz jel elektroforezinde jelin hazırlanması için gerken malzemeler..... 43

Çizelge 4.3. 5 x TBE tampon bileşenleri..... 44

Çizelge 4.4. Bir örnek için cDNA sentezi denatürasyon reaksiyonu kurulumu..... 45

Çizelge 4.5. Reverse transcriptase reaksiyonunun kurulumu..... 45

Çizelge 4.6. cDNA sentezi için Thermal Cycler cihazında kurulan program ..... 45

Çizelge 4.7. qPCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarı (1 reaksiyonluk)..... 46

Çizelge 4.8. qPCR program bilgileri ..... 46

Çizelge 4.9. Antikor boyama koşulları..... 48

Çizelge 5.1. Tümör ve kontrol örneklerinin ortalama ve minimum, maksimum RNA izolasyon değerleri..... 50

Çizelge 5.2. Tüm aday genler için tümör ve kontrol gruplarının karşılaştırması ve kat değişimi ..... 60

Çizelge 5.3. *COL1A1* ekspresyonu ile genel sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 62

Çizelge 5.4. *COL1A1* ekspresyonu ile nükssüz sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 62

Çizelge 5.5. *COL1A1* ekspresyonu ile uzak metastazsız sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 63

Çizelge 5.6. *COL5A1* ekspresyonu ile genel sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 64

Çizelge 5.7. *COL5A1* ekspresyonu ile nükssüz sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 64

Çizelge 5.8. *COL5A1* ekspresyonu ile uzak metastazsız sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 65

Çizelge 5.9. *THBS2* ekspresyonu ile genel sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 66

Çizelge 5.10. *THBS2* ekspresyonu ile nükssüz sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 66

Çizelge 5.11. *THBS2* ekspresyonu ile uzak metastazsız sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 67

Çizelge 5.12. *FN1* ekspresyonu ile genel sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 68

Çizelge 5.13. *FN1* ekspresyonu ile nükssüz sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 68

Çizelge 5.14. *FN1* ekspresyonu ile uzak metastazsız sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu ..... 69

Çizelge 6.1. 50 KRK eşli tümör-kontrol mikrodizin ve qRT-PCR sonuçları, bağımsız 200 KRK hastanın tümör ve kontrol örneklerinin qRT-PCR sonucu..... 77

## SİMGELER DİZİNİ

| | |
|---|---|
| KRK | Kolorektal kanser |
| FFPE | Formaline fiksasyonu yapılan parafine gömülen örnekler |
| İHK | İmmünohistokimya |
| qRT – PCR | Eş zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi |
| HNPCC | Herediter non-polipozis kolorektal kanser |
| FAP | Ailesel adenomatöz polipozis |
| MAP | MUTYH ilişkili polipozis |
| MMR | Yanlış Eşleşme Tamiri |
| CIN | Kromozomal kararsızlık |
| MSI | Mikrosatellit kararsızlığı |
| CIMP | CpG adacıklarının metilasyonu |
| LOH | Heterozigotluk kaybı |
| MiRNA | Mikro RNA |
| LncRNA | Uzun kodlanmayan RNA |
| CircRNA | Dairesel RNA |
| CMS | Konsensüs moleküler alttipi |
| CEA | Karsinoembriyonik antijen |
| FIT | Fekal immünokimyasal testi |
| gFOBT | Gaitada gizli kan testi |
| KRAS | Kirsten sıçan sarkom viral onkogen homologu |

| | |
|---|---|
| BRAF | V-raf murin sarkom viral onkogen homologu B1PRT |
| B2M | Beta-2-Mikroglobulin |
| HPRT | Hipoksantin Fosforibosiltransferaz |
| COL1A1 | Kollajen Tip I Alfa 1 Zinciri |
| COL5A1 | Kollajen Tip V Alfa 1 Zinciri |
| FN1 | Fibronektin 1 |
| THBS2 | Trombospodin 2 |
| ECM | Hücre dışı matris |
| GEO | Gene Expression Omnibus |
| ug | Mikrogram |
| ul | Mikrolitre |
| ml | Millilitre |
| uM | Mikromolar |
| Bp | Baz çifti |
| dd$H_2O$ | Çift distile su |
| dk | Dakika |

# 1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK) dünyada en sık görülen üçüncü ve en ölümcül ikinci kanser türüdür. Global kanser istatistik verilerine göre 2020 yılında bu hastalığa yakalanan bireylerin sayısı neredeyse 2 milyonu bulmuşken 935 bin hasta KRK nedeniyle hayatını kaybetmiştir (1). KRK kolon ve rektum organlarının yapısından kaynaklı olarak erken tespit edildiğinde başarıyla tedavi edilebilmektedir. Ancak çoğu hasta, hastalığın semptomlarının geç ortaya çıkması nedeniyle ileri evrelerde ve özellikle metastaz geliştikten sonra teşhis edilebilmektedir. Vaka tanısının ardından hastanın sağkalım oranlarının ve nüksetme riskinin belirlenmesi doğru tedavi seçimini etkilemektedir. Günümüzde TNM evrelendirme sistemi rutin olarak terapi kararının alınmasında değerlendirilen başlıca prognostik parametredir.

Günümüzde kolorektal dahil olmak üzere birçok kanser türünün tanı ve prognozunun öngörülmesinde biyobelirteç kullanımı ön plana çıkmıştır. Biyobelirteçlerin keşif aşamasından klinik uygulamaya aktarılması on yılları içine alan büyük kapsamlı çalışmaları gerektirmektedir. Çoğu belirteç yeterli hassasiyet veya özgüllük sergilemediği için erken aşamalarda elenmektedir ve çok az kısmı sağlık sistemi yetkili organlarının onayını alabilmektedir. Bu çerçevede KRK birçok biyolojik süreci barındıran ve yüksek heterojenite sergileyen hastalıktır. Dolayısıyla her ne kadar en iyi çalışılmış kanser modellerinin biri olarak kabul edilse de halen karanlıkta kalan hususları barındırmaktadır. Bugün mevcut olan kolorektal kanser testleri ne erken teşhis aşamasındaki bütün vakaları mutlaka yakalamakta, ne hastalığın tespitinin ardından prognozunu %100 oranında öngörebilmekte, ne de KRK'ın bütün alt tiplerine yönelik spesifik tedavi metodunu önerebilmektedir. Bu nedenle bu sahadaki araştırmalar süratle devam etmektedir. Yeni tanısal ve prognostik biyobelirteçlerin tanımlanması ile gelecekte kanser mortalitesinin azalmasının ve kişiselleştirilmiş tedavinin geliştirilmesinin önünün açılacağı umut edilmektedir.

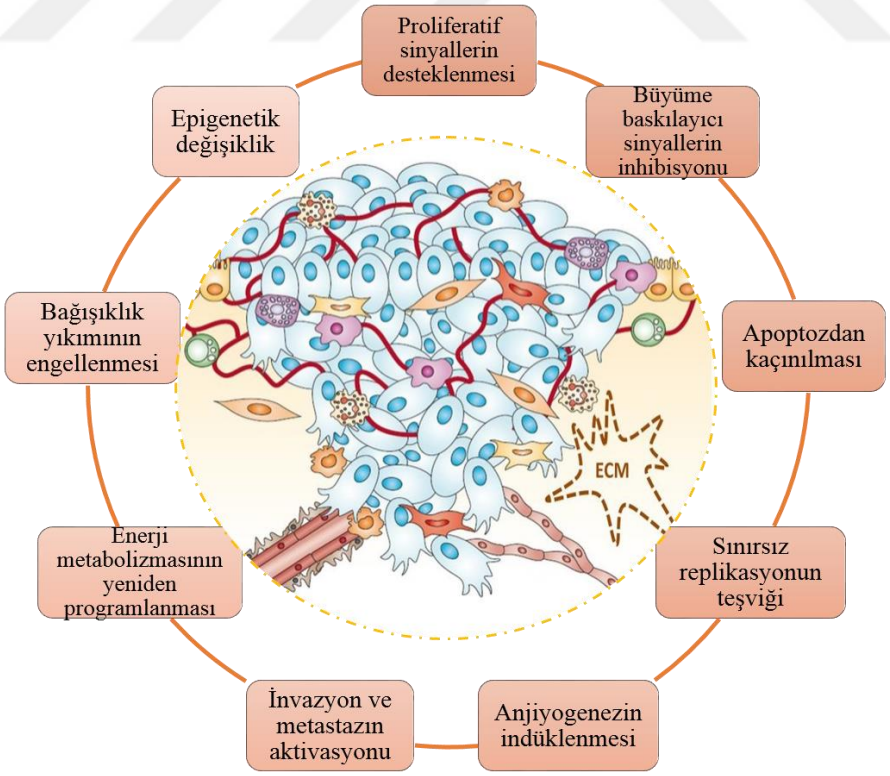
# 2. KURAMSAL TEMELLER

## 2.1. KANSER VE BİYOBELİRTEÇLER

### 2.1.1. KANSERİN GELİŞİMİ VE BELİRTİLERİ

Bugüne dek kanserin tanı ve tedavisinde yapılan mühim gelişmelere ve araştırma sonuçlarına rağmen bu hastalık halen dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerin biri olmaya devam etmektedir. Globocan istatistik verilerine göre 2020 yılında dünyada yaklaşık 19,3 milyon birey kansere yakalanırken 10 milyon hasta kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir ve bu rakamın 2040 yılına kadar % 47 artış sergileyeceği öngörülmektedir (1).

Kanser sağlıklı hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve ölümsüzleşmesi sonucu oluşan heterojen bir hastalıktır. Tarih boyunca, normal bir hücrenin kansere dönüşüm temelinin ortaya konulma çabası bu hastalığın biyolojisine dair artan bilgiler ile birlikte daha da karmaşık hale gelmiştir. Bir hastalık olarak kanserin karmaşıklığı, şekil 2.1.'de sıralanan esas özellikler ile şekillenmektedir (2-4).




Şekil 2.1. Kanser gelişminin esas özellikleri

Karsinogenezin başlangıcında genetik ve hücresel değişiklikler nedeniyle tek bir hücrenin anormal çoğalması ile bu tek hücreden gelen klonal tümör hücre popülasyonu oluşmaktadır. Bu popülasyonda her çoğalma esnasında ek mutasyonlar, delesyon, translokasyon ve insersiyonlar meydana gelmekte, ve oluşan krozomal instabilite nedeniyle hücre daha hızlı büyüme (büyüme baskılayıcı sinyallerin inhibisyonu), hayatta kalma (hücre ölümününden kaçınılması), invazyon ve metastaz sürecini hızlandırma gibi seçici avantajlara sahip olmaktadır. Bu tür hücreler tümör popülasyonu içinde zamanla baskın hale gelmekte ve hücre giderek kötü huylu tümöre dönüşmektedir (5). Bu bağlamda belirtilen nutasyonlar sayesinde tümör baskılayıcı genlerin susturulması ve proto-onkogenlerin işlev kazanması düzensiz hücre döngüsünü teşvik etmekte ve apoptotik mekanizmaların inaktivasyonuna yol açmaktadır (4). Aslında mutasyonlar hücre bölünmesi sırasında vücudumuzda hep gerçekleşmekte ve tamir mekanizmaları tarafından başarıyla onarılmaktadır, ancak değişikliğin hayati genlerde oluşması ve özellikle yaş ilerledikçe, stres ve olumsuz çevre etkenleriyle birlikte tamir edilemeyip birikmesi tümörigenez sürecine yol açmaktadır. Örneğin 30 ila 50 yaşlara göre 50 ila 70 yaş arasındaki bireylerin kolon kanserine yakalanma riski 10'ar kat artmaktadır (5).

Son yıllarda genetik değişimlerin yanı sıra epigenetik modifikasyonların da onkojenik fonksiyon kazanımında katkısı olduğu ortaya konmuştur. Burada dış ve iç sinyaller aracılığıyla kromatin direncinin artırılarak veya azaltılarak epigenetik esnekliğine (farklılaşmanın engellendiği kısıtlayıcı durum/mod) yol açılmasına ve sırasıyla da anormal hücre gelişimiyle sonuçlanan premalign ve malign hücrelerin gen düzenleyici yolaklarını yönetebilmesine sebep olmaktadır (6). Bu bağlamda hücre proliferasyonu sırasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve miRNA, lncRNA ve ncRNA'ların deregülasyonu üzerinden tümör baskılayıcı genlerinin inhibisyonu ve onkogen aktivasyonu gerçekleşmektedir (7).

Tümörigenez sürecine katkıda bulunan diğer iki özellik immün modülasyon ve enerji metabolizmasının yeniden programlanmasıdır. İmmün cevap, hem tümör hücreleriyle savaşabilmekte hem de tümörün ilerlemesine neden olan enflamatuar tümör mikroçevresini oluşturabilmektedir (7). Tümör gelişiminin erken aşamalarında, sitotoksik immün hücreleri daha yüksek immünojenite sergileyen kanser hücresini tanıyıp ortadan kaldırırken daha az immünojenik olan ve immün deteksiyonunda saptanamayan yeni varyantların çoğalmasına

neden olmaktadır (8). Kanser immüno-düzenlemesinin son aşamasında ise bu tümör hücre varyantları immün kontrol noktalarını "ele geçirerek" tümör gözetiminden ve immün yıkımdan kaçınmayı başarabilmektedirler. Bu aşamada, genetik ve epigenetik değişiklikler yoluyla bağışıklık tespit ve eliminasyonundan kaçabilen tümör varyantları kontrolsüz bir şekilde çoğalmaktadır (9). Tümör hücreleri, iki ana stratejiyi kullanarak immün yıkımından kaçmayı başarmaktadır:

- İmmün tanımasının önlenmesi,
- İmmünosupresif bir tümör mikroçevresinin teşvik edilmesi.

Birinci yolakta kanser hücreleri, hücre yüzey tümör antijenlerinin ekspresyonunu kaybederek sitotoksik T hücreleri tarafından tanınmaz hale gelmektedir. İkincisinde ise, tümör hücreleri tarafından immün baskılayıcı moleküller ve immün kontrol nokta inhibitörleri salgılanır ve böylelikle immünolojik toleransı indüklenmektedir (8).

Bu bağlamda bahsedilmesi gereken diğer bir kanser özelliği de proliferasyon hızına ayak uydurulabilmesi için enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesidir. Bildiğimiz kadarıyla kanser hücreleri çok yüksek hızla çoğalabilmektedir ve bu sebeple de normal hücreler ile kıyasla daha fazla enerjiye ihtiyaç duymaktadır (10). Bu nedenle de istenilen enerji talebinin sağlaması adına tümör hücrelerinde glikoz parçalanması oksidatif fosforilasyon yerine aerobik glikoliz yoluyla gerçekleştirilmektedir (Warburg etkisi) (11). Kanserin bu ayırt edici özelliği son dönemlerde hastalığın ana terapötik hedefleri haline gelmiştir.

### 2.1.2. KANSERİN TANI VE PROGNOZUNDA BİYOBELİRTEÇLERİN ÖNEMİ

Kanserleşme sürecinde hücreler farklı genetik ve epigenetik bozukluklar nedeniyle kontrolsüz bölünme ve ölümsüzleşme yeteneğini kazanarak organizmanın kendi vücuduna saldırmakta ve onu ele geçirmektedir. Multifaktöryel bir hastalık olan kanser beyin, meme, akciğer, mide, bağırsak, böbrek, prostat gibi farklı organlarda meydana gelebilmekte ve yayılabilmektedir. Bu hastalık genellikle göğüs kitlesi, rektal kanama, şiddetli öksürük, karın ve sırt ağrıları, lenf benzlerinin şişmesi, kanlı balgam ve kilo kaybı şeklinde ortaya çıkabilen farklı semptomatik belirtilerle teşhis edilmektedir (12,13). Bu semptomların yanı sıra kanserin tanı konma ve seyrinin öngörülmesinde kolonoskopi, mamografi, bilgisayarlı tomografi gibi tarama testler ile birlikte biyolojik belirteçlerin kullanımı da yaygın hale

gelmiştir. Biyolojik belirteçler (biyobelirteçler), patojenik ve/ya normal biyolojik sürecin ya da bir tedaviye olan farmakolojik cevabın göstergesi olarak ölçülebilen ve değerlendirilebilen hücresel, biyokimyasal veya biyolojik maddeler olarak tanımlanmaktadır (14). Günümüzde biyobelirteçler kinikte hastalığının tanısının konulmasında, seyrinin öngörülmesinde ve kullanılacak tedavi yönteminin seçilmesinde büyük önem arz etmektedir. Çizelge 2.1.'de klinikte uygulanan en sık kanser biyobelirteçleri yer almaktadır. Örneğin, östrojen (ER), progesteron reseptörleri (PgR), insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER-2) ve Ki-67 dünyade en yaygın kanserlerin biri olan meme kanserin beş alt sınıfının belirlenmesinde ve prognozunun tahmin edilmesinde kullanılmaktadır (15-17). Bu testler meme tümörünün formaline fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) dokularında immünohistokimyasal olarak (İHK) protein seviyesinde değerlendirilmektedir. Buna ek olarakmeme kanserininin 5 ve 10 yıllık sağkalımın ve uygulanacak kemoterapi yönetiminin kararının alınmasında RNA ifade bazlı Oncotype DX (21 gen), Prosigna PAM50 (50 gen) ve MammaPrint (70 gen) gibi genetik test platformları da bulunmaktadır (18-20).

Diğer sık rastlanan ve dünyada ölüm oranı en yüksek olan kanser türü de akciğer kanseridir. Klinik semptomların geç başlaması ve yetersiz tarama yöntemleri nedeniyle akciğer kanseri genellikle ileri aşamalarda tespit edilmektedir (21). Günümüzde klinikte akciğer kanserinin tanısı, takibi ve prognozuna yönelik *serumda CA125, CEA, ProGRP, CYFRA21-1, NSE, SCC* protein seviyeleri immunolojik olarak bakılmaktadır (22). Bunun yanı sıra *EGFR, EML4-ALK, HER-2, KRAS, ROS-1, BRAF, PD-L1* genlerindeki genetik değişikliklerin yeni nesil teknolojiler ile değerlendirilmesi bu tümörlerin daha ayrıntılı sınıflandırmasını ve dolayısıyla da daha uygun tedavi yaklaşımlarının (kemoterapi, hedefe yönelik moleküler tedavi veya immünoterapi) seçilmesini sağlamaktadır (21,23). Ayrıca belirtilmesi gereken diğer bir biyobelirteç tipi de kanda dolaşan tümör hücreleri (CTC, circulating tumor cell) ve hücre dışı DNA'ların (cell free DNA) spesifik sürücü mutasyonları üzerinden hedefe yönelik terapilerin belirlenmesidir. Bu teknoloji halihazırda kullanılmakta olup gelecekte akciğer kanserinin erken tanısında, tedavi cevabının ve nüksetmesinin öngörülmesinde faydalı olabileceği ön görülmektedir (21,24).

Diğer bir kanser türü olan hepatosellüler karsinomanın (HSK) erken teşhisinde son 20 yıldır, en sık kullanılan biyobelirteç - serumda alfa-fetoprotein (AFP) seviyesidir. *AFP* miktarı genellikle doğumdan sonra hızla azalmakta ve yetişkinlik döneminde düşük seviyede

olmaktadır. *AFP* ile birlikte klinikte HSK'nın malignite derecesiyle doğrudan ilişkilendirilen DCP (Des-γ-karboksiprotrombin) seviyesine de bakılmaktadır ve bu iki biyobelirtecin birlikte değerlendirilmesi daha hassas sonuç vermektedir (25,26).

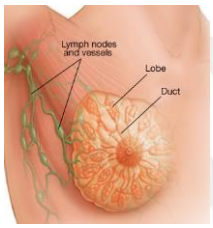
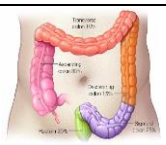
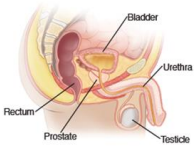
En ölümcül solid malignitelerden biri olan pankreas kanserinin tek tedavisi - radikal cerrahi rezeksiyondur. Ancak hastaların çoğu ileri evrelerde ve metastatik olarak yayıldıktan sonra pankreas kanserine yakalandığını fark eder ve çok azı erken aşamada teşhis edilme ve dolayısıyla da küratif cerrahi rezeksiyonuna girme şansına sahip olabilmektedir. Bu hastalığın tanı ve prognozunda klinik uygulamada rutin olarak kullanılan tek biyobelirteç serumda karbonhidrat antijen 19-9 (CA 19-9) seviyesidir. CA 19-9 artışı genellikle ilerlemiş hastalığın bir işareti olup onu diğer proteinler, örneğin, CEA (karsinoembriyonik antijen) veya MUC5AC ve MUC16 ile birlikte değerlendiren çalışmalar da bulunmaktadır (27,28).

Prostat spesifik antijeni (PSA) ve onun farklı izoformları uzun süredir prostat kanserinin tarama ve tanısında kullanılmaktadır. PSA bir biyobelirteç olarak klinikte uygulanmaya başladıktan sonra prostat kanseri tanısı almış olan hasta sayısı artmış ve vefat eden vaka sayısı azalmış bulunmaktadır (29). Ancak PSA'nın seviyesi sadece prostat kanserine özgü değildir, dolayısıyla 4K Score, PHI gibi platformlar kullanılmaktadır. 4K Score dört kallikrein protein kombinasyonundan oluşmaktadır ve agresif hastalığın öngörülmesinde PSA'ya göre daha doğru sonuç vermektedir. Bunun yanı sıra prostat dokusuna özgü olup kötü huylu tümörün varlığında yüksek oranda ifade edilen kodlamayan bir RNA olan PCA3 (PC antijen 3) de prostat kanserinin teşhisinde sık kullanılmaktadır (29-31).

Tüm jinekolojik maligniteler arasında en yüksek ölüm oranına sahip olan yumurtalık kanseri hastalığın ileri seviyelerine dek semptomsuz ilerlemektedir (32). Günümüzde yumurtalık kanseri teşhisinde ultrason görüntülemesi ile birlikte serumda CA-125 (Kanser Antijeni 125), HE4 (İnsan Epididimal Proteini 4) ve CEA gibi biyobelirteçlerin seviyelerine de bakılmaktadır. Ayrıca ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan Ova1 (5 protein), ROMA (2 protein) ve Overa (5 protein, 2.nesil Ova1) gibi çok değişkenli indeks platformları da kullanılmaktadır. Bu platformlar yukarıda ifade edilen proteinleri de içermektedir ve cerrahi ameliyat öncesi yüksek riskli yumurtalık tümörlerinin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır (32,33).

Bugüne dek yüzden fazla farklı kanser türü bilinmekte olup, bu bölümde en yaygın olan kanserler ve rutin olarak kullanılan biyobelirteçler ifade edilmiştir. Hiçbir biyobelirteç mükemmel değildir ve mükemmel biyobelirteç tanımlama yolundaki çalışmalar süratle devam etmektedir. Bu bağlamda sunulan tez çalışması, en ölümcül kanserlerin biri olan kolorektal kanserin (KRK) teşhis ve prognozuna yönelik biyobelirteçlerin kullanımına dayanmaktadır ve sonraki bölümlerde bu belirteçlerin yer aldığı yolaklar, uygulanacağı teknolojileri ve biyolojik materyalleri detaylı olarak incelenecektir.

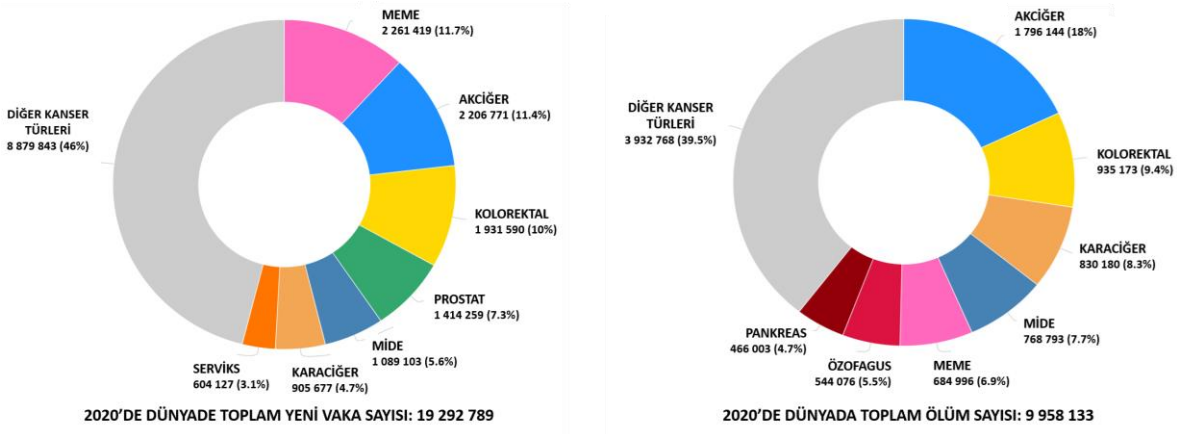
Çizelge 2.1. Klinikte rutin olarak uygulanan kanser biyobelirteçleri (15-38)

| Organ | Kanser türü | Biyobelirteçin hedefi | Örnek türü | Yöntem | Kullanım amacı |
|---|---|---|---|---|---|
|  | **Meme kanseri** | CA15-3, CA27.29 | Kan | ELISA | Tanısal, prognostik |
| | | ER, PgR, HER-2, Ki-67 | FFPE doku | İHK | Prognostik, prediktif |
| | | TOP2A | FFPE doku | FISH | Prognostik |
| | | UPA / PAI-1 | Taze donmuş doku | ELISA | Prognostik |
| | | Oncotype DX assay | FFPE doku | qPCR | Prediktif |
| | | Prosigna PAM50 assay | FFPE doku | qPCR | Prognostik, sınıflandırma |
| | | MammaPrint assay | Taze donmuş, FFPE doku | DNA mikrodizin | Prognostik |
|  | **Akciğer kanseri** | CA125, CEA, ProGRP, CYFRA21-1, NSE, SCC | Kan | ELISA, CLIA, ECLIA | Tanısal, prognostik |
| | | EGFR | Kan, FFPE doku | qPCR, NGS | Prognostik, prediktif |
| | | ALK, EML4-ALK | Kan, FFPE doku | qPCR, NGS, FISH, IHC | Prediktif |
| | | HER-2, KRAS, ROS-1, BRAF, PD-L1 | Kan, FFPE doku | qPCR, NGS, IHC, FISH | Prediktif |
|  | **Karaciğer kanseri** | AFP, AFP-L3 | Kan | EIA, CLIA, qPCR | Tanısal, Prognostik |
| | | DCP | Kan | ELISA | |
| | | CK19, GP3, GP73, OPN, SCCA, Annexin A2 | Kan | ELISA | Tanısal, prognostik |
| | **Pankreas kanser** | CA19-9, CEA | Kan | CLIA, ELISA | Tanısal, prognostik |
| | | ctDNA: KRAS | Kan | dPCR | |
|  | **Kolorektal kanser** | FIT, gFOBT | Dışkı | İHK, smear | Tanısal |
| | | KRAS, BRAF | FFPE doku | qPCR, NGS | Prognostik |
| | | MSI: MLH1, MSH2,MSH6 | FFPE doku | İHK, qPCR | Prognostik |
| | | CEA, DR-70 (FDP) | Kan | ELISA | Prognostik |
| | | Oncotype DX | FFPE doku | qPCR | Prognostik |
|  | **Mesane kanseri** | UroVysion assay | İdrar | FISH | Tanısal |
| | | uCyt+ assay | İdrar | IF | Prognostik |
| | | NMP22 | İdrar | ELISA | Prognostik |
| | **Prostat kanseri** | PHI: p2PSA, fPSA, tPSA | Kan | ELISA | Tanısal |
| | | PCA3 | Biyopsi, idrar | qPCR | Tanısal |
| | | 4K Score assay | Kan, biyopsi | CLIA, IAS | Prognostik |
|  | **Yumurtalık kanseri** | ROMA assay | Kan | EIA, CMIA | Prognostik |
| | | Ova1 assay | Kan | IAS | Tanısal, prognostik |
| | | Overa assay | Kan | CLIA | |
| | | CA125 | Kan | CLIA, CMIA | Tanısal, prognostik |
| | | HE4 | Kan | CLIA, EIA | |
| | | BRCA1 ve 2 | Kan | qPCR, NGS | Tanısal |

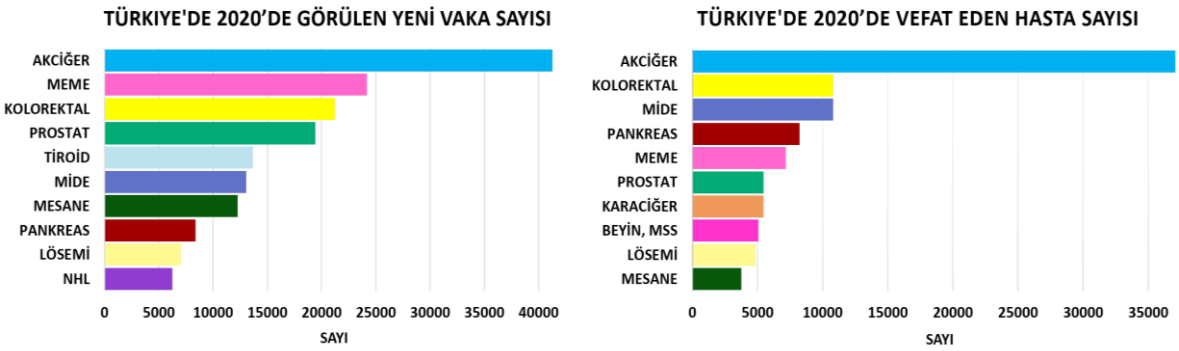
## 2.2. KOLOREKTAL KANSER

### 2.2.1. KOLOREKTAL KANSERİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Kolorektal kanser (KRK) – kalın bağırsağın veya rektumun iç tabakasında oluşan ve zamanla diğer tabakalara ve dokulara yayılmasıyla gelişen kanser türüdür. KRK dünya çapında ve Türkiye'de akciğer ve meme kanserinden sonra en sık görülen üçüncü kanser olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda 2020 yılında Türkiye'de 21191 yeni KRK vakası seyredilirken dünyada bu hastalığa yakalanan bireylerin sayısı yaklaşık 2 milyonu bulmaktadır. Yüksek insidansın yanı sıra kolorektal kanser akciğer kanserinden sonra en ölümcül ikinci kanser türüdür. Global kanser istatistik verilerine göre 2020 yılında 935 bin hasta kolorektal kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir ve bu rakam vefat eden tüm kanser hastalarının %9.4'ünü oluşturmaktadır (şekil 2.2., 2.3., çizelge 2.2.) (1,39). Burada bahsedilmesi gereken Covid-19 salgını sebebiyle Türkiye dahil olmak üzere tüm dünyada 2020 yılında yapılan halk sağlık hizmeti sınırlamalarıdır. Getirilen değişiklikler kapsamında acil olmayan ameliyatlar, rutin taramalar ertelenmiş ve kritik sağlık sorununu olanlar önceliğe alınmış durumdadır. Dolayısıyla da yeni kanser vakalarında önemli azalış seyredilmekte ve bu verilen rakamların gerçek hikayeyi yansıtmadığı ve gelecekte kansere bağlı ölümlerin artışı gözlemleneceği öngörülmektedir (40,41).




Şekil 2.2. Globocan 2020: dünyade 2020 yılında görülen yeni kanser vaka ve vefat hasta hikayesi (her iki cinsiyet, tüm yaşlar) (1)




Şekil 2.3. 2020 yılı Türkiye kanser verileri (her iki cinsiyet, tüm yaşlar) (1)

Çizelge 2.2. 2020'de Türkiye ve dünyada görülen yeni kanser vaka ve vefat eden hasta sayısı (her iki cinsiyet, tüm yaşlar) (1)

| Kanser türü | Yeni vaka sayısı | | Vefat eden sayısı | |
|---|---|---|---|---|
| | Dünya | Türkiye | Dünya | Türkiye |
| Akciğer | 2206771 | 41264 | 1796144 | 37070 |
| Meme | 2261419 | 24175 | 684996 | 7161 |
| Kolorektal | 1931590 | 21191 | 935173 | 10798 |
| Prostat | 1414259 | 19444 | 375304 | 5464 |
| Mide | 1089103 | 13075 | 768793 | 10789 |
| Karaciğer | 905677 | 5649 | 830180 | 5461 |
| Serviks | 604127 | 2 532 | 341831 | 1 245 |
| Özofagus | 604100 | 1 405 | 544076 | 1 338 |
| Tiroid | 586202 | 13682 | 43646 | 795 |
| Mesane | 573278 | 12248 | 212536 | 3771 |
| Hodgkin olmayan lenfoma | 544352 | 6237 | 259793 | 3067 |
| Pankreas | 495773 | 8392 | 466003 | 8214 |
| Lösemi | 474519 | 7023 | 311594 | 4831 |
| Böbrek | 431288 | 5125 | 179368 | 1965 |
| Uterus gövdesi | 417367 | 5918 | 97370 | 1589 |
| Diğer kanser türleri | 4752964 | 32605 | 2111326 | 18232 |

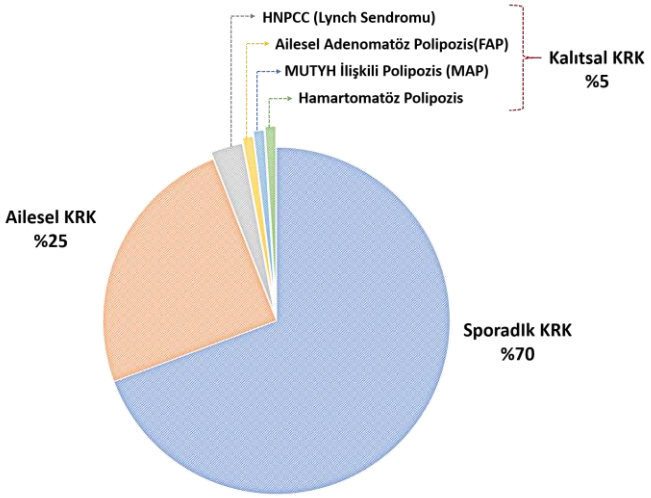
Kolorektal kanseri hem insidansı hem de mortalitesi açısından kadınlarda erkeklere göre daha az gözlenmektedir (1). KRK genç yaşlarda da görülmekle birlikte 50 yaş üzeri bireylerde daha sık gözlemlenmektedir. Kolon kanserinin teşhis anındaki ortalama yaş erkeklerde 68 ve kadınlarda 72 olup, rektal kanseri için bu rakam her iki cinsiyet için de 63'dür (42). Bu hastalık özellikle ABD, Asya kıtası ülkeleri olan: Çin, Japonya, Kore, Türkiye'de ve Avrupa'da ise Rusya, Almanya, İtalya, Fransa, Birleşik Krallık ve İspanya'da yaygın olarak gözlenmektedir. Diğer yandan kolorektal kanserin görülme sıklığındaki artışın İGG (İnsani Gelişme Göstergesi) ile aynı eğilimde olduğu bildirilmektedir. İnsanların hayat

kalitesinin artışı ile birlikte beslenme tarzlarının değişmesi ve daha az hareketli yaşama yönelmeleri buna neden olabilmektedir (1).

### 2.2.2. KOLOREKTAL KANSERİN ETİYOLOJİSİ VE RİSK FAKTÖRLERİ

Kolorektal kanser, gelişimi çevresel ve genetik faktörler tarafından belirlenen heterojen bir hastalıktır. Bu hastalık onkojenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin susturulması ve DNA tamirinden sorumlu genlerin bozuklukları eşliğinde adım adım normal dokunun karsinomaya dönüşmesi ile ortaya çıkmaktadır. Kolorektal kanser vakaları gelişiminin kökenine bağlı olarak üçe ayrılmaktadır: sporadik, ailesel ve kalıtımsal.

Kalıtımsal KRK tüm kolorektal kanser vakaların yaklaşık %5'ni oluşturmaktadır ve bu kategoriye herediter non-polipozis kolorektal kanser (HNPCC, Lynch sendromu), ailesel adenomatöz polipozis (FAP), MUTYH ilişkili polipozis (MAP) ve hamartomatöz polipozis dahil olmaktadır (şekil 2.4.). HNPCC DNA tamir mekanizması (MMR) ekibine dahil ve genom stabilitesini korumaya yardımcı olan *MLH1, MLH2, MSH6, PMS2* genlerinin germline mutasyonu sonucu ortaya çıkan kalıtsal otozomal dominant hastalıktır (43). Ailesel adenomatöz polipozis WNT sinyal yolağında görev gören tümör süpressor geni olan *APC* mutasyonundan kaynaklanmaktadır. FAP hastalarında ergenlik döneminden itibaren çok sayıda sonradan kötü huyluya dönüşen adenomlar oluşmaktadır. Baz eksizyon onarım mekanizmasının parçası olan *MUTYH* genindeki biallelik mutasyon ise MAP'a yol açmaktadır (44).




Şekil 2.4. Kolorektal kanser vaka sınıflandırılması

Kalıtsal KRK vakalarında onkojenez sürecini başlatıp hastalığın gelişimini büyük ölçüde etkileyen ve aileden aktarılan belirli gen mutasyonları bulunmaktadır. Bundan farklı olarak ailesel KRK vakalarında bahsi geçen gen bozuklukları gözlemlenmemektedir, fakat aile üyelerinde kanser sıklığı genel popülasyonda görülen ile kıyasla daha yüksektir. Kolorektal kanserinin yaklaşık % 25'i ailesel KRK'dır. Ailesel KRK'da hastalığın kesin nedeni bilinmemekle birlikte genellikle çevre koşulları, yaşam tarzı, epigenetik ve genetik değişikliklerin kombinasyonu belirli ailenin bu hastalığa daha yatkın hale gelmesine neden olmaktadır (44).

Bu bağlamda KRK'nın büyük çoğunluğunu - yaklaşık %75'ini sporadik kolorektal kanser oluşturmaktadır. Bu hastalarda herhangi bir tanımlanabilir kalıtsal bozukluk veya ailesel öykü gözlenmemekte ve hastalığın genellikle çevresel faktörler, yaşam ve beslenme tarzından kaynaklı olarak bireyin hayatı sürecinde zamanla biriken somatik mutasyonlar nedeniyle geliştiği düşünülmektedir (45).

Kolorektal kanserin gelişmi yukarıda belirttiğimiz gibi farklı faktörlerin etkisi tarafından tetiklenmektedir. Genel olarak bu **risk faktörleri** aşağıda sıralanmaktadır (46-48):

- Kalitsal genetik bozukluklar
- Aile KRK hikayesi
- Irk ve etnik geçmiş
- Yaş ve cins
- Enflamatuar barsak hastalığı: Crohn hastalığı ve ülseratif kolit
- Tip 2 diyabet hastlığı
- Düşük fiziksel aktivite ve obezite
- Belirli beslenme tarzı: kırmızı et tüketimi, alkol ve sigara kullanımı

Kolorektal kanserin en yüksek risk faktörlerinden biri önceden de bahsettiğimiz kalıtsal genetik bozukluklardır (kalıtsal KRK). Bunun yanı sıra aile öyküsü, aile bireylerinde özellikle birinci derece akrabalarda kolorektal kanser geçmişinin olması KRK yakalanma riskini iki kat artırmaktadır (46).

Sporadik olarak gelişen durumlar için yaş, cins, bireyin ırk ve etnik kökeni önem arz edebilmektedir. Bu bağlamda kolorektal kanser erkeklerde kadınlarla kıyasla 1.5 kat fazla görülmektedir, ancak kadınlarda agresif sağ kolon kanseri daha sık gözlenmektedir (48).

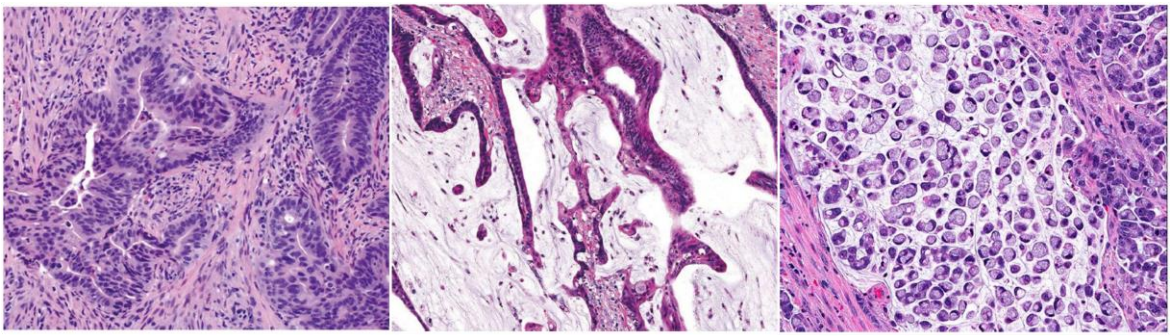
Kolorektal kansere yakalanma riski 50 yaş sonrası yüksek hızla artmaktadır ve vakaların %90'ını 50 yaş üzeri bireyler oluşturmaktadır. Bu nedenle kolorektal kansere yaşlılık hastalığı da denir ve Türkiye dahil olmak üzere birçok ülkede 50 yaş sonrası kolorektal kanser tarama testleri yapılmaktadır (49).

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi uzun süre kolonda iltihaplanma görülen kronik inflamatuar bağırsak hastalığı olan bireylerin kolorektal kanser geliştirme riski iki kat artmaktadır. Barsaktaki iltihaplanma büyük ölçüde metabolik serbest radikallerin ve sitokinlerin salımına neden olarak karsinogenez sürecine katkıda bulunmaktadır (42,46).

Aşırı kilo sahibi olmak, düşük fiziksel aktivite, beslenme alışkanlığı – bunların hepsi KRK olasılığını artıran çevresel faktörlerdir. Fiziksel olarak aktif olan bireylerin kolorektal kanser geliştirme olasılığının %25 daha az olduğu düşünülmektedir. Buna paralel olarak fiziksel tembellik barsak mikroflorasını değiştiren ve kolonun epitelini tahriş eden obezite ile sonuçlanmakta ve böylelikte onkojenez sürecini teşvik etmektedir. Bireylerin beslenme tarzı kolorektal kanserin ortaya çıkmasını olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Kırmızı ve özellikle bol işlenmiş, yüksek sıcaklıkta pişirilmiş etlerin, hayvansal yağların KRK'nın yanı sıra diğer gastro-intestinal kanserlerin de ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Düzenli sigara içilmesi tütün dumanındaki mutajenlerden kaynaklı olarak KRK geliştirme riskini %18, alkol ise %20 artırmaktadır. Diğer taraftan lif, D Vitamini, kalsiyum, sebze ve meyve tüketimimi bu hastalığa karşı muhtemel koruyucu etki sergilemektedir (47,48).

### 2.2.3. KOLOREKTAL KANSERİN HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRILMASI

Kolorektal kanserin %90'ını kolon ve rektum mukozasının epitel hücrelerinden kaynaklanan adenokarsinomlar oluşturmaktadır. Bu adenokarsinomların büyük çoğunluğu glandüler yapıya sahip olan konvansiyonel adenokarsinomlardır, ancak bunun yanısıra daha az görülen müsinöz ve taşlı yüzük hücreli adenokarsinom varyantları da bulunmaktadır (şekil 2.5.) (50). Müsinöz adenokarsinom kanser hücrelerinin daha hızlı yayılmasını sağlayan hücre dışı müsinden (en az %50 oranda) ibarettir ve KRK vakalarının %10-15'ini oluşturmaktadır. Taşlı yüzük hücreli adenokarsinom isminden belli olduğu üzere müsin vakuolünü içeren taşlı yüzük hücre görünümüne sahiptir. Oldukça agresif ve kötü prognoza sahip olan bu alt türün görülme sıklığı %1'in altındadır (51).




Şekil 2.5. Kolorektal kanserin en yaygın grubu olan adenokarsinomların patolojik görüntüsü (50)

Kolorektal kanserin gelişimi kolon veya rektumun duvarlarında oluşan küçük şişkinlikler – poliplerin meydana gelmesiyle başlamaktadır. Bu poliplerin çoğu iyi huylu olmakla beraber sadece %10'u kanserin ilerlemesine neden olmaktadır (52). Kolorektal kanserin saptanması ve karakterizasyonu için öncelikle kolonoskopi ile tarama yapılıp şüpheli poliplerden biyopsi örneği alınmakta ve boyanmaktadır. Boyanan doku kesitleri KRK sınıflandırmasının altın standartı olan TNM evreleme yöntemi ile değerlendirilmektedir. TNM evre sınıflandırması hastalık durumunun, gidişatının ve uygulanacak tedavi stratejisinin belirlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Patolojik evreleme KRK gelişiminin önemli prognostik belirtecidir. Bu bağlamda evre I KRK hastalarının 5 yıllık hayatta kalma oranı %74 iken evre IV'de bu oran %5'e inmektedir (53).

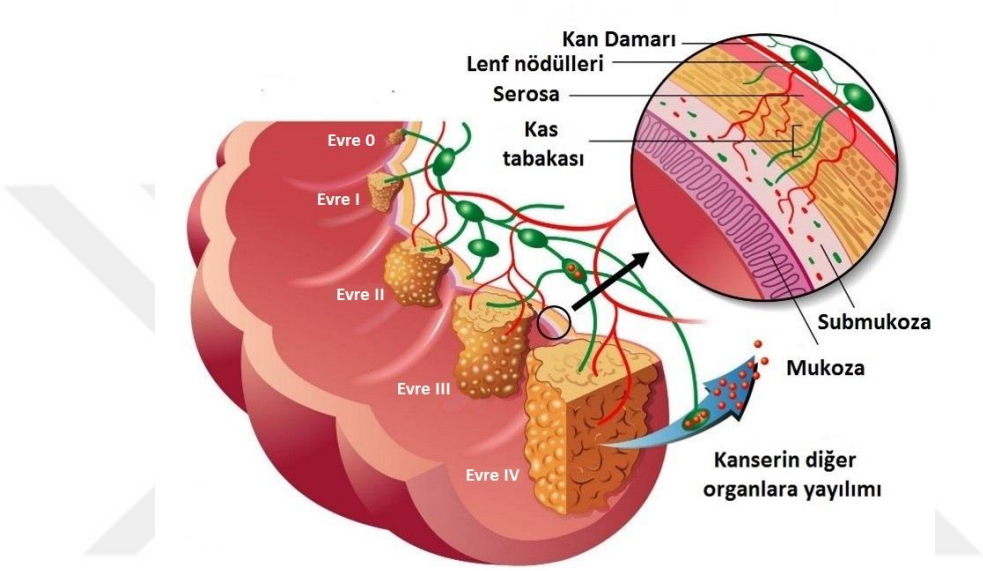
Burada:

- T: Tümör – birincil tümörün boyutunu ve hangi katmanlara yayıldığını,
- N: Lenf nodu – tümörün lokal lenf nodu tutulumunu,
- M: Metastaz – primer tümörün uzak bölgelere yayılımı belirlemek için kullanılmaktadır (54).

Bu bağlamda TNM evrelemesine göre kolorektal kanser aşağıdaki evrelere ayrılmaktadır (şekil 2.6.) (55):

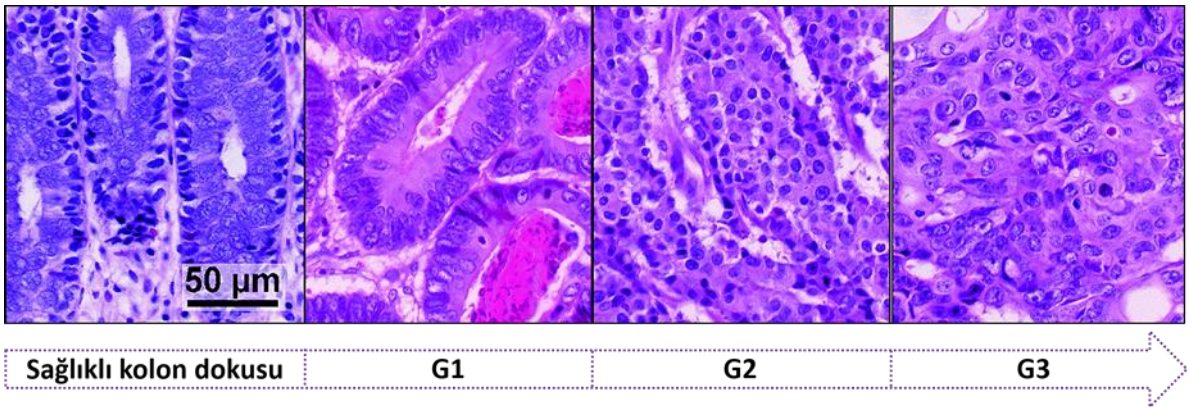
- **Evre 0:** Tis, N0, M0 – İn situ kanser. KRK gelişminin ilk adımı – tümör sadece mukozada bulunmaktadır.
- **Evre I:** T1-T2, N0, M0 – Lokalize kanser. Tümör mukozadan submukozaya doğru büyümüştür.

- **Evre II:** T2-T4, N0, M0 – Lokal olarak ilerlemiş kanser, erken evreler. Kanser, kolon veya rektumun en dış katmanlarına doğru büyümüş ve onu aşmıştır, ancak diğer yakın dokulara veya organlara yayılmamıştır.
- **Evre III:** T1-T4, N1-N3, M0 – Lokal olarak ilerlemiş kanser, ileri evreler. Kanser lenf düğümlerine yayılmıştır, ancak henüz vücudun diğer bölgelerine sıçramamıştır.
- **Evre IV:** T1-T4, N1-N3, M1 – Metastatik kanser. Kanser kolon dışı organ ve dokulara: karaciğer, akciğerler, beyin, periton vb. yayılmıştır




Şekil 2.6. Kolon tabakası ve KRK evrelendirmesi (56)

Diğer histolojik değerlendirme yöntemi ise hücrelerin farklılaşma oranlarına bağlı olarak iyiden kötüye doğru diferansiyasyon derecelemesidir. Bu histolojik veriler bireyin hayatta kalımını doğrudan etkilemektedir. KRK dereceleme sistemi (grade) hastaları tümör hücrelerinin kolon mukozasına benzerlik oranına göre iyi diferansiye (Grade 1, G1), orta diferansiye (Grade 2, G2) ve kötü diferansiye (Grade 3, G3) olarak üçe ayırmaktadır. Klinikte çoğunlukla orta derecede diferansiye (%70) KRK vakaları görülmektedir, iyi ve kötü diferansiye karsinomlar daha az gözlenebilmektedir (sırasıyla %10 ve %20) (50).

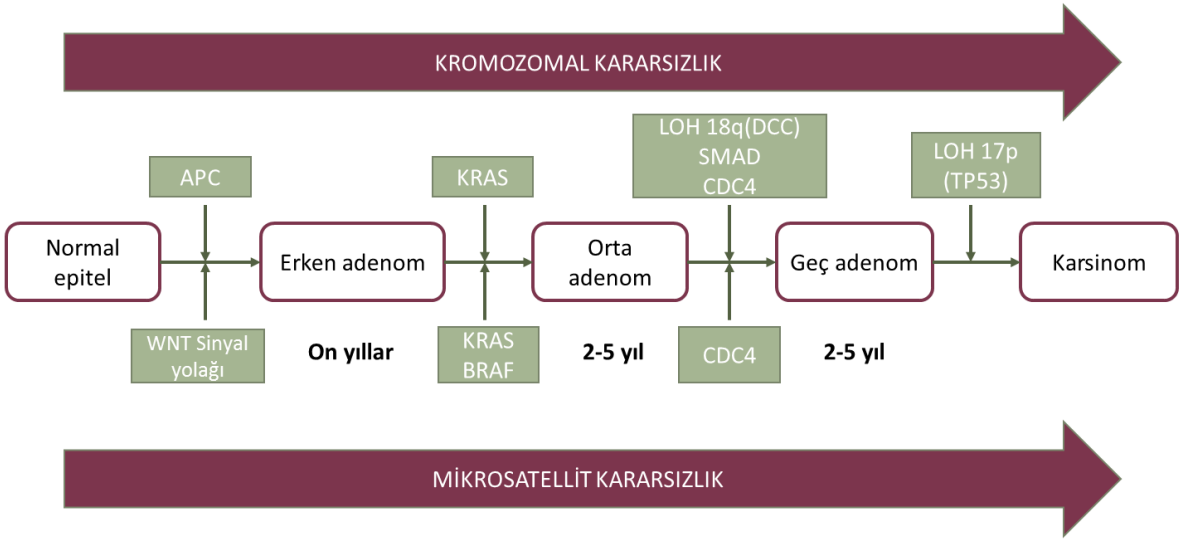



Şekil 2.7. Kolon dokusunun iyi diferansiyasyondan az diferansiyasyona doğru geçişi: normal-grade 1- grade 2- grade 3 (54)

### 2.2.4. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER TEMELİ

KRK'nın temelinde yatan moleküler değişiklikler bağırsak ve rektumun epitel hücrelerinin tümöre dönüşümünden sorumludur ve bu işlem birkaç basamaktan oluşmaktadır. Normal kolorektal epitelinin adenoma geçişinin ilk adımı APC genindeki mutasyondur. Oluşan adenomun karsinoma transformasyonu üç yol ile gerçekleştirilebilmektedir (şekil 2.8.):

- Kromozomal kararsızlık (CIN)
- Mikrosatellit kararsızlığı (MSI)
- CpG adacıklarının metilasyonu (CIMP)




Şekil 2.8. Adenomun karsinoma dönüşüm mekanizması (57)

#### 2.2.4.1. Kromozomal İnstabilite

Adenomun karsinoma dönüşümünün yaklaşık %85'ini kromozomal instabilite yolağı oluşturmaktadır. Kromozomlar boyunca meydana gelen büyük delesyon ve insersiyonlar kromozomun yeniden düzenlenmesine, proto-onkojenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonların oluşumuna ve heterozigotluk kaybına yol açmaktadır ve sonuçta kromozom kararsızlığına neden olmaktadır (58). Şekil 2.8.'de görüldüğü üzere kromozomal instabilite yolağında *APC* geninin inaktivasyonu sonrası gelişen adenom, *KRAS* proto-onkojeninde meydana gelen mutasyon ile adenomatöz sürecini desteklemektedir. Ardından da *SMAD2*, *DCC* ve *SMAD4* gibi tümör baskılayıcı genlerini içeren 18 kromozomun q kolunun kaybı orta adenomun geç adenoma dönüşümünü sağlamaktadır. Bu yolağın son ve belirleyici basamağı ise 17. kromozomun kısa kolunun delesyonu ve özellikle de o konumda yer alan *TP53* geninin kaybıdır (57).

CIN yolağının ilk adımı olan *APC* çok işlevli tümör baskılayıcı gendir ve Wnt / β-katenin sinyal yolunun degradasyonunda görev görmektedir. *APC* geninin mutasyona uğraması Wnt/β-katenin sinyal mekanizmasının aktivasyonuna ve sitoplazmada β-katenin birikimine ve dolayısıyla kontrolsüz hücre çoğalmasına, invazyonuna ve metastazına neden olmaktadır. KRK hastalarının yaklaşık % 90'ında *APC* mutasyonu veya kaybı görülmektedir (59). CIN mekanizmasının ikinci en önemli yolağı *KRAS* gen mutasyonudur. Bu mutasyon sonucu *KRAS* işlev kazanmakta ve MAPK yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır. Neticede birkaç transkripsiyon faktörü düzenli olarak etkin hale gelmekte, bu da hücrelerin büyümesine, hücre döngüsünün ilerlemesine ve farklılaşmasına sebep olmaktadır. *KRAS* onkojeninin aktivasyonu KRK vakalarının % 35-45'inde gözlenmektedir (45).

Onkojenez sürecinin diğer adımı 18q bölgesinin delesyonu sonucu oluşan heterozigotluk kaybıdır (LOH). 18q LOH ileri KRK vakalarının %70'de tanımlanmış olup kötü prognozun göstergesi sayılmaktadır. Bu lokusta tümör baskılayıcı *DCC* ve SMAD ailesi (*SMAD2* ve *4*) genleri konumlanmıştır. SMAD aile üyelerinin ekspresyon kaybı TGF-β yolunu etkilediği ve tümör oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. CIN yolağı ile ilişkili diğer önemli onkojenik mekanizma – genom koruyucusu olarak da bilinen *TP53* geninin kaybıdır. *TP53* 17. kromozomun kısa kolunda yer almaktadır ve hücre döngüsü, yaşlanma, DNA onarımı ve apoptoz gibi farklı süreçleri yönetmektedir. *TP53* geninin ekspresyon kaybı kontrolsüz hücre

döngüsü ve proliferasyonuna yol açmaktadır ve bu sebeple hastalığın ilerlemesinde kritik öneme sahiptir. Bu yolaktaki hasara KRK vakalarının %50-75'inde rastlanmaktadır (60).

#### 2.2.4.2. Mikrosatellit İnstabilitesi

Diğer genomik kararsızlık türü olan mikrosatellit instabilite (MSI) Lynch sendromunun (HNPCC) %95'inde ve sporadik kolorektal kanser vakalarının %15'de rastlanmaktadır (61). Mikrosatellitler – 1-6 baz çifti uzunluğunda olan ve genom boyunca yayılan tekrar eden DNA bölgeleridir. Mikrosatellit kararsızlığı DNA tamir mekanizmasında (MMR) görev gören proteinlerin (*MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2)* işlev bozukluğu sonucu ortaya çıkmaktadır. MMR genleri replikasyon sırasında oluşan küçük hataların giderilmesini ve genom stabilitesinin korunmasını sağlamaktadır. Nokta mutasyonu veya promotor bölge metilasyonu sonucu inaktif hale gelen MMR proteinleri genomda yoğun mutasyon birikimine ve farklı uzunluktaki mikrosatellit allellerin oluşuma neden olmaktadır (62). Bireylerin MSI durumu beş mikrosatellit belirtecinden oluşan panel üzerinden değerlendirilerek kararsız bulunan lokus sayısına bağlı olarak üçe ayrılmaktadır:

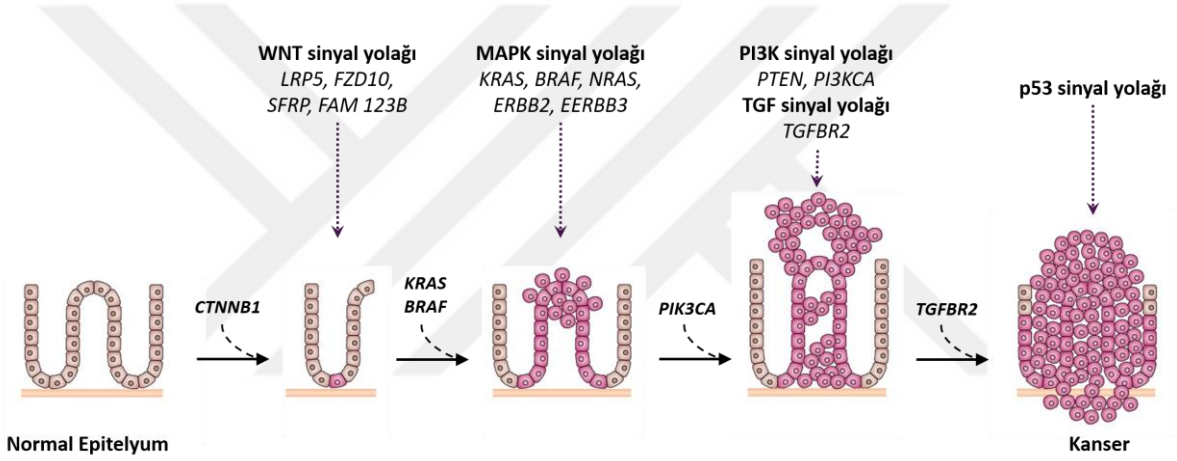
- Yüksek mikrosatellit kararsızlığı (MSI-H),
- Düşük mikrosatellit kararsızlığı (MSI-L),
- Stabil mikrosatellit (MSS) (59).

MSI-H bireylerde kanserin gelişimi *MLH1* geninin epigenetik olarak susturulması veya MMR proteinlerinin germline nokta mutasyonu (Lynch sendromu) ile ilerlemektedir ve bu hastalarda çoğunlukla *APC* ve *BRAF* gen bozuklukları da görülmektedir. Diğer taraftan MSS ve MSI-L tümörlerin ortaya çıkışının genellikle kromozomal kararsızlık yolağı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. MSI kolorektal kanserin prognoz ve adjuvan tedavisini belirleyen önemli moleküler belirtecidir. **Bu bağlamda MSI-H varlığı hastalığın iyi prognozu ile ilişkili iken MSI-L ve MSS kötü sağkalım ile bağdaştırılmaktadır**. Ayrıca MSI-H erken evre, müsinöz kökenli ve sağ kolonda yer alan KRK vakaları ile de ilişkili bulunmuştur (63).

#### 2.2.4.3. CpG Ada Metilasyonu

Karsinojenez sürecinin diğer önemli yolağı – CpG bölgelerinin hiper- ve hipometilasyonudur (CIMP) (57). CpG adacıkları ortalama 1000 baz çift uzunluğunda olan GC açısından zengin ve ağırlıklı olarak metillenmemiş bölgelerdir. CpG bölgeleri,

çoğunlukla genlerin 5’ üstü ucunda bulunmaktadır ve transkripsiyon faktörlerin bağlanması ve kromatin yapısının değişikliği üzerinden transkripsiyon sürecini yönetmektedir (64). Bu bağlamda promotor bölgelerindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına neden olurken promotor dışı gen bölgelerindeki CpG hipometilasyonu tam tersi – onkogenlerin işlev kazanımına ve genomik kararsızlığa sebep olmaktadır (65). Metilasyon örüntüsünün değişimi WNT, MAPK, P53, TGFβ ve reseptör tirozin kinazlar dahil olmak üzere transkripsiyon regülasyonu, hücre döngüsü, apoptoz, DNA kararlılığı, hücre invazyonu ve metastazından görevli olan neredeyse tüm sinyal yolaklarını etkilemektedir (şekil 2.9.) (60). Belirtilen sinyal yolakları tümörigenezi destekleyen *CTNNB1, KRAS, BRAF, SMAD4, TGFBR2, TP53, PIK3CA, FAM123B* ve *ERBB2* gen bozukluklarını içermektedir (66).




Şekil 2.9. CpG adacıklarının metilasyonu ve sporadik mikrosatellit instabilite yolağı (66)

CpG adacıklarının metilasyonu, KRK vakalarının yaklaşık %15’de tanımlanmış olup **kötü prognozun belirtisi** sayılmaktadır (67). CpG adacıklarının metilatör fenotipi (CIMP) DNA metilasyon seviyesine bağlı olarak CIMP-yüksek (CIMP-H), CIMP-düşük (CIMP-L) ve non-CIMP alt tiplerine ayrılmaktadır. CIMP-H KRK yüksek genom hipermetilasyon frekansı sergilemektedir ve doğrudan *MLH1* geninin promotor bölge metilasyonu ve *BRAF* V600E mutasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Diğer taraftan CIMP-L kolorektal kanseri *KRAS* ve stabil mikrosatellit (MSS) ile bağdaştırılmıştır (68). Bu bağlamda CpG adacıklarının metilasyonu MSI yolağı ile kesişmektedir ve adenomun karsinoma dönüşümünden sorumlu olan diğer iki yoldan farklı olarak daha karmaşık ve mekanizması tam olarak açığa çıkarılamamıştır.

Diğer tüm kanser türlerinde olduğu gibi KRK'da da hastalığın moleküler mekanizmalarının aydınlatılması heterojen yapıdaki bu hastalığın alt gruplarının tespitinde, alt grupları "barkodlayan" genlerin tanımlanarak daha sonraki aşamada bu genlerin diagnostik, prognostik ve/veya terapötik biyobelirteçler olarak araştırılmasını mümkün kılmaktadır. Bu çerçevede bugüne kadar KRK için belirlenmiş biyobelirteçleri özetlemeye çalışacağız.

## 2.3. KOLOREKTAL KANSERDE MOLEKÜLER BELİRTEÇLER

Kolorektal kanserin teşhisi ve prognozunda kullanılan biyobelirteçler kan, serum, dışkı ve idrar gibi invaziv olmayan ve dolayısıyla da hastaya acı çektirmeyen yollarla ya da kolonoskopi ve cerrahi rezeksiyon sonucu invaziv yöntemlerle alınan dokularda belirlenebilmektedir. Bu belirteçleri DNA, mRNA veya protein olmak üzere üç ana kategoriye ayırmak mümkündür.

### 2.3.1. PROTEİN BELİRTEÇLERİ

Kolorektal kanserin teşhisinde kullanılan ilk biyobelirteç - 1965 yılında tanımlanan kanda karsinoembriyonik antijen (CEA) seviyesidir. CEA - membran-ilişkili yüksek moleküler ağırlıklı glikoproteindir ve kanser hücreleriyle birlikte embriyonik dokularda yüksek bulunmaktadır. CEA klinikte kolorektal kanserin nüksünün öngürülmesinde halen uygulanan belirteç olmakla birlikte bu proteinin ekspresyonu meme ve akciğer kanserlerinde de yüksek olabilmektedir (69). 1980'lerde diğer KRK belirteci CA19-9 geliştirilmiş olup, bu protein hastalığının nüksü ve kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir. CA19-9 proteini CEA'ya göre daha düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir ve pankreas kanserinin tespitinde daha iyi sonuç sergilemektedir (70). Bu bağlamda kanda KRK protein belirteçlerinin tespitine yönelik çalışmalar süratle devam etmekte olup yapılan araştırmalar arasında TFF3 (trefoil faktör 3), CA11-19, Cyr61 (sistein zengin anjiyojenik indükleyici 61), B6 integrin ve IGFBP2 (insülin benzeri büyüme faktör bağlayıcı protein 2) umut vaat eden protein biyobelirteçlerdir(71).

Dışkı bazlı protein belirteçlerin arasında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan ve son on yıllardır kolorektal kanserin taramasında uygulanan guaiac bazlı gizli kan (gFOBT) ve fekal immünokimyasal testlerini (FIT) saymak mümkündür. gFOBT gastrointestenal lezyonlar sonucu oluşan kanamayı peroksidaz reaksiyonu yoluyla dışkıda

saptamaktadır. Bu belirteç yeterince hassas (%30-40) ve özgül olmasa bile birçok insan hayatını kurtararak kolorektal kanser mortalite oranını önemli ölçüde azaltmıştır (70). gFOBT sonucu, diyet ve ilaç dahil olmak üzere birçok faktörler tarafından etkilenmektedir ve bu nedenle ileri çalışmalarda dışkı immünokimyasal testi (FIT) geliştirilmiştir. Dışkı immünokimyasal testi hemoglobini insan globin proteinine spesifik olan mono- veya poliklonal antikorlar aracılığıyla saptamaktadır ve hem nitel hem de miktar bilgisini vermektedir. Bu analiz %66-74 oranında duyarlılık ve %84-95 arasında değişen özgüllükle KRK ve progresif adenomları saptayabilmektedir (71). FIT düzenli olarak aspirin alan kişilerde ve özellikle sol kolonda oluşan lezyonlara yönelik çok daha hassas sonuçlar sergilediği için sağ kolon kanser insidansının artışına sebep olduğu düşünülmektedir (72). Diğer iyi çalışılmış dışkı bazlı protein belirteçlerinin arasında MMP9 (Matriks-metaloproteinaz 9) ve PKM2 (Piruvat Kinaz M2) ön plana çıkmaktadır. PKM2 kolorektal kanserde ifadesi yüksek bulunan hücre metabolizmasında önemli göreve sahip glikolitik enzimdir (73). MMP9 ise tümör, mezenkimal ve enflamatuar hücreleri tarafından salgılanan, KRK'da kötü prognozla ilişkilendirilen endopeptidazdır (74).

Çizelge 2.3. Kolorektal kanserde uygulanan protein bazlı belirteçler (69-73,75)

| Belirteç adı | Biyolojik materyal | Yöntem | Amaç |
|---|---|---|---|
| MMR: MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 | FFPE | IHC | Tanısal, prognostik |
| PTEN | FFPE | IHC | Prognostik |
| SMAD4 | FFPE | IHC | Prognostik |
| Sİtokeratinler: CK7, CK17, CK20 | FFPE | IHC | Tanısal |
| CDX2 | FFPE | IHC | Tanısal |
| β-Catenin | FFPE | IHC | Tanısal |
| Cadherin 17 | FFPE | IHC | Tanısal |
| GPA33 (A33) | FFPE | IHC | Tanısal |
| Gaitada gizli kan testi (gFOBT) | Dışkı | Smear | Tanısal |
| Fekal immünokimyasal testi (FIT) | Dışkı | ELISA, ICA | Tanısal |
| PKM2, MMP 9 | Dışkı | ELISA | Tanısal |
| CEA, CA19-9 | Kan | ELISA | Tanısal, prognostik |
| CA11-19 | Kan | ELISA | Tanısal |
| IGFBP-2 | Kan | RIA | Tanısal |
| Cyr61, B6-integrin, TFF3, RBP4, THBS2 | Kan | ELISA | Tanısal |
| Sitokinler: IL-6, IL-8 | Kan | ELISA | Tanısal |

İnvaziv yöntemlerle alınan doku bazlı belirteçlerden PTEN – hücrenin hayatta kalımı ile ilişkili PI3K-AKT sinyal yolağını düzenleyen tümör baskılayıcı gendir. Bu genin ekspresyon kaybı hastalığın kötü prognozunun göstergesidir (76). Diğer bir tümör süpresör geni olan SMAD4'in inaktivasyonu ise tümör invazyonuna ve metastazına sebep olmaktadır (şekil

2.10.) (72). Bu iki proteine immünohistokimyasal olarak bakılmanın yanı sıra DNA bazında da değerlendirilmektedir, bu nedenle de sonraki bölümde detaylı olarak incelenecektir. Ayrıca doku bazlı immünohistokimyasal belirteçlerin arasında Cadherin-17, CDX2, β-katenin, GPA33 ve sitokinleri saymak mümkündür. Hücre-hücre adezyonunda görev gören kalsiyum bağımlı transmembran glikoprotein olan Cadherin 17'nin gastrointestinal adenokarsinomlarının teşhisinde yararlı olabileceği söylenmektedir. Bu belirtecin primer kolorektal kanserlerin %96-100'de, metastatik KRK'nın ise %100'de ifade edildiği bildirilmiştir. Epitel dokusunun intrasitoplazmik yapısal proteinleri olan sitokeratinler CK7 ve CK20'nin ise metastatik adenokarsinomun tanımlanmasında rutin olarak kullanıldığı bilinmektedir (72). β-katenin, hem hücre adezyonunda hem de WNT sinyal yolağının aktivasyonunda yer alan çok işlevli proteindir. WNT sinyal yolağı APC geni mutasyonu ya da β-kateninin yüksek ekspresyonu sonucu işlevsel hale gelmekte ve tümörün ilerlemesini ve metastazı teşvik etmektedir. Nükleer-β-katenin KRK tanısında yararlı olabilecek ve immünohistokimyasal olarak incelenebilen belirteçtir (70). Kolorektal kanserin tanı ve prognozunda uygulanan protein bazlı belirteçlerin listesi çizelge 2.3.'de verilmektedir.

### 2.3.2. DNA BELİRTEÇLERİ

Teknoloji gelişimiyle birlikte karsinojenez sürecinin altında yatan mekanizmalar açığa çıkarılmaya başlamış ve bu da biyobelirteç keşif sahasında yapılan çalışmaların proteinden daha çok DNA ve çeşitli RNA türlerine yönelik odaklanmasına sebep olmuştur. Bu bağlamda çizelge 2.4.'de DNA mutasyon ve metilasyon bazlı kolorektal kanser biyobelirteçleri yer almaktadır.

**Mikrosatellit instabilite (MSI)** kolorektal kanser gelişiminin önemli yolaklarından biri olmakla birlikte DNA tamir mekanizması (MMR) genleri olan *MLH1, MSH2, MSH6* ve *PMS2*'deki genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır. MMR genlerinin germline mutasyonu kalıtsal KRK'ne (Lynch Sendromu) yol açarken sporadik vakalarda somatik mutasyondan daha çok *MLH1* hipermetilasyonuna bağlı inaktivasyon gözlemlenmektedir. Günümüzde hastaların MSI durumunu tespit etmek için klinikte 5 belirteçten oluşan panel (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250) kullanılmaktadır (çizelge 2.4.). Bu panel yardımı ile tümör ve normal dokular karşılaştırılarak mikrosatellit uyuşmasızlık oranına bağlı olarak vakalar yüksek, düşük ve stabil olarak üçe ayrılmaktadır

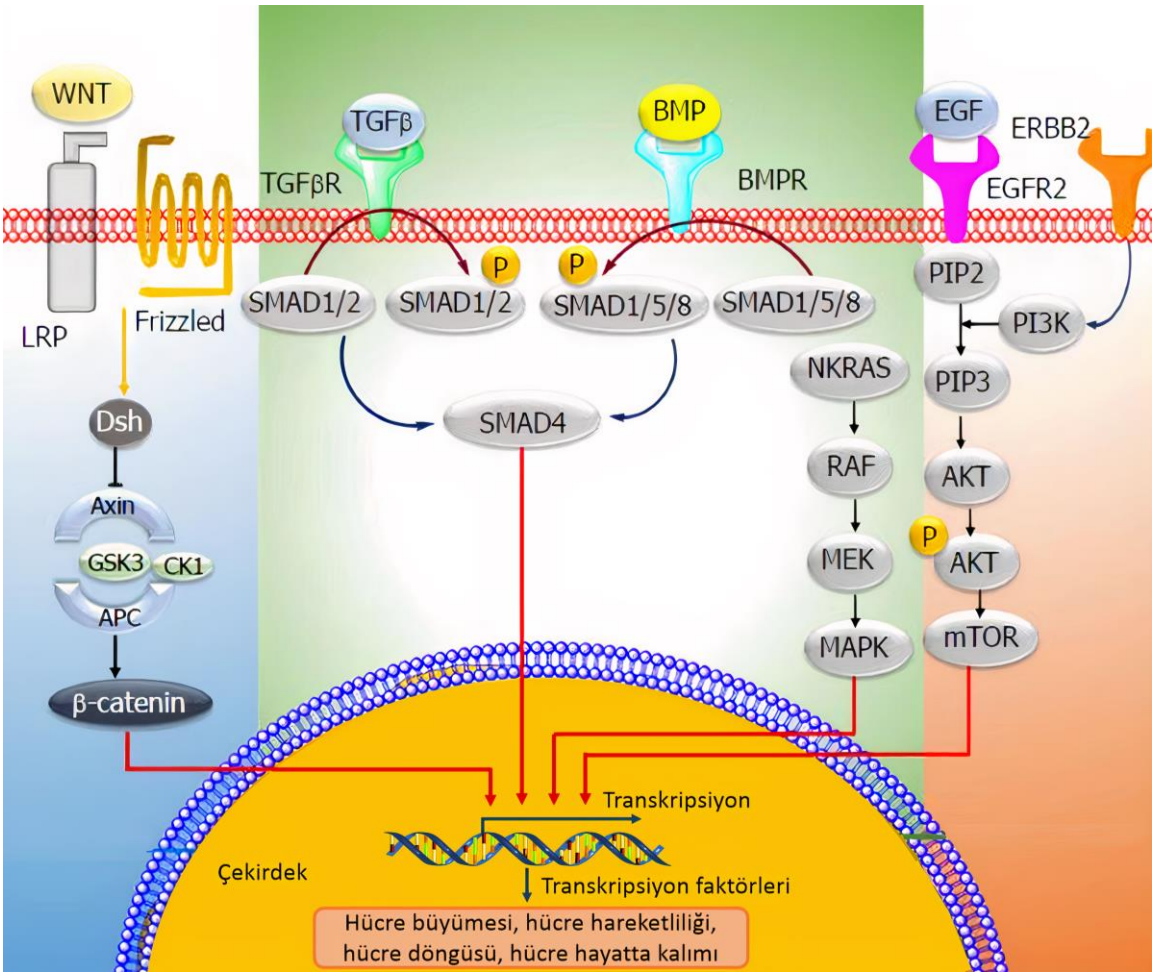
(MSI-H, MSI-L, MSS). Bunun yanısıra MSI durumu protein bazında da immünohistokimyasal inceleme yolu ile de değerlendirilebilmektedir (çizelge 2.3.) (75). Biriken bilgiler ışığında MSI durumunun hastaların olumlu sağkalımı ve iyi prognozu ile ilişkilendirildiği ve MSS hastalarıyla kıyasla 5-florourasil (5-FU) adjuvan kemoterapiden fayda göremedikleri ortaya çıkmış durumdadır (69).

Çizelge 2.4. Kolorektal kanserde uygulanan DNA tabanlı belirteçler (34,69-73,75,76)

| **Belirteç adı** | **Biyolojik materyal** | **Yöntem** | **Amaç** |
|---|---|---|---|
| MSI: BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250 | FFPE | PCR+Kapiler elektroforez | Tanısal, prognostik |
| *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* mutasyonu | Kan | qPCR, sekanslama | Tanısal |
| *APC* mutasyonu | Kan, FFPE | qPCR, sekanslama | Tanısal, prognostik |
| *BRAF* mutasyonu | FFPE | qPCR, sekanslama | Prognostik |
| *KRAS* ve *NRAS* mutasyonu | FFPE | qPCR, sekanslama | Prediktif |
| *TP53* mutasyonu | FFPE | qPCR, sekanslama | Prognostik, prediktif |
| *PIK3CA* mutasyonu | FFPE | qPCR, sekanslama | Prediktif |
| *PTEN* kaybı | FFPE | FISH | Prognostik |
| *SMAD4* mutasyonu | FFPE | qPCR, sekanslama | Prognostik |
| cfDNA: *APC, KRAS, TP53* mutasyonu | Kan | qPCR, sekanslama | Prognostik, prediktif |
| CIMP: *MLH1, p16, MINT1, MINT3, MINT31* | FFPE | qPCR | Prognostik |
| Cologuard dışkı DNA assayı: DNA mutasyonu + metilasyonu + FIT | Dışkı | qPCR, ELISA | Tanısal |
| *APC* metilasyonu | Kan, FFPE | qPCR | Tanısal |
| *SEPT9* metilasyonu | Dışkı, kan | qPCR | Tanısal, prognostik |
| *SFRP2* metilasyonu | Dışkı, kan | qPCR | Tanısal |
| *VIM* metilasyonu | Dışkı, kan | qPCR | Tanısal |

***APC*** – WNT/β-katenin sinyal yolağını düzenleyen ve hücre farklılaşması, migrasyonu, proliferasyonu ve apoptozunda görev gören tümör baskılayıcı gendir. Normal şartlar altında *APC* proteini β-katenine bağlanarak onu parçalamakta ve çekirdeğe translokasyonunu engellemektedir. Ancak *APC* mutasyonu veya promotör bölge metilasyonu bu genin ekspresyon kaybına ve β-katenin birikimine sebep olmaktadır. Sonuç olarak artan β-katenin miktarı çekirdeğe aktarılarak çeşitli faktörlere bağlanmaktadır ve birçok onkojenin transkripsiyonuna sebep olmaktadır. Böylelikle, hücrenin çoğalmasını teşvik eden WNT sinyal yolağının aktivasyonu gerçekleşmektedir (şekil 2.10.). *APC* mutasyonu kolorektal kanser vakalarının %90'ında tanımlanmış olup bu geni germline bozukluğu kalıtsal (FAP),

somatik mutasyonu ise sporadik kolorektal kansere sebep olmaktadır (70). Ayrıca *APC* hipermetilasyonu da hastalığın kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Bu bağlamda *APC* kolorektal kanserin teşhis ve prognozu açısından umut vaat eden DNA belirteci sayılmaktadır (73).




Şekil 2.10. Kolorektal kanserin gelişiminde yer alan esas sinyal yolakları (77)

***KRAS*** proto-onkogeni EGFR yolağında büyük öneme sahip olan küçük GTPaz (Guanozin Trifosfataz) proteinini kodlamaktadır. EGFR (Epidermal büyüme faktör reseptör) yolağı EGF gibi hücre dışı ligandların bağlanmasıyla aktif hale gelmektedir ve ileride tümör hücrelerinin hayatta kalımını sağlayan RAS –> RAF –> MEK –> ERK/MAPK sinyal zincirinin etkinleştirmektedir (şekil 2.10.) (69). *KRAS* geninin mutasyona uğraması bu sinyal yolağının EGFR aktivasyonundan bağımsız olarak sürekli etkin hale gelmesine ve hücre proliferasyon ve transformasyonuna neden olmaktadır (73). KRAS aktivasyonunu sağlayan mutasyonlarının büyük çoğunluğu 12. ve 13. kodonda (% 82-87 ve %13-18) yer almaktadır. Bu somatik mutasyonları taşıyan bireylerde setuksimab ve panitumumab gibi anti-EGFR

antikor tedavinin verimsiz olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle KRAS mutasyon varlığı anti-EGFR tedavi kararının alınmasında büyük öneme sahip olan prediktif belirtecidir (76).

RAF ailesinin üyesi olan ***BRAF*** proto-onkogeni serin-treonin kinazı kodlamaktadır ve MAPK yolağının düzenlenmesinde görev görmektedir. Yukarıda bahsettiğimiz üzere MAPK (mitojenle aktive edilmiş protein kinaz) yolağı RAS-RAF-MEK-ERK sinyal zinciri üzerinden hücrelerin farklılaşmasını, migrasyonunu ve proliferasyonunu yönetmektedir (şekil 2.10.). BRAF geninin amino asid dizisinin 600. pozisyonundaki valinin glütamik aside dönüşümü tüm KRK BRAF mutasyonlarının % 80'ini oluşturmaktadır ve MAPK yolağının aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır. BRAF mutasyonu kötü genel ve hastalıksız sağkalım ile ilişkilendirilmiştir ve ileri kolorektal kanser seyrinin öngörülmesinde güçlü prognostik özellikler sergilemektedir (76). Ayrıca yapılan meta analiz çalışmasına göre BRAF mutasyonu kadın cinsiyeti, sağ kolon konumu, tümör boyutu ve kötü farklılaşma oranı ile ilişkili bulunmuştur (78). Günümüzde BRAF ve KRAS belirteçlerinin kullanımı Amerikan Klinik Onkoloji Derneği (ASCO) tarafından şiddetle önerilmekte olup bu genlerin mutasyonu qPCR veya farklı sekanslama panelleri üzerinden tespit edilebilmektedir (79).

EGFR sinyal iletimi biri MAPK ve diğeri de PI3K olmak üzere iki esas hücre içi yolağını tetiklemektedir (69). PI3K yolağı, anti-apoptotik ve hücre hayatta kalım sürecini hızlandırmaktadır ve PI3K (fosfatidilinositol 3-kinaz) aktivasyonu ile başlamaktadır. PI3K daha sonra PIP2 ve PIP3 proteinlerini fosforile ederek AKT'nin etkin hale gelmesini sağlamaktadır. Sonuç olarak AKT hücrenin büyümesi ve proliferasyonunu teşvik eden mTOR (rapamisinin memeli hedefi) proteinin etkinleştirmektedir (şekil 2.10.). Bu bağlamda tümör baskılayıcı görevi gören PTEN PIP2 ve PIP3 proteinlerinin defosforile ederek PI3K yolağının inhibe etmektedir. ***PIK3CA*** onkogeni, PI3K enziminin katalitik alt birimini kodlamaktadır ve kolon dahil olmak üzere meme, prostat ve endometriyum kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğramaktadır (80). Kolorektal kanserde PIK3CA mutasyonu vakaların %10-18'de tanımlanmış olup bu bozukluklar genellikle genin 9 ve 20. ekzonlarında meydana gelmektedir (72). 10q23.31 kromozomunda konumlanan tümör baskılayıcı geni olan ***PTEN*** PI3K yolağının engellenmesinde büyük öneme sahiptir. Bu gende oluşan genetik ve epigenetik değişiklikler *PTEN*'in bialelik inaktivasyonuna yol açmaktadır. PTEN kaybı birçok kanser türünde sıklıkla görülmektedir (81). PTEN ve PIK3CA kolorektal kanserin kötü prognozunun ve muhtemel anti-EGFR tedavi yanıtının öngörücüsüdür (73,76).

KRK'da hem protein hem de DNA belirteci olarak görev gören ***SMAD4*** geni TGF-β (dönüştürücü büyüme faktörü -β) sinyal zincirinin merkezi aracısıdır. TGF-β yolağı farklı biyolojik süreçler ile birlikte birçok kanserin başlaması ve ilerlemesinde önemli role sahiptir. Bu bağlamda TGF-β / SMAD4 sinyal yolağı TGF-β ligandının bağlanmasıyla başlamaktadır. Ardından SMAD aile proteinlerinin fosforilasyonu sonrası oluşturulan *SMAD4* heterodimerik kompleksi çekirdeğe aktarılarak hücre büyümesinin durdurulması ve intiharına yönelik hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir (şekil 2.10.) (82). *SMAD4* ekspresyon kaybı kolorektal kanserin ilerlemesine katkıda bulunmaktadır ve hastalığın kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir. KRK vakalarının % 30-40'ında *SMAD4* mutasyonları bulunmaktadır (72).

Transkipsiyon faktörü ve tümör baskılayıcı geni olan ***TP53*** (tümör protein 53) 17.kromozomun kısa kolunda yer almaktadır. DNA hasar gördüğünde *TP53* hücre döngüsünü durdurarak bozuklukların onarılmasını sağlarken onarılamayacak durum ile karşılaştığında apoptoz sürecini başlatmaktadır (75). Bu gende oluşan mutasyonlar çoğunlukla amino asid değişimine sebep olarak proteinin fonksiyonunu bozmaktadır. *TP53* mutasyonları kolorektal tümörlerin yaklaşık %50-70'inde tanımlanmış olup hastalığın aday prognostik belirtecidir (72).

Ayrıca Septin 9 (*SEPT9*), *SFRP2* ve Vimentin (*VIM*) genlerinin metilasyon patterni kolorektal kanserin teşhisine yönelik umut verici dışkı ve kan bazlı belirteçlerindendir. Bu bağlamda Septin 9 geninin metilasyonuna dayalı olan ticari Epi ProColon 2.0 testi klinik kullanımına uygundur (71). Diğer dışkı paneli olan Cologuard ise DNA metilasyonu (*NDRG4, BMP3*), mutasyonu (*KRAS*) ve fekal hemoglobin testlerini bir araya getirerek kolorektal kanseri ve pre-malign neoplazinin varlığını öngörebilmektedir (83).

### 2.3.3. RNA BELİRTEÇLERİ

KRK'nın teşhis ve seyrinin öngörülmesine yönelik yapılan araştırmalar RNA belirteçlerini: mRNA, miRNA, lncRNA ve circRNA olarak farklı gruplara ayırmaktadır. Bu bağlamda **mRNA** belirteçlerinin seviyesi doku ve kanda qPCR yöntemiyle belirlenebilmektedir. Primer kanser hücrelerinden ayrılan ve kanda dolaşan mRNA molekülleri RNAzlara maruz kaldığı için mRNA tabanlı belirteçlerin geliştirilmesi güçlük arz etmektedir. Kanda belirlenen mRNA belirteçlerinden CEA, CK20, survivin ve TERT (telomeraz ters

transkriptaz) genleri hastalığın tanı ve prognozu açısından umut vaad etmektedir (84). Bununla ek olarak, yedi genden oluşan (*CLEC4D, VNN1, ANXA3, TNFAIP6, LMNB1, IL2RB, PRRG4*) ColonSentry paneli periferik kandan izole edilen mRNA üzerinden hastalığın riskini hesaplamaktadır (85).

Doku bazlı mRNA belirteçleri arasında Oncotype DX, Coloprint, OncoDefender, GeneFX gibi hastalığın riskini öngören prognostik gen panelleri bulunmaktadır (34). İlk tanımlanan ve klinik uygulamaya sunulan Oncotype DX paneli FFPE dokularında 12 genin ekspresyon imzası üzerinden hastaların nüksetme riskini hesaplamaktadır (86). Diğer Coloprint paneli ise taze ve dondurulmuş doku kullanarak elde edilen mRNA'lardan 18 genin ekspresyon profilini çıkarmaktadır (87). Her iki sınıflandırıcı da evre II KRK hastalarının metastaz gelişimini öngörerek kemoterapiden yarar görecek bireyleri tahmin edebilmektedir (34).

**mikroRNA'lar (miRNA)**, 18-25 nükleotid uzunluğunda olan protein kodlamayan küçük RNA molekülleridir. miRNA'lar transkripsiyon sonrası hedef mRNA'ya bağlanarak onu parçalamakta veya proteine dönüşümünü durdurmaktadır (70). Bu şekilde gen ifadesini post-transkripsiyonel olarak düzenleyen miRNA'lar tümör gelişimini teşvik etmekte, dolayısıyla hastalığın teşhisi, prognozu ve terapi-yanıtının tahmini açısından önem arz etmektedir (76). Bu bağlamda küçük boyuta sahip olan miRNA'lar RNase enzimleri tarafından parçalanmamaktadır ve pH dengesine karşı da hassas değildir, bu nedenle mRNA'lara göre daha stabildir (72).

MiR-21 KRK'nın en iyi çalışılmış tanısal ve prognostik belirtecidir. Bu miRNA'nın ifadesi serumda, dışkıda ve dokuda yüksek bulunmuş ve hücre proliferasyonu, invazyonu, lenf nodu metastazı, ileri klinik evresi ve kötü genel ve hastalıksız sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (70,76). Dolaşımda olan miR-92a ve miR-17-3p ise sağlıklı kontroller ile kıyasla KRK hastalarında yüksek ekspresyon profilli sergilemiştir. Bunun yanısıra dışkıdaki miR-92a ifadesi KRK ve düşük riskli adenomları sağlıklı bireylerden ayırt edebilmiştir (70). MiR-141 seviyesi kötü sağkalım ile ilişkilendirilmiş ve bu miRNA'nın CEA ile kombinasyonun KRK teşhisi açısından yararlı belirteç olabileceği öne sürülmüştür (72). Diğer miRNA belirteci olan miR-20a-5p ise SMAD4'ı susturarak tümör invazyonu ve metastazını teşvik ettiği bildirilmiştir. Bunun yanısıra miR-29a'nın yüksek ekspresyonu karaciğer metastazıyla güçlü bir şekilde anlamlı bulunmuştur. Tümör baskılayıcı miR-411'in ise doğrudan PIK3R3 genini

hedefleyerek dolaylı olarak PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağını düzenlediği ortaya atılmıştır (70).

**Uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA)** – 200 nükleotidden uzun olup proteine dönüşmeyen RNA türleridir. LncRNA'lar epigenetik ve kromozom kararlılığının regülasyonunda görev görerek kolorektal dahil olmak üzere birçok kanserin gelişiminde rol almaktadır. Uzun kodlanmayan RNA olan HIF1A-AS1 (Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa) kolorektal kanserin aday tanısal ve prognostik belirtecidir. KRK hastalarında HIF1A-AS1 seviyesi yüksek bulunmuş olup bu bireylerin kötü hayatta kalımı ile bağdaştırılmıştır (72). CRNDE (Farklı ifade olan kolorektal neoplazi) – tümör gelişimin ilk aşamalarında etkin hale gelen ve neoplastik kolon dokusunun %90'ında yüksek ekspresyon sergileyen diğer bir lncRNA'dır. Bu RNA'nın splice varyantı olan CRNDE-h tümör boyutu, lenf nodu ve uzak metastaz ile anlamlı bulunmuştur. CRNDE lncRNA'sı DUSP5 ve CDKN1A genlerinin epigenetik inaktivasyonu veya RAS/MAPK ve WNT/β katenin sinyal yolağının aktivasyonu üzerinden hastalığın ilerlemesini teşvik etmektedir. Aynı şekilde UCA1 (Ürotelyal kanser ilişkili 1) KRK vakalarında yüksek bulunmuş olup hastalığın grade derecesi, invazyon derinliği ve tümör boyutu ile ilişkilendirilmiştir (88). Kanser hücrelerinde aşırı ifade olan HOTAIR (HOX antisens intergenik RNA) transkripti KRK'nın kötü prognoz ve metastaz ile bağdaştırılmıştır (89). Genomik olarak damgalanmış (imprinted) H19 kodlanmayan RNA'nın yüksek ekspresyonu hücrelerin migrasyonu ve invazyonunu hızlandırarak tümörün gelişimine katkıda bulunmuştur. Bu lncRNA miR-138 ve miR-200a için rekabetçi endojen RNA olarak işlev görerek bu miRNA'ları baskılamıştır. Sonuç olarak belirtilen miRNA'ların hedefi olan  ve epitelyal-mezenkimal geçişinde yer alan Vimentin, ZEB1 ve ZEB2 genlerinde ekspresyon artışı gözlemlenmiştir (90). Bunlara ek olarak NEAT1, GAS5 ve ZFAS1 lncRNA'larının hastalığın tanısı ve prognozu açısından potansiyel biyobelirteç olabileceği dile getirilmiştir (72).

Son yıllarda diğer kodlanmayan endojen RNA sınıfı olan **dairesel RNA'lar (CircRNA)** kanser biyobelirteçleri olarak bilim dünyasının dikkatini çekmiştir. CircRNA'lar pre-mRNA'nın yanlış uç birleştirmesi veya yan ürünü olarak oluşmaktadır ve 5' başlık veya 3' poli(A) kuyruğuna sahip değildir (91). Dairesel RNA'ların arasında en iyi çalışılmış modellerin biri olan ciRS-7' - proteine dönüşen CDR1 geninin kodlanmayan antisens transkriptidir ve 3' poli(A) kuyruğu ve 5' başlığının eksikliğiyle karakterize edilmektedir.

MiR-7 süngeri olarak işlev gören onkojenik CiRS-7 circRNA'sı birçok kanserin ilerlemesini teşvik etmektedir. Kolorektal kanserde CiRS-7 miR-7'yi baskılayarak hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu yönünde EGFR/RAF1/MAPK yolağını hızlandırmaktadır. CiRS-7'nin yüksek ekspresyonu hastaların daha kısa hayatta kalımı ile ilişkilendirilerek bir potansiyel prognostik biyobelirteç görevi görmektedir (92).. Bu bağlamda dairesel RNA'lar olan circHIPK3, circRNA_100290, circCCDC66 ve hsa_circ_0136666'nın yüksek ifadesi kolorektal kanserde vakaların kötü sağkalımı ile bağdaştırılarak hastalığın prognozunu olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Diğer taraftan CircITGA7 ve hsa_circ_0014717'nin ifadesi kanser dokularında baskılanmış olup bu RNA'ların düşük ekspresyonu uzak metastaz, TNM evresi ve daha kısa hayatta kalımı ile ilişkili bulunmuştur(93).

## 2.4. KOLOREKTAL KANSERDE UYGULANAN PROGNOSTİK VE DİYAGNOSTİK GEN PANELLERİ

### 2.4.1. COLOGUARD GEN PANELİ

Kolorektal kanser erken aşamada tespit edildiği taktirde tedavi edilebilir hastalıktır, bu nedenle KRK'nın erken tanısı hayat kurtarıcı etki yaratmaktadır. Günümüzde Türkiye'de KRK'nın erken teşhisine yönelik 50 yaş sonrası bireylere her iki yılda bir gizli kan testi ve her 10 yılda bir kolonoskopi yapılmaktadır (49). KRK taramasının halen altın standardı olarak kabul gören kolonoskopi hastaya acı çektirirken diğer taraftan gizli kan testi KRK'nın mortalitesini önemli ölçüde azaltmasına rağmen yeterince hassasiyet ve özgüllük sergilememektedir. Bu bağlamda yüksek doğruluk ve kullanım kolaylığı sağlayan çok hedefli dışkı DNA testi – Cologuard (Exact Sciences) yeni çözüm olabilmektedir (94). FDA onayını alan ve klinik uygulamaya sunulan Cologuard paneli dışkıda yüksek düzeyde metillenmiş olan *BMP3* ve *NDRG4* genlerini, *KRAS* geninde sık görülen yedi nokta mutasyonunu, *β-aktini* referans genini ve hemoglobin seviyesini değerlendirmektedir (83). *BMP3* (kemik morfojenik proteini 3) - TGF-β ailesinin üyesi olan ve KRK dahil çeşitli kanser türlerinde hipermetilasyona uğrayarak susturulan tümör baskılayıcı gendir. *BMP3* ile birlikte diğer tümör baskılayıcı geni *NDRG4* (N-Myc aşağı regülasyon geni 4) 16. kromozomda konumlanmış olup genellikle KRK'da promotör metilasyonu sonucu inaktif hale gelmektedir. Hücre proliferasyonunu düzenleyen ve MAPK sinyal yolağınında görev gören *KRAS* onkogeni KRK vakalarının %35'inde mutasyona uğramaktadır. *KRAS*

mutasyonlarının %98'i 2. ekzonda konumlanan ve Cologuard paneli tarafından hedeflenen 7 nokta mutasyonunu içermektedir.

Cologuard panelinde bireylerin dışkı numunelerinden izole edilen DNA örneklerinde gerçek zamanlı PCR yöntemiyle belirtilen genlerinin metilasyon ve mutasyon örüntüsü çıkarılırken kolonik kanama ile ilişkili olabilecek hemoglobin konsantrasyonu protein örneklerinde ELISA yöntemi ile değerlendirilmektedir (95). Bu invaziv olmayan DNA paneli diyet veya ilaç kısıtlamaları, kolon temizliği gibi ek ön hazırlıkları gerektirmemektedir (94).

Bahsi geçen panelin etkinliğini değerlendiren ilk araştırma 207 vaka (93 KRK, 84 ileri adenom ve 30 tırtıklı adenom vakaları) ve 796 kontrolden oluşan çalışma grubunu içermiştir ve %90 özgüllük ve %98 duyarlılıkla KRK hastalarını ve %54 hassasiyetle ileri ve tırtıklı adenomları ayırt edebilmiştir (96). Diğer bir 65 KRK, 757 ileri adenom ve 9167 kontrolden (neoplastik olmayan ve negatif kolonoskopi sonucu olan) oluşan çalışma kolorektal kanser vakalarını DNA ve hemoglobin testlerine göre %92.3 ve %73.8 duyarlılıkla belirleyebilmiştir. Bununla birlikte ileri adenomlar % 42.4 ve %23.8 hassasiyet sergilemiştir ve bu hassasiyetin yüzdesi lezyon boyutuna göre (≥1 sm polip için %42'den ≥3 sm polip için %80'e kadar) artmaktadır. Kontrol bireyleri arasında ileri olmayan adenomlar için DNA testi ve hemoglobinin duyarlılık oranı %86.6 ve %94.9 iken kolonoskopi sonucu negatif çıkanların ise %89.8 ve %96.4'e eşit bulunmuştur (83). Sonuç olarak Cologuard paneli kolorektal kanserin taranması ve erken tespitine yönelik gizli kan testi ve kolonoskopiye bir umut vaat eden alternatif olarak sunulmuştur.

### 2.4.2. COLOPRINT VE ONCOTYPE GEN PANELLERİ

Kolorektal kanser hastalığının tedavisi cerrahi ameliyat, kemo-, radyo-, immüno- ve hedefe yönelik terapi yaklaşımlarını içermektedir. Hastalık tespiti sonrasında genellikle lezyonun cerrahi rezeksiyonu yapılmaktadır ve hastalığın seyrine bağlı olarak ileri terapi yöntemleri uygulanmaktadır. Bu bağlamda Oncotype DX ve Coloprint gen imza panelleri ameliyat sonrası evre II ve III KRK hastalarının nüksetme olasılığını hesaplayarak kemoterapiden yarar görecek bireyleri belirleyebilmektedir ve böylelikle de onkologlara tedavi kararının seçiminde yardımcı olabilmektedir.

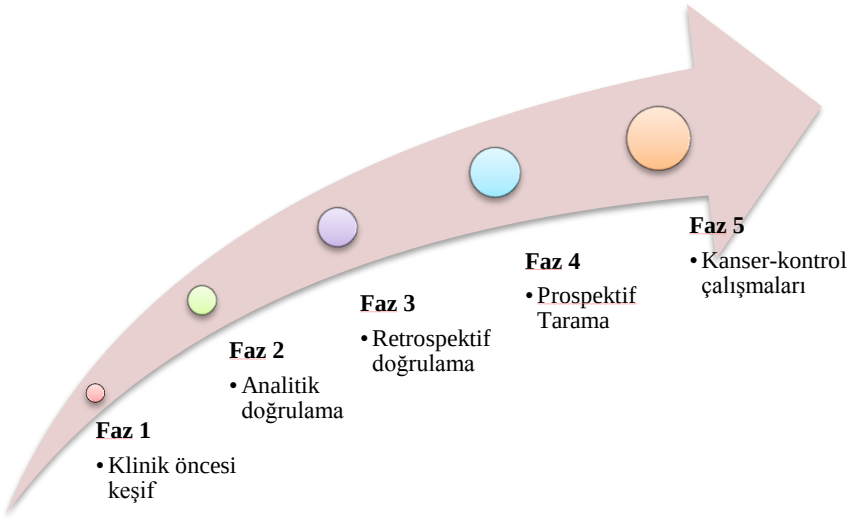
Coloprint gen imzası 188 evre I-IV KRK hastalarının taze dondurulmuş tümör dokuları ile yapılan Agilent tabanlı mikrodizin çalışması sonucu geliştirilmiştir. Her bir hastanın 40.000'den fazla gen ekspresyon imzası ile hastalığın metastazsız sağkalımı ilişkilendirilerek 18 genden oluşan panel ortaya konmuştur. Daha sonra 18 genlik Coloprint paneli 206 evre I-III KRK vakalarını içeren bağımsız validasyon grubunda doğrulanmış ve hastaların %36.8'i yüksek ve %63.2'si düşük riskli olarak iki sınıfa ayrılmıştır. Yüksek ve düşük riskli hastalar için beş yıllık nükksüz sağkalım oranı %67.2 ve 87.6% olarak belirlenmiştir (87).

Coloprint panelinin klinik ve analitik validasyon sürecinde 135 evre II KRK hastalarının taze dondurulmuş dokularında 18 genin ifadesi değerlendirilmiş ve hastaların çoğunluğu (%73,3) düşük riskli sınıfa dahil edilmiştir. Düşük riskli hastalar %94.9 oranında 5 yıllık uzak metastazsız sağkalım göstermiştir ve Coloprint metastaz gelişiminin tek öngörücüsü olarak belirlenmiştir (97). Diğer 416 evre II KRK hastalarından oluşan validasyon çalışmasının değerlendirilmesi sonucu vakaların %63'ü düşük riskli (nüksetme riski %10) ve %37'si yüksek olarak (nüksetme riski %21) belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucu Coloprint gen imzası klinikopatolojik değişkenlerden bağımsız olarak hastalığın prognoz tahminini önemli ölçüde iyileştirmiştir ve kemoterapi yararı görebilecek yüksek riskli bireylerin tanımlanmasında kolaylık sağlamıştır (98).

Diğer bir sınıflandırıcı olan Oncotype DX formaline fikse edilmiş parafine gömülü tümör dokularında 7 kanser ilişkili ve 5 referans geninin ekspresyon imzasını değerlendirerek hastaları düşük, orta ve yüksek riskli sınıflara ayırmaktadır. Bu sınıflandırıcı evre II ve III KRK hastalarının prognozunu öngörerek oksaliplatin ve/veya 5-fluorourasil adjuvan kemoterapi kararının alınmasında yardımcı olmaktadır (99). Oncotype DX gelişmi aşağıda ayrıntılı olarak ifade edilmektedir.

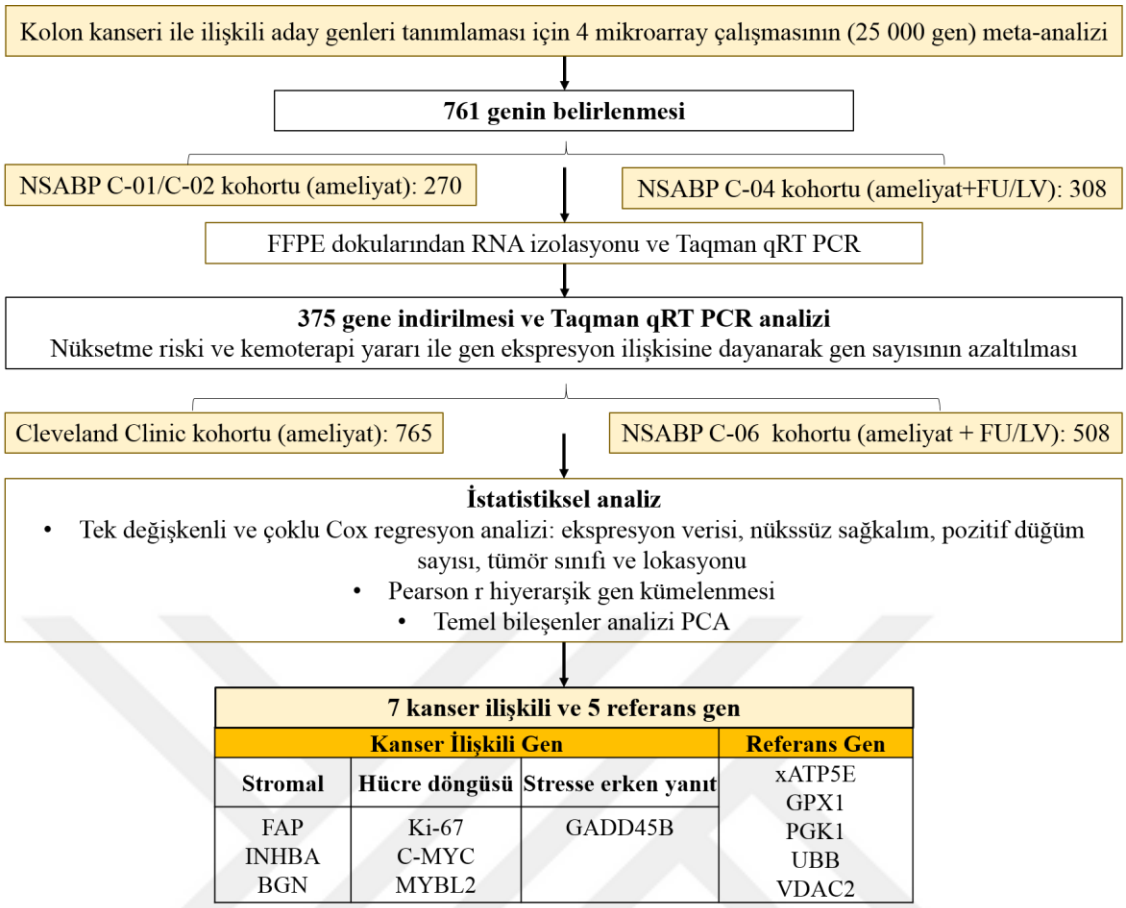
#### 2.4.2.1. Oncotype Örneği Üzerinden Biyobelirteç Panelinin Geliştirilmesi

Ulusal Kanser Enstitüsü'nün belirlediği koşullara göre kanser biyobelirteçlerinin klinikte uygulanabilmesi için preklinik, analitik, geriye ve ileriye dönük klinik ve maliyet-etkinlik fazlarını başarıyla tamamlaması gerekmektedir (100) (şekil 2.11.).




Şekil 2.11. Kanser biyobelirteçlerinin keşif ve değerlendirme aşamaları (101)

Biyobelirteç tanımlanmasının ilk adımı birikmiş literatür bilgileri üzerinden veya yüksek verimli omik teknolojiler aracılığıyla potansiyel aday belirteçlerin keşfidir (102). Belirteç keşif çalışması tasarlanırken çalışmaya dahil edilecek örnek sayısı ve kriterleri, toplama ve taşıma koşulları, uygulanacak yöntem ve istatistiksel hesaplamalar önceden belirlenmiş olmalıdır (103). Birkaç kez tekrarlanabilen klinik öncesi aşamasında doğru konulan amaç ve hedefler kritik öneme sahiptir. Oncotype DX panelinin klinik öncesi keşif aşamasında 4 farklı mikrodizin çalışmalar üzerinden 761 gen seti oluşturulmuştur (şekil 2.12.). Bu 761 aday genlerin ekspresyon verisi ile hastalığın nüksetme ilişkisi cerrahi ameliyat (n=270) ve ameliyat artı kemoterapi gören (n=308) iki bağımsız evre II veya III KRK hasta grubunda test edilmiştir. Örneklerin ekspresyon verisi ile hastalığın nüksü ve kemoterapi yararı ilişkisine bağlı olarak gen sayısı 375'e indirilmiş ve ek iki bağımsız kohortta Taqman RT PCR analizi tekrarlanmıştır. Toplam 1851 vaka içeren 4 farklı hasta grubunda bu 375 genin ifade profili çıkarılmış ve istatistiksel analizler (tek değişkenli ve çoklu Cox regresyon analizi, temel bileşenler analizi ve kümeleme/clustering analizi) sonrası 7 kanser ilişkili ve 5 referans geni seçilmiştir. Kanser ilişkili genlerin arasında stromal belirteçleri olan *BGN1, FAP* ve *INHBA1,* hücre döngüsünde görev gören *Ki67, MYBL2, cMYC* ve çevresel stres yanıt geni *GADD45B* bulunmaktadır. Bu genlerin ekspresyon verisi üzerinden 0 ile 100 arasında değişen nüksetme risk formülü geliştirildikten sonra preklinik aşaması tamamlanmıştır (86).




Şekil 2.12. Oncotype DX Faz 1 – klinik öncesi keşif aşaması

Belirteç gelişiminin 2. fazında belirlenen kanser biyobelirteçlerinin ne kadar doğru ve güvenilir ölçüm yaptığı – analitik sağlamlığı – birkaç parametre üzerinden değerlendirilmektedir. Bunun için Oncotype DX panelinin analitik validasyon sürecinde 12 genin qPCR amplifikasyon verimliliği, analizin doğrusallığı, duyarlılığı, kesinliği ve tekrarlanabilirliği ilk keşif seti örnekleri üzerinden valide edilmiştir (104).

Güçlü analitik performans sergilemesi biyobelirteçlerin klinikte uygulanabilmesi için yeterli bir ön koşul değildir, bu nedenle de teknik validasyonun ardından biyolojik doğrulama çalışmaları yapılmaktadır. Klinik doğruluk sürecinde farklı biyolojik veya klinik özelliklere sahip olan popülasyonun kanser biyobelirteçleri tarafından farklı gruplara ayırılabilme gücü test edilmektedir. Klinik validasyon çalışmaları geriye (faz 3) veya ileriye dönük (faz 4) şeklinde yapılabilmektedir (101). Oncotype DX analizi QUASAR, CALGB 9581, NSABP C-07 ve SUNRISE olmak üzere 3 bağımsız prospektif ve 1 retrospektif klinik doğrulama çalışmalarını içermektedir ve toplam yaklaşık 3,000 hasta üzerinden kolon kanserin yeniden gelişme riskini nüksetme skoru üzerinden öngörmektedir.

İlk prospektif doğrulama çalışması olan QUASAR cerrahi ameliyat gören 711 evre II kolon kanseri hastalarını içermektedir. Bu çalışma kapsamında geliştirilen nüksetme skorunun hastalığın tekrarlamasıyla doğrudan ilişkili olduğu ve geleneksel faktörler dışında ek bilgi sağladığı kanıtlanmıştır (105). İkinci prospektif çalışması olan CALGB9581 ilk validasyon sonuçlarını desteklemektedir ve nüksetme skorunun hastalığın yeniden gelişmesi için prognostik biyobelirteç olabileceğini göstermiştir. Bu çalışma klinikopatolojik parametrelere göre düşük riskli olarak sınıflandırılan 690 evre II kolon kanseri vakalarını içermektedir ve düşük riskli olarak düşünülen vakaların bile bir kısmının (%22'sinin) gelecekte yüksek olasılıkla nüks edebileceğini göstermiştir (106). Üçüncü prospektif validasyon çalışması NSABP C-07, 5-FU/LV veya 5-FU/LV artı oksaliplatin ile tedavi görmüş 892 evre II ve III KRK hastalarından oluşmaktadır. Üçüncü doğrulama çalışması Oncotype DX panelinin evre III vakaları için prognostik faktör olduğunu ve T-N evresi ile MMR durumundan bağımsız olarak kemoterapi gören evre II ve III hastalarının nüksetme riskini belirleyebildiğini ortaya koymuştur (107). En son retrospektif SUNRISE kohort çalışmasında sadece cerrahi ameliyat görmüş olan 597 evre II ve III Japon hastalarında 12 genin risk puanı hesaplanmıştır ve geliştirilen testin klinikopatolojik faktörlerin ötesinde bir ek prognostik özellik sergilediğini doğrulamıştır (108).

Son olarak, bir kanser biyobelirtecinin standart klinik uygulamaya geçebilmesi için bu belirtecin klinik ve maliyet açısından değerli olduğunu kanıtlaması gerekmektedir. Bu bağlamda Oncotype DX paneli uygulanan 92, 141 ve 269 hastadan oluşan çalışmalarda tedavi önerilerinin %29.3 ile %44.7 oranında daha az kemoterapi kullanım lehine değiştiği ortaya konmuştur (109-111). Analiz hasta ve hekimlerin aldıkları tedavi kararını etkilediği, doktor güvenini arttırdığı ve hastanın karar verme çatışmasını azalttığını öne sürmektedir. Diğer iki çalışmada ise Oncotype DX nüks skorunun evre II, T3 ve MMR-P kolon kanseri hastalarında yaşam kalitesini etkilemeden maliyet tasarrufunu sağladığı söylenmektedir (112,113). Klinik uygulamaya sunulan Oncotype DX paneli Türkiye koşullarında aracı firmalar yardımı ile ABD Genomic Health merkezine gönderilerek yapılmaktadır.

### 2.4.3. COLOTYPE: KONSENSÜS MOLEKÜLER ALTTİP (CMS) SINIFLANDIRMA GEN PANELİ

Günümüzde kolorektal kanser tedavisinin tümör evresi tarafından belirlenmesi hastalığın moleküler heterojenitesinden kaynaklı olarak değişik terapi cevaplarının görülmesine ve yüksek mortalite oranına sebep olmaktadır. Bu bağlamda potansiyel heterojenitenin giderilmesi adına KRK alt sınıflandırma konsorsiyumu (CRCSC) tümör örneklerini gen ekspresyonu ve temel biyolojik özelliklerine dayalı olarak dört konsensüs moleküler alt sınıfına ayırmıştır: CMS1 (immün), CMS2 (kanonik), CMS3 (metabolik) ve CMS4 (mezenkimal). Bu alt tipler aynı tedaviye farklı yanıtları ve iyiden kötüye doğru değişik prognostik özellikleri sergilemektedir (şekil 2.13.) (114).

| CMS1<br>MSI İmmün | CMS2<br>Kanonik | CMS3<br>Metabolik | CMS4<br>Mezenkimal |
|---|---|---|---|
| 14% | 37% | 13% | 23% |
| MSI, CIMP yüksek, hipermutasyon | SCNA yüksek | Karışık MSI durumu, SCNA düşük, CIMP düşük | SCNA yüksek |
| BRAF mutasyon | | KRAS mutasyon | |
| İmmün infiltrasyonu ve aktivasyonu | WNT ve MYC aktivasyonu | Metabolik deregülasyonu | Stromal infiltrasyon, TGF-B aktivasyonu, anjiyogenez |
| Nüks sonrası kötü sağkalım | | | Kötü genel ve nükssüz sağkalım |

CIMP - CpG adacıklarının metilatör fenotipi;
MSI - mikrosatellit kararsızlığı;
SCNA - Somatik kopya sayısı değişikliği.

Şekil 2.13. Konsensüs Moleküler Alt Tip (CMS) sınıflandırması ve yer aldığı biyolojik yolakları (114)

Konsensüs moleküler alttipleri (CMS) KRK vakalarını tümör kökenine bağlı olarak etkili bir şekilde sınıflandırmaktadır ve bu sınıflandırıcının klinik uygulamaya aktarılabilmesi için ColoType paneli geliştirilmiştir. ColoType paneli FFPE dokularında hedeflenmiş RNA dizileme yöntemiyle 40 genin ekspresyon verisini çıkarmaktadır ve tümörleri CMS 1-4 alt tiplerine ayırmaktadır (115).

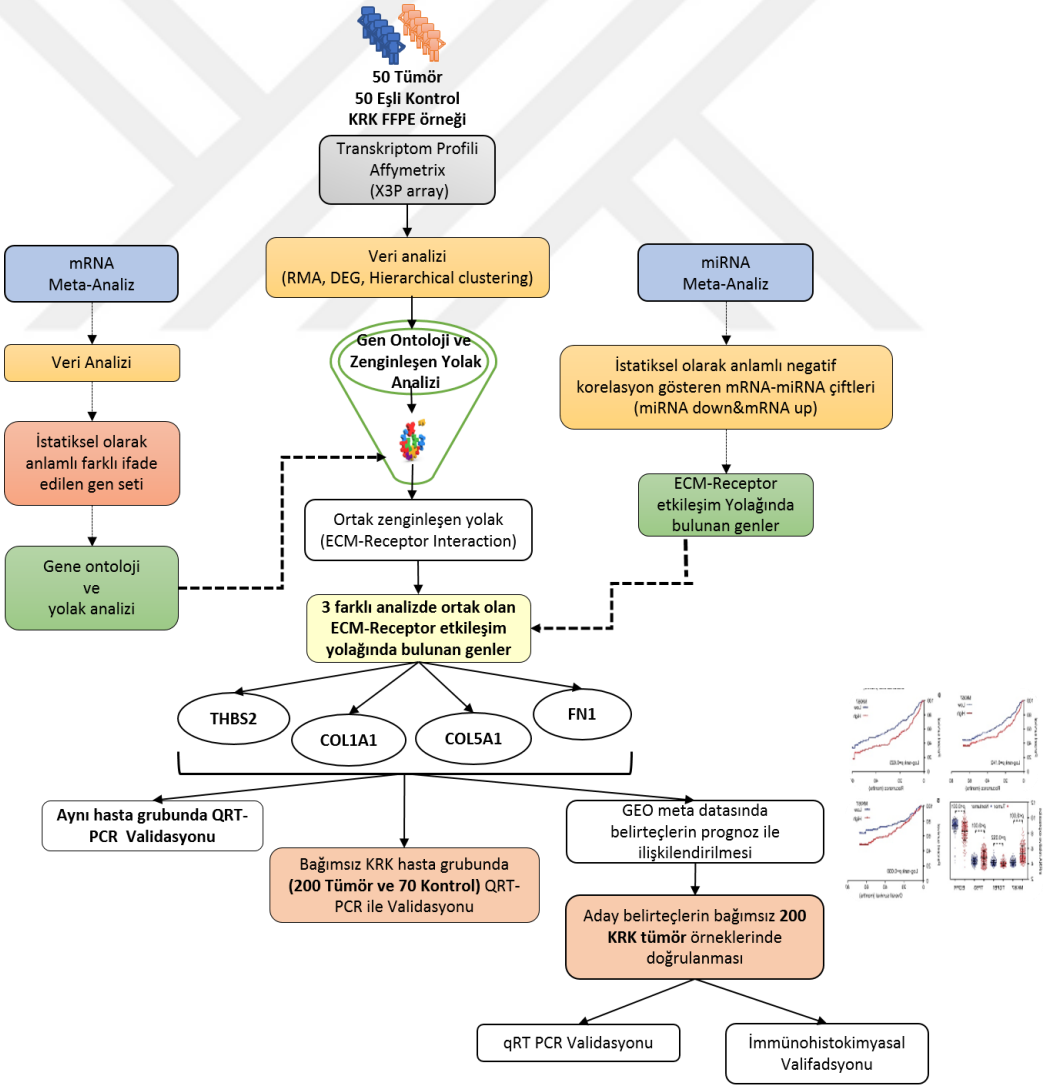
Araştırma üç farklı kohorttan oluşmaktadır ve her kohort çalışma ve validasyon seti olarak ikiye ayrılmaktadır:

- Kohort A (n = 1888), GEO'dan indirilen Affymetrix tabanlı kolon kanseri örneklerinin gen ekspresyon verisini içermektedir (çalışma grubu: n = 683, doğrulama: n = 1205).
- Kohort B (n = 688), Affymetrix tabanlı PETACC-3 klinik deneme çalışma örneklerinden oluşmaktadır (çalışma grubu: n = 342, doğrulama: n = 346).
- Kohort C – Genom Atlas projesinin Kolon Adenokarsinom (TCGA- COAD, n = 382) RNA sekans verilerini içermektedir (çalışma grubu: n = 189, doğrulama: n = 193).

Toplam 1214 vaka içeren çalışma grubu üzerinden geliştirilen 40 genlik sınıflandırıcı validasyon grubunda doğrulanmış olup sırasıyla 0.90, 0.91 ve 0.88 doğrulukla CMS alt tiplerini öngörebilmiştir. Bu panelin kliniğe entegre edilebilmesi için sonraki adımı tekrarlanabilirlik ve doğruluğun kesinleştirilmesi adına analitik validasyonun gerçekleştirilmesidir (115).

## 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Kolorektal kanser dünya çapında en yaygın malignitelerden biridir ve kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Bu hastalığın insidans oranının 2040 yılına dek 3 milyon vakayı aşacağı ve 1,6 milyon bireyin ölümüne sebep olacağı öngörülmektedir (1). Kolorektal kanserin esas tedavisi cerrahi ameliyat ile birlikte farklı kemoterapötik yöntemlere dayanmaktadır. Hastalığın evresi ve derecesi gibi tedavi seçimini etkileyen patolojik belirleyiciler heterojen KRK vakalarının ayrımında yeterince hassas değildir ve bireye özgü tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi adına yeni belirteçlerin tanımlanması önem arz etmektedir. Bu bağlamda ekibimiz 2007 yılından itibaren hastalığın tanı ve prognozuna yönelik biyobelirteçlerin tanımlanmasını hedefleyen ve şekil 3.1.'de özetlenen projeleri yürütmektedir.




Şekil 3.1. Çalışmanın akış şeması

Şekil 3.1.'de yer alan çalışmalar sunulan tezin geçmişini oluşturmaktadır. Ekibimiz tarafından hem kendi hasta grubumuzda hem de GEO ve Array Express veri tabanları üzerinden indirilen çalışmaların meta analizi sonucunda kolorektal kanserde farklı ekspresyon sergileyen gen setleri oluşturulmuştur. Bu gen seti daha sonra miRNom verileri ile entegre edilerek değişik ekspresyon gösteren miRNA-mRNA çiftleri belirlenmiştir. Bu genlerin yolak zenginleşme analizi sonucunda istatistiksel olarak en çok zenginleşen gen grubunun ekstrasellüler matris grubu genleri ve özellikle *COL1A1*, *COL5A1*, *THBS2* ve *FN1*'in önemli ölçüde yüksek ifade gösterdiği belirlenmiştir. GEO'dan indirilen KRK verisetinde bu genlerin genel ve hastalıksız hayatta kalımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Gelinen aşamada bağımsız Türk kolorektal kanser hasta grubunda:

1. *COL1A1*, *COL5A1*, *THBS2* ve *FN1* genlerinin ifadesinin tümör ve eşli kontrol dokularında belirlenerek belirteçlerin ayrım gücünün denenmesi,
2. *COL1A1*, *COL5A1*, *THBS2* ve *FN1* genlerinin mRNA ve protein ifade verisi ile hastaların hayatta kalım bilgileriyle ilişkilendirilerek hastalığın prognozunu belirleyebilme potansiyelinin test edilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda aşağıdaki hedefler belirlenmiştir:

- Tümör ve tümör artı eşli kontrol grubunun FFPE dokularında aday biyobelirteçlerin qRT-PCR ile gen ekspresyonun verisinin ortaya konması;
- Tümör grubunda immünohistokimyasal olarak bu gen ifadesinin protein bazında doğrulanması;
- Validasyon sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizinin yapılması ve bahsi geçen genlerin ayrım ve prognoz gücünün ortaya konması.

Yukarıda belirtilen hedeflerin başarıyla gerçekleştirilmesi sonucu oluşturulan sağlam ve doğru gen ekspresyon imzası, benzer klinik verilere sahip olan hasta bireylerinin sağkalımını ve nüksetme riskininin öngörülmesinde etkili olabilecektir. Üstelik tanımlanan tanısal ve prognostik belirteçler ileride doğru tedavi protokolünün seçimi için onkologlara yardımcı olacak nüks skorlama panelinin geliştirilmesinde bir hassas tıp yaklaşımı olarak kullanılabilecektir.

# 4. MATERYAL VE YÖNTEM

## 4.1. MATERYAL

Çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi, Tıbbi Onkoloji ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı tarafından tedavi ve takipleri yapılan ve 2006-2015 yılları arasında kolorektal adenokarsinoma tanısı konmuş hastaların arşiv materyelleri dahil edilmiştir. Çalışma için gerekli örneklem büyüklüğü, belli bir gendeki ifade düzeyinin hastaların sağkalımı üzerine etkisinin incelendiği Cox Oransal Hazard modeli için R istatistiksel programlama dilinde "powerSurvEpi" paketindeki "ssizeEpi.default" komutu ile hesaplanmıştır: ssizeEpi.default (power = 0.80, theta = 2,8  p = 0.27 , psi = 0.27, rho2 = 0, alpha = 0.01).

Risk oranı theta, standardize etki büyüklüğüne göre büyük düzeyde bir etkiye karşılık 2.8 olarak belirlenmiştir ($d = \ln(Hazard\ Oranı) \times \sqrt{6}/\pi$). Bu durumda 2.8 hazard ve 0.27 ölüm oranı için, Bonferroni düzeltmesi yapılmış (4 gen için) $\alpha$=0.0125 düzeyinde %80 güçte istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulabilmek için gerekli örneklem büyüklüğü 198 olarak hesaplanmıştır ve çalışmaya 200 hasta dahil edilmiştir. Tez kapsamında belirlenen genlerin prognostik özellikleri 200 hastanın formaline fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) tümör dokuları üzerinde değerlendirilirken ayrıca tanısal özelliği için ek olarak 70 eşli kontrol örnekleri de kullanılmıştır. Tez kapsamında kullanılan kontrol dokuları cerrahi sınırın dışında tümöre en uzak olan alandan seçilmiştir.

Çalışmaya patolog uzmanlar tarafından incelenen ve konvansiyonel adenokarsinom ile müsinöz ve taşlı yüzük hücreli adenokarsinom olarak sınıflandırılan olgular dahil edilmiştir. Bu vakaların klinikopatolojik, demografik (yaş, cins, tümör farklılaşma derecesi, TNM evresi, tümör konumu, tümör boyutu, lenfovasküler ve perinöral invazyon ve adjuvan tedavi verisi) ve nüks ile sağkalım bilgileri patoloji arşiv raporundan elde edilmiştir. Seçilen hastaların takip süresi en az 5 yıl veya ölüme kadar zamanı içermektedir. Tez çalışmasının hasta grubu ve özellikleri çizelge 4.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen olguların klinikopatolojik ve demografik özellikleri

| Özellikler | 200 tümör | | 70 eşli tümör-kontrol | |
|---|---|---|---|---|
| | Sayı | Yüzde | Sayı | Yüzde |
| **Toplam hasta sayısı** | 200 | 100% | 70 | 100% |
| Cinsiyet | | | | |
| Kadın | 80 | 40.0 | 30 | 42.9 |
| Erkek | 120 | 60.0 | 40 | 57.1 |
| Ortalama yaş, yıl | 66 (35-95) | | 66 (36-92) | |
| Kanser türü | | | | |
| Adenokarsinom | 166 | 83.0 | 62 | 88.6 |
| Müsinöz Adenokarsinom | 31 | 15.5 | 8 | 11.4 |
| Taşlı yüzük hücreli | 3 | 1.5 | - | - |
| Tümör evresi | | | | |
| 1 | - | - | - | - |
| 2 | 84 | 42.0 | 31 | 44.3 |
| 3 | 105 | 52.5 | 35 | 50.0 |
| 4 | 14 | 7.0 | 4 | 5.7 |
| Tümör farklılaşma derecesi (grade) | | | | |
| 1 | 2 | 1.0 | 1 | 1.4 |
| 2 | 156 | 78.0 | 59 | 84.3 |
| 3 | 28 | 14.0 | 7 | 10.0 |
| NA | 14 | 7.0 | 3 | 4.3 |
| Tümör lokasyonu | | | | |
| Sağ Kolon | 63 | 31.5 | 22 | 31.4 |
| Sol Kolon | 80 | 40.0 | 27 | 38.6 |
| Rektum | 57 | 28.5 | 21 | 30.0 |
| Vefat eden hasta sayısı | 61 | 30.5 | 20 | 28.6 |
| Nüks gösteren hasta sayısı | 67 | 33.5 | 20 | 28.6 |
| Uzak metastaz gösteren hasta sayısı | 49 | 24.5 | 16 | 22.8 |
| Ortalama sağkalım süresi, ay | 60.6 | | 57.7 | |

## 4.2. YÖNTEM

### 4.2.1. FORMALİNE FİKSE EDİLEN PARAFİNE GÖMÜLEN (FFPE) DOKULARDAN RNA İZOLASYONU

#### 4.2.1.1. Mikrodisseksiyon Yöntemiyle FFPE Dokularından Kesit Alımı Ve RNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen vakaların tümör ve normal bloklarının hematoksilen-eozin (H&E) boyalı lamları patalog uzmanlar tarafından ışık mikroskobu altında ayrı ayrı değerlendirilerek tümör ve normal hücrelerin bulunduğu kısımlar seçilmiştir. Boyalı preparatların formalinle fiksasyonu yapılıp parafine yerleştirilen (FFPE) blokları Patoloji arşivinden çıkarılıp manuel makrodisseksiyon yöntemi ile kesitleri alınmış ve daha sonra

deparaffinizasyon edilerek Qiagen RNeasy FFPE Kiti (Katalog No: 74404) ile RNA izolasyonu yapılmıştır.

**Manuel mikrodisseksiyon**

Çalışma esnasında ortam sterilliği korunmuş olup işlem öncesi su banyosu, mikrotom bıçağı, çalışma alanları ksilen, alkol ve RNAse ZAP ile temizlenmiştir. Kesit alımında kullanılan lamlar alüminyum folyo ile sarılıp 170°C'de 2 saat bekletilerek steril edilmiştir. Örnekler arasında çapraz kontaminasyonu önlemek için mikrotom bıçağı her iki bloktan bir yenilenmiştir ve her kesit sonrası alkol ile temizlenmiştir. Aynı bıçağın kesit alınmış kısmı terkrar kullanılmamıştır.

1. Arşivden çıkarılan parafin blokları -20°C'de 30-60 dakika bekletildikten sonra mikrotom cihazına (Thermo Fisher Shandon Finesse ME+ Microtome) konulur.
2. Mıkrotom bıçağı yerleştirilip bloklar önce "Trim" modunda 6-10 µm kalınlığında doku çıkıncaya kadar tıraşlanır.
3. Tüm doku çıktıktan sonra cihaz "Section" moduna getirilir ve 8 µm kalınlığında kesitler alınır. Alınan kesitler 40-45°C sıcaklığındaki su banyosuna atılır ve buruşan kesitlerin düzgün bir şekilde yayılması sağlanır.
4. Dokunun büyüklüğüne bağlı olarak iki veya tek kesit su banyosundan lam üzerine alınır ve kurutulmaya bırakılır.
5. Kesiti alınan bloklar parafine batıralarak tekrardan kapatılır ve kullanılmayacak ise eğer arşive götürülür. Toplam her bloktan 8 parça kesit alınır, izolasyon aşamasında 4 parça kullanılır, 4 parça yedek olarak tutulur. Kesitler lam kutusuna yerleştirilip kısa süreli kullanım için +4°C, uzun süre tutulması için ise -80°C'li buzdolabında muhafaza edilir.

**Deparaffinizasyon**

Alınan FFPE kesitlerinden RNA izolasyonunun sonraki aşaması parafinin uzaklaştırılarak dokunun açığa çıkarılması – deparafinizasyon işleminin yapılmasıdır.

1. Kesitler ksilen ile doldurulan şalelere konularak iki kez 10'ar dakika inkübe edilir. Böylelikle parafin ksilen tarafından çözünür ve doku açığa çıkar.
2. Daha sonra ksilenin uzaklaştırılması için lamlar %100'lük alkol ile doldurulan yeni şaleye alınır ve iki kez 5'er dakika bekletilir.

3. Alkolün çıkarılması ve dokuların hidratlanması için son adım olarak kesitler distile suda 30 saniye yıkanır ve peçete üzerinde kurumaya bırakılır.

**Kit Protokolü**

Bundan sonraki RNA izolasyon adımları Qiagen RNeasy FFPE Kiti (Katalog No: 74404) protokolüne göre yapılmıştır.

1. Marker kalemi ile işaretlenen boyalı lamlar deparafinize edilen kesitlerin altına konularak tümör veya normal hücreleri RNase ZAP ile temizlenmiş bistüri yardımı ile kazınır ve mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
2. Tüplere 240 ul PKD Bufferi eklenip vortekslendikten sonra 1 dakika 10,000 rpm'de santrifüj edilir.
3. Alt faza 10 ul Proteinaz K eklenir ve pipetaj yaparak dikkatli şekilde karıştırılır.
4. Proteinaz K enziminin aktivasyonu ve inaktivasyonu için tüpler iki farklı sıcaklıkta: ilk 56°C'de 15 dakika içinde, daha sonra 80°C'de 15 dakika içinde inkübe edilir. Kullanılan ısı bloğunun çalkalama özelliği bulunmuyorsa tüpler her 3-5 dakida aralıklarla hafifce vortekslenir. Burada 80°C inkübasyonu kritik öneme sahiptir. Daha uzun inkübasyon süresi veya yüksek sıcaklığı daha fragmente RNA ürünün elde edilmesine sebep olur.
5. 80°C inkübasyon sonrası tüpler hemen 3 dakikalık buza konur, sonra da 15 dakika 13,500 rpm'de santrifüj edilir.
6. Süpernatant dikkatlice pellete dokunmadan yeni 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
7. Süpernatantı içeren tüpe 25 ul DNase Booster Buffer ve 10 ul DNase I stock enzimi eklenir. DNase I enzimi fiziksel denatürasyona çok hassastır, bu nedenle tüp ters-düz edilerek nazikçe karıştırılır ve tüpün etrafına sıçrayan sıvılar spin edilerek aşağı indirilir.
8. Daha sonra bu karışım DNase enziminin aktivasyonu ve DNA'ların eliminasyonu için oda sıcaklığında 15 dakika içinde inkübasyona bırakılır.
9. 500 ul RBC Bufferi RNA'nın membrana bağlanmasını sağlamak amacıyla lizata eklenir ve pipetaj ile iyice karıştırılır. Daha sonra 1200 ul saf etanol örneğe eklenir ve hemen hızlıca pipetaj yapılarak RNA'nın çökelmesi ve görünür hale gelmesi sağlanır.
10. Yeni 2 ml'lik tüpe RNeasy MinElute spin kolonu yerleştirilir. 700 ul lizat örneği var olan çöküntüleri ile beraber bu kolona aktarılır ve 15 saniye 13,500 rpm'de santrifüj

edilerek RNA'nın kolon membranına bağlanması ve diğer bileşenlerin kolondan akıp geçmesi sağlanır. Alt tüpe akan sıvı daha sonra uzaklaştırılarak kolon tüpe geri konulur.

**11.** 10. basamak tüm lizatın RNeasy MinElute spin kolonundan geçene kadar tekrar edilir.

**12.** Kolon membranının yıkanması amacıyla 500 ul RPE Buffer kolona aktarılır ve 15 saniye 13,500 rpm'de santrifüj edilir. Alt tüpe akan sıvı uzaklaştırılır ve kolon tüpe geri konulur.

**13.** 500 ul RPE Bufferi kolona eklenip 2 dakika 13,500 rpm'de santrifüj edilir, böylelikle membran ikinci kez yıkanmış olur. Sıvının aktığı alt tüp yenisiyle değiştirilir. Tüp değişiminde etanol kontaminasyonundan kaçınılması için RNeasy MinElute spin kolonu sıvı ile temas etmemelidir.

**14.** RNeasy MinElute spin kolonu yeni 2 ml'lik tüpe yerleştirilip kapağı açık şekilde tekrardan 15000 rpm'de 5 dakika içerisinde santrifüj edilir. Tüp akan sıvı ile birlikte atılır.

**15.** Spin kolonu yeni 1.5 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilip 14-30 ul RNase-free suyu doğrudan kolon membranına eklenir. Tüpün kapağı kapatılıp 15000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Böylelikle izole edilen RNA'nın daha sonra nitel ve nicel analizleri yapılır. RNA'nın degradasyonunun engellenmesi için RNA örneği -80°C'li buzdolabında muhafaza edilir.

#### 4.2.1.2. Elde Edilen RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Olarak Miktar Tayini

Elde edilen RNA ürününün saflığı ve konsantrasyonu sonraki yapılacak uygulamalarının verimliliği doğrudan etkilemektedir, bu nedenle RNA izolasyonundan sonra onun miktarı florometrik (Qubit) veya spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Tez çalışmasında izole edilen RNA'ların ultraviyole ve görünür ışık absorbsiyon özellikleri Thermo Scientific Nanodrop 1000 (220-750 nm) aracılığı ile spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Bu bağlamda:

- 260 nm dalga boyunda RNA dahil olmak üzere nükleik asitler,
- 280 nm dalga boyunda proteinde bulunan aromatik amino asitler,
- 230 nm dalga boyunda tuz bileşenleri, karbonhidratlar, peptitler ve fenoller ultraviyole ışığını güçlü bir şekilde absorbe etmektedir.

Bu doğrultuda 260 nm absorbans değeri ekstinksiyon katsayısı ile (RNA için 40 ng/ul) çarpılarak RNA konsantrasyonu hesaplanmaktadır ve sonuç ng/µl cinsinde elde

edilmektedir. Bununla birlikte ürünün saflığı A260/A280 ve A230/A280 oranları üzerinden belirlenmektedir. Saf RNA örneğinin A260/A230 oranı 1,8-2,2 arasında değişirken A260/A280 oranı ~2'ye eşit olmalıdır. Belirlenen aralığın dışında olan değerler A260/A280 oranı için protein kirleticilerin, A260/A230 için ise RNA saflaştırma tamponlarında yüksek miktarda bulunan guanidin tiyosiyanat kontaminasyonunun işaretidir. Tez çalışması kapsamında bu oranlar RNA'nın saflığının göstergesi olarak dikkate alınmıştır.

#### 4.2.1.3. Elde Edilen RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi

RNA izolasyonunun nicel ölçümünden sonraki adımı kalite incelemesidir. Tez çalışması kapsamında RNA'ların bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. İzole edilen RNA örnekleri agaroz jeline yüklendikten sonra elektrik akımı altında büyüklük ve konformasyonuna bağlı olarak birbirinden ayrılır. Bu ayrılan RNA molekülleri jele eklenen ve nükleik asitlere interkale olan etidyum bromürün yardımıyla UV ışığı altında görünür hale gelir.

Çizelge 4.2. Agaroz jel elektroforezinde jelin hazırlanması için gerken malzemeler

| **Bileşenler** | **Mini tepsi (hacmi 25 ml)** | | **Mini tepsi (hacmi 60 ml)** | |
|---|---|---|---|---|
| | %1 jel | %2 jel | %1 jel | %2 jel |
| Agaroz (Biomax, Kat No. 144503PR) | 0.25 g | 0.5 g | 0.6 g | 1.2 g |
| 1 x TBE | 25 mL | 25 mL | 60 mL | 60 mL |
| EtBr solüsyonu | 1.25 ul | 1.25 ul | 3 ul | 3 ul |

RNA örneklerinin sayısına bağlı olarak %1'lik agaroz jeli mini veya midi tepsilerde hazırlanılabilir. %2'lik jeli çoğunlukla PCR ve qPCR sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılır. Jelin hazırlanmasında gereken malzemeler çizelge 4.2.'de yer almaktadır.

Bunun için gerekli miktarda agaroz (jele bağlı) hassas terazi yardımı ile tartılarak şişeye konur ve üzerine mezur ile ölçülen 1 x TBE eklenir. Daha sonra şişe mikrodalga fırınında jelin tamamen eriyip homojen haline gelmesine kadar çalkalanarak ısıtılır. Jele Etidiyüm brömür solüsyonu eklenip iyice karıştırıldıktan sonra jel yavaşça tepsiye dökülür ve taraklar konulur. Baloncuk oluşması halinde pipet ucu yardımı ile kenara getirilerek patlatılır. Jelin donması için 30 dakika bekletildikten sonra taraklar çıkartılır ve jel kullanılabilir.

Bu bağlamda agaroz jel elektroforezinin esas tamponu olan 1 x TBE (Tris-Borik asit-EDTA) konsantre 5 x TBE'nin 1:5 oranında seyreltilmesi ile hazırlanır. 5 x TBE çizelge 4.3.'de sıralanan bileşenlerin eklenerek manyetik karıştırıcıda çözünmesi ile hazırlanır.

Çizelge 4.3. 5 x TBE tampon bileşenleri

| Bileşen | Konsantrasyon | Hacim |
|---|---|---|
| Tris (Bioshop, Kat No TRS001.500) | 0.445 M | 54 g |
| Borik asit (Sigma, Kat No B6768) | 0.445 M | 27.5 g |
| 0.5 M EDTA pH=8.0 | 0.01 M | 20 mL |
| ddH2O | | 1000 mL kadar |

Jel, elektroforez tankına yerleştirilip jelin üzeri kapatacak şekilde 1 x TBE eklenir. RNA örneklerinden 2 ul alınıp 2 ul 5x Green GoTaq Loading Buffer (Promega, Kat No M7911) ile karıştırıldıktan sonra RNA-boya karışımı ikinci kuyucuktan itibaren jele yüklenir. İlk kuyucuğa 5 ul 100bp DNA Ladder plus (Thermofisher Gene Ruler, Kat No SM241) konulur. Tankın kapağı kapatılıp jel 100V'da 20-30 dakika yürütülür. Burada 5X Green GoTaq düşük ve yüksek olmak üzere iki farklı (sarı ve mavi) ağırlıkta boyayı içerir ve elektroforez sırasında RNA'nın göçünü izlemek için kullanılır. DNA ladder ise jel görüntüleme esnasında nükleik asit bantlarının boyutunu belirlemek için uygulanır. 30 dakika sonra agaroz jeli tanktan çıkarılarak "Gene Genius BioImaging System" cihazında görüntülenir.

### 4.2.2. EŞ ZAMANLI TERS TRANSKRİPSİYON POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON (QRT-PCR) YÖNTEMİYLE SEÇİLEN GENLERİN EKSPRESYON VERİSİNİN ORTAYA KONMASI

#### 4.2.2.1. Elde Edilen RNA'lardan cDNA Sentezi

Tez kapsamında belirlenen genlerin ifade analizi qPCR aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk önce izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlenmiştir. cDNA sentezi Roche markasının Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti (Kat No: 04896866001) ile yapılmıştır.

cDNA sentez deneyi iki aşamadan oluşmaktadır: ilki - denaturasyon, ikincisi de - sentez aşamasıdır. Başlangıç total RNA miktarı 500 ng eşittir. Denaturasyon sırasında çizelge 4.4.'de verilen bileşenler 200 ul mikrosantrifüj tüpüne eklenir ve pipetaj yapılarak karıştırılır. Ardından hazırlanan örnek-primer karışımı ThermalCycler T-100 Biorad

cihazında 65°C'de 10 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sonrası hemen buz üzerine alınıp kısaca spin yapılır.

Çizelge 4.4. Bir örnek için cDNA sentezi denatürasyon reaksiyonu kurulumu

| Bileşen | Konsantrasyon | Hacim |
|---|---|---|
| Total RNA | 500 ng RNA | Değişken |
| Random Hexamer Primer, 600 pmol/µl | 60 µM | 2 µl |
| ddH2O | | 13 ul'ye kadar |

Sentez aşamasında çizelge 4.5'de sıralanan bileşenler eklenerek sentez karışımı hazırlanır. Denatürasyon işleminden sonra RNA örneğinin bulunduğu tüpe (13 ul) sentez karışımı eklenir ve pipetaj ile karıştırıır. Toplam hacim 20 ul eşit olur.

Çizelge 4.5. Reverse transcriptase reaksiyonunun kurulumu

| Bileşen | Konsantrasyon | Hacim |
|---|---|---|
| Transkriptor Ters Transkriptaz Reaksiyon Tamponu, 5x kons. | 1x 8 mM $MgCl_2$ | 4 µl |
| RNase İnhibitörü, 40 U/µl | 20 U | 0.5 µl |
| Deoksinükleotit karışımı, her biri 10 mM | 1 mM herbiri | 2 µl |
| Transkriptor Ters Transkriptaz enzimi, 20U/µl | 10 U | 0.5 µl |
| **Toplam** | | **7 µl** |

RNA-senztez karışımını içeren tüp ThermalCycler Biorad T-100 cihazına yerleştirilir ve çizelge 4.6.'da belirlenen sıcaklıklarda inkübe edilir.

Çizelge 4.6. cDNA sentezi için Thermal Cycler cihazında kurulan program

| Adımlar | Sıcaklık | Tutma süresi | Döngü sayısı |
|---|---|---|---|
| Adım 1 | 25°C | 10 dk | 1 |
| Adım 2 | 55°C | 30 dk | 1 |
| Adım 3 | 85°C | 5 dk | 1 |

Ardından Sentezlenen cDNA örneklerin üzerine 80 ul RNase free su eklenir konsantrasyonu 5ng olacak şekilde seyreltilir ve -20°C'li buzdolabında muhafaza edilir.

#### 4.2.2.2. QRT PCR Reaksiyonunun Gerçekleştirilmesi ve Sonucunun Veri Analizi

Sentezlenen cDNA örnekleri ile eş zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (qRT-PCR) Roche LightCycler 480 platformu ile uyumlu olan LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Kat No 04 887 352 001) ile yapılmıştır.

Bunun için önce 200 tümör ve 70 kontrol örneğinin cDNA'ları 384 deep well plakaya dağıtılmıştır. Deep well plakadan çalışma plakasına örnekler Capp 16'lık çok kanallı pipet yardımıyla aktarılmış, üzeri seal ile kapatılıp -20°C dondurucusuna konulmuştur. Çizelge 4.7.'de bir reaksiyonluk qPCR deneyi için gereken bileşenler ve hacimleri yer almaktadır, deney öncesi çalışılacak örnek ve gen sayısına bağlı olarak (üç tekrarlı) bu hacimler üzerinden hesaplamalar yapılıp qPCR karışımı hazırlanır. qPCR reaksiyonu sırasında cDNA içeren 384'lük plaka Gilson Trackman Pipetleme İzleyicine konulur ve Eppendorf Repeater Plus pipet yardımıyla her kuyucuğa 8'er ul önceden hazırlanan qPCR karışımı (primer+Sybr Green mix+su) eklenir. Daha sonra plakanın üzeri seal ile kapatılır ve Beckman Allegra X-12 santrifüj cihazında 1500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir.

Çizelge 4.7. qPCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarı (1 reaksiyonluk)

| **Bileşen** | **Hacim** | **Konsantrasyon** |
|---|---|---|
| SYBR Green Master Mix, 2x | 5 ul | 1x |
| cDNA örneği, 5 ng/ul | 2 ul | 10 ng |
| Forward primer, 10 pmol/ul | 0.5 ul | 0.5 pmol/ul |
| Reverse primer, 10 pmol/ul | 0.5 ul | 0.5 pmol/ul |
| RNase free su | 2 ul | - |
| **Toplam** | **10 ul** | |

Santrifüj sonrası cDNA ve qPCR karışımını içeren plaka Roche LightCycler 480 sistemnine konulur ve çizelge 4.8.'deki programa göre çalıştırılır.

Çizelge 4.8. qPCR program bilgileri

| **Program adı** | **Döngü sayısı** | **Sıcaklık** | **Belirleme modu** | **Süre** | **Analiz modu** |
|---|---|---|---|---|---|
| Pre-inkübasyon | 1 | 95°C | None | 5 dakika | - |
| Amplifikasyon | 45 | 95°C | None | 10 saniye | Kantifikasyon |
| | | değişken | None | 30 saniye | |
| | | 72°C | Single | 30 saniye | |
| Erime sıcaklığı eğrisi | 1 | 95°C | None | 5 saniye | Erime sıcaklığı eğrisi |
| | | 65°C | None | 1 dakika | |
| | | 97°C | Continuous | - | |
| Soğuma | 1 | 40°C | None | 10 sn | - |

Tez çalışması kapsamında qRT PCR deneylerinin sonucu örneklerin kat değişimi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ üzerinden hesaplanmıştır. Burada referans geni olarak B2M ve HPRT kullanılmıştır.

### 4.2.3. SEÇİLEN GENLERİN İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA İLE PROTEİN SEVİYESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Seçilen genler için 200 hastanın tümör FFPE dokularının immünohistokimyasal değerlendirmesi ultraView Universal DAB Detection kiti ile (Ventana, Roche, Kat No 760-500) tam otomatik BenchMark Ultra (Ventana, Roche) cihazında gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk önce mikrotom cihazıyla hastaların FFPE bloklarından kesitler 4 µm kalınlığında yüzeyi pozitif şarjlı olan SuperFrost Ultra Plus lamına (Thermo Scientific, Kat No J3800AMNZ) alınmıştır. Çalışma kapsamında anti-COL5A1 ve anti-FN1 antikorları her lama 2 olgu sığacak şekilde tasarlanmıştır. Bunun ile birlikte anti-COL1A1'in tamamı ve anti-FN1'nın bir kısmı için makroarray blokları hazırlanmıştır. Doku makroarrayinde seçilen blokların en çok tümör içerdiği alanı delinerek 10 olgunun parçaları bir paraffin bloğuna yerleştirilmiştir ve toplam 20 blok oluşturulmuştur. Her makroarray bloğunun 4 mikronluk kesiti bir lama alınmıştır. Makroarray ile birlikte standart lamların köşesine pozitif kontrol doku kesitleri eklenmiştir. Her lam sonra tüm protokol bilgilerini içeren özel barkodlar ile etiketlenmiştir ve 60-120 dakika içerisinde etüvde 70°C sıcaklığında parafinin erimesi ve dokunun lama iyi yapışması için inkübasyona bırakılmıştır. Lamlar daha sonra BenchMark Ultra cihazına yüklenmiş ve çalıştırılmıştır.

UltraView Universal DAB Detection kiti, HRP (Horseradish peroxidase) enzimine konjuge edilen sekonder antikoru içerir ve fare ve tavşan immunoglobulin primer antikorlarına bağlanarak hidrojen peroksidaz substratı ve DAB kromojeni ile kahverengi çökeltileri oluşturur.

Sistem önce deparafinizasyon ve daha sonra iki farklı tamponun (CC1: Tris-EDTA, pH 7.8/ CC2: Sitrat, pH 6.0) birini kullanarak antijen açığa çıkarma işlemini gerçekleştirir. Ardından primer antikor manuel olarak her lamın üzerine uygulanır ve belirli süre inkübe edildikten sonra sekonder antikora maruz bırakılır. En son olarak sırasıyla hemotoksilen ve blueing reaktifi ile boyama yapılır. İşlem bittikten sonra Leica CV5030 otomatik cihazı ile lamların üzeri lamel ile kapatılır.

Her bir antikor asıl örneklerin boyamasına geçmeden önce antikorun veri kağıdında bulunan pozitif kontrol örneklerinde farklı dilüsyon oranları, antijen açığa çıkarma ve primer antikor

inkübasyon süreleri ile denenerek optimize edilmiştir. Antikorların boyanma koşulları çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Antikor boyama koşulları

| Antikor | Kullanılan Örnek | Antijeni açığa çıkarma süresi ve tapmonu | Antikor inkübasyon süresi | Dilüsyon oranı |
|---|---|---|---|---|
| Anti-FN1 antikoru | Normal mesane | 64 dk CC1 | 92 dk | 1:100 |
| Anti-COL5A1 antikoru | Normal mesane | 36 dk CC1 | 60 dk | 1:1000 |
| Anti-COL1A antikoru | Kıkırdak dokusu | 68 dk CC2 | 120 dk | 1:200 |
| Anti-THBS2 antikoru | Tiroid kanseri, meme kanseri, plasenta, kıkırdak dokusu | 64-92dk CC1, 64 dk CC2 | 44-120 dk | 1:100 - 1:50 |

Anti-THBS2 antikoru optimize edilememiştir, yenisi sipariş verilmiştir. Boyama sonrası lamlar patolog uzmanı tarafından değerlendirilmiştir ve boyanan tümör alanlarının yüzdesi, şiddeti ve konumuna (membranöz, sitoplazmik vb) bağlı olarak FN1 ve COL5A1 için 1, 2 ve 3 olarak skorlandırılmıştır. COL1A1 için ise pozitif ve negatif olarak ikiye ayrılmıştır. Belirli kesitler ise slayt tarayıcısı (Pannoramic 250 flash III, 3DHistech) ile taranarak CaseViewer programı üzerinden ek değerlendirilmiştir.

### 4.2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tez çalışması kapsamında genlerin ikili grup ifade karşılaştırması için t test ve Mann Whitney testi kullanılırken 3 ve üzeri karşılaştırmalar için Anova testleri uygulanmıştır. Ayrıca hastaların mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri hastaların hayatta kalım verileri ile ilişkilendirilmiştir. Hastaların genel, metastazsız ve nükssüz sağkalım olasılığı Kaplan-Meier yöntemi ve log-rank testi üzerinden analiz edilmiştir. Hastaların sağkalımı ile prediktör faktörlerinin ilişkisi tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi aracılığıyla oluşturulmuştur. Çalışma kapsamında değerlendirilen genlerin ifadelerinin genel, nükssüz ve metastazsız sağkalımı ile ilişkisi önce tek değişkenli Cox regresyonu ile analiz edilmiştir. Daha sonra herbir genin bağımsız prognostik etkisini tahmin etmek amacıyla çok değişkenli Cox regresyonu kullanılmıştır. Çok değişkenli Cox regresyon analizi birkaç risk faktörünün hayatta kalma süresi üzerindeki etkisini aynı anda değerlendirme imkanını sağlamaktadır. Tek değişkenli analizde log-rank testi üzerinden anlamlılık sergileyen değişkenler çok değişkenli Cox modelinde değerlendirilmiş olup burada da anlamlı olanlar bağımsız prognostik faktör olma potansiyelini taşımaktadır. Tehlike oranı (Hazard Ratio, HR) ve

karşılık gelen %95 güven aralığı (CI) da Cox regresyonu ile hesaplanmıştır. Tüm analizler GraphPad Prism 9 ve IBM SPSS Statistics 23.0 kullanılarak yapılmış ve $p < 0.05$ olduğunda farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı varsayılmıştır.

# 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

## 5.1. RNA İZOLASYONU BULGULARI

### 5.1.1. ELDE EDİLEN RNA'LARIN MİKTARI

Tez kapsamında Qiagen RNeasy FFPE kiti ile kolorektal kanser hastasının formalin fiksasyonu yapılıp parafine gömülü 200 tümör ve 70 kontrol dokularından RNA izole edilmiştir. Elde edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop 1000 aracılığıyla spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Burada RNA saflığının göstergesi olarak 260/A280 ve 260/A230 oranları dikkate alınmıştır. Bu doğrultuda tümör ve kontrol örneklerinin ortalama, maksimum ve minimum RNA izolasyon değerleri çizelge 5.1.'de sunulmuştur. Tüm örneklerin RNA izolasyon sonuçları ek 1 ve 2 olarak tezin sonuna eklenmiştir.

Elde edilen örneklerin ortalama 260/A280 ve 260/A230 oranları 2.0'ye eşittir. RNA konsantrasyonu ise 400 ng/ul civarındadır. Bu bağlamda cDNA sentezine 500 ng RNA ile giriş yapıldığından tüm izole edilen RNA'lar olabilecek pipet hatasından kaçınılmak adına 500 ng/ul'ye eşit veya ondan düşük olacak şekilde sulandırılmıştır.

Çizelge 5.1. Tümör ve kontrol örneklerinin ortalama ve minimum, maksimum RNA izolasyon değerleri

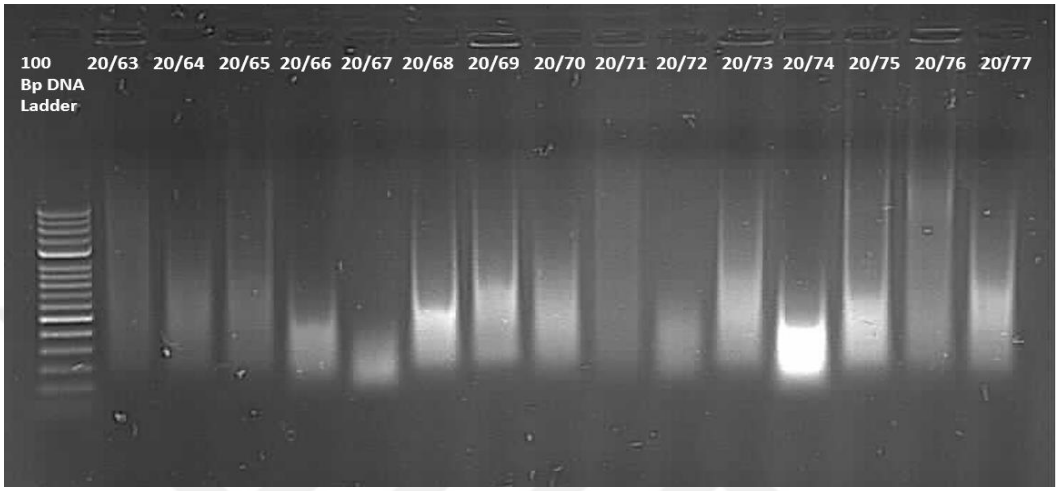
| Örnek türü | Ortalama konsantrasyon, ng/ul | Ortalama 260/280 | Ortalama 260/230 |
|---|---|---|---|
| Tümör | 424.5 (119.5-535.5) | 2.0 (1.6-2.2) | 2.0 (1.2-2.2) |
| Kontrol | 436.9 (196.7-450.8) | 2.0 (1.9-2.1) | 2.0 (1.7-2.2) |

### 5.1.2. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ BULGULARI

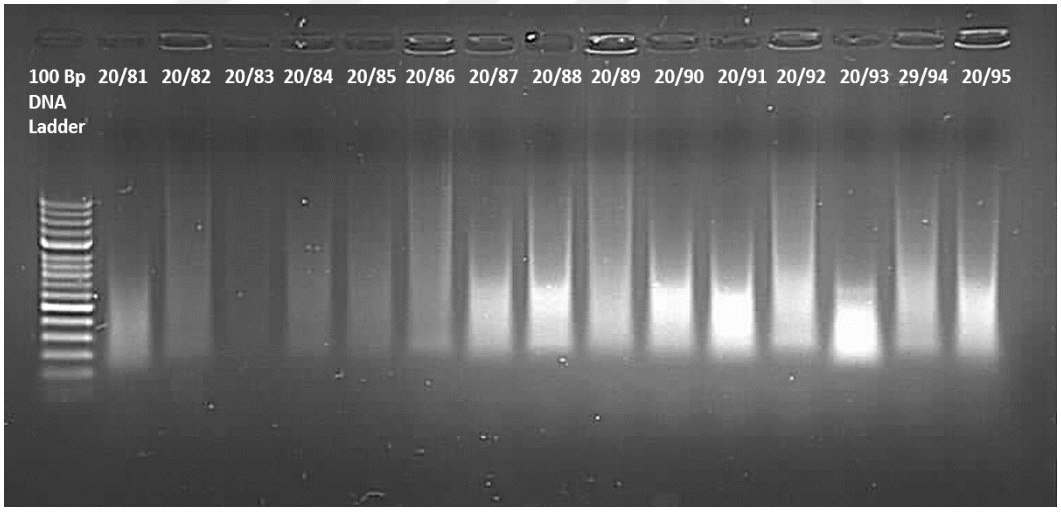
Sonraki adım olarak agaroz elektroforezi aracılığıyla izole edilen RNA örneklerin kalitesi incelenmiştir. Bunun için örnekler %1'lik agaroz jelinde 100V hızda yürütülerek "Gene Genius BioİmagingSystem" cihazında gürüntülenmiştir. Örneklerin birkaçı şekil 5.1.-5.3.'de sunulmaktadır.

RNA izolasyonu tümör ve kontrol FFPE dokuları üzerinden yapıldığı için elde edilen RNA'lar degrade formdadır. FFPE dokuları fiksasyon aşamasında formaldehit ile çapraz bağlanma ve kimyasal modifikasyonuna uğrarken aynı zamanda bu işlemlerin inkübasyon

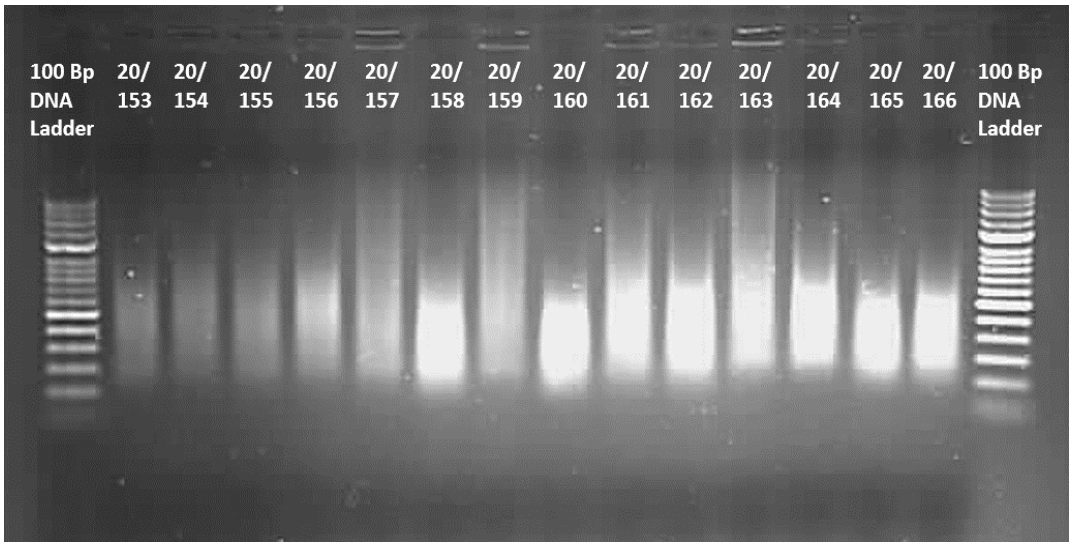
süresi, parafinin sıcaklığı ve dokuların uzun süre saklanması RNA'ların parçalanmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla şekil 5.1.-5.3.'de verildiği üzere fragmente RNA'ların elde edilmesi tamamıyla doku kaynaklıdır. Bu nedenle de poli-A kuyruğundan başlayan RNA degradasyonunun önüne geçebilmek için qPCR çalışmalarında primerler, amplikon uzunluğu 100-150 bp geçmeyecek şekilde tasarlanmıştır.




Şekil 5.1. 20/63-20/77 RNA örneklerinin %1 agaroz jel görüntüsü




Şekil 5.2. 20/81-20/95 RNA örneklerinin %1 agaroz jel görüntüsü



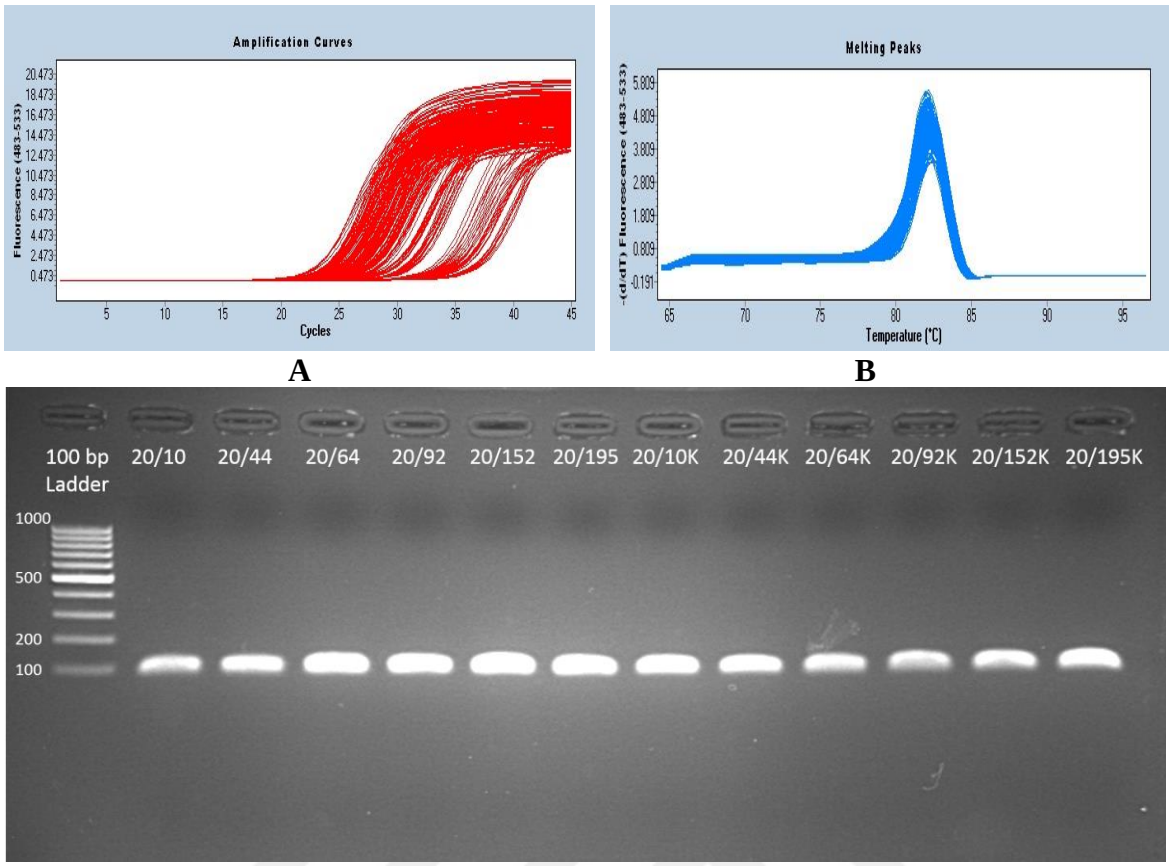

Şekil 5.3. 20/153-20/166 RNA örneklerinin %1 agaroz jel görüntüsü

## 5.2. QRT-PCR YÖNTEMİYLE İFADESİ BELİRLENEN GENLERİN DEĞERLENDİRMESİ

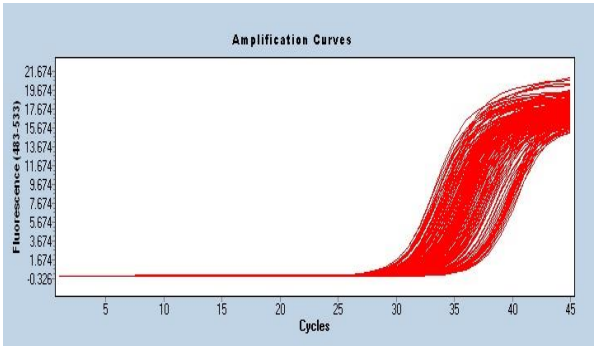
### 5.2.1. TÜMÖR VE KONTROL ÖRNEKLERİNİN VALİDASYON BULGULARI

200 KRK hastasının tümör ve 70 eşli kontrol FFPE dokuları üzerinden izole edilen RNA'lardan daha sonra cDNA sentezlenmiş ve qRT-PCR reaksiyonu Roche LightCycler 480 platformunda gerçekleştirilmiştir. Deneyler üç teknik tekrar ile yapılmıştır. Reaksiyon sonrası rastgele seçilen örneklerin PCR ürünleri %2 agaroz jelinde 100 V'da yürütülüp amplifikasyon sonuçları jel görüntüsü ile doğrulanmıştır. qRT-PCR sonucu her gen için elde edilen amplifikasyon ve erime eğrileri, ürünlerin jel görüntüleriyle beraber şekil 5.4.-5.9.'da verilmektedir.

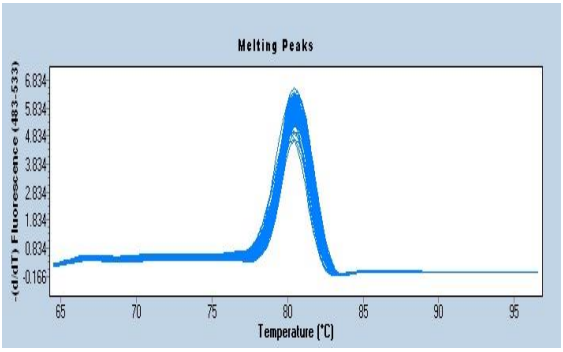
Burada *B2M* ve *HPRT* genleri referans gen olarak görev görmektedir ve denemeler sonucu *B2M* için 57°C, *HPRT* için ise 59°C bağlanma sıcaklığının en iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Bu iki genin şekil 5.4. ve 5.5.'de sunulan sonuçlarına göre amplifikasyon başarıyla gerçekleştirilmiş olup *B2M* 86 baz çiftlik, *HPRT* deneyi ise 94 baz çiftlik spesifik ürün ile sonuçlanmıştır.



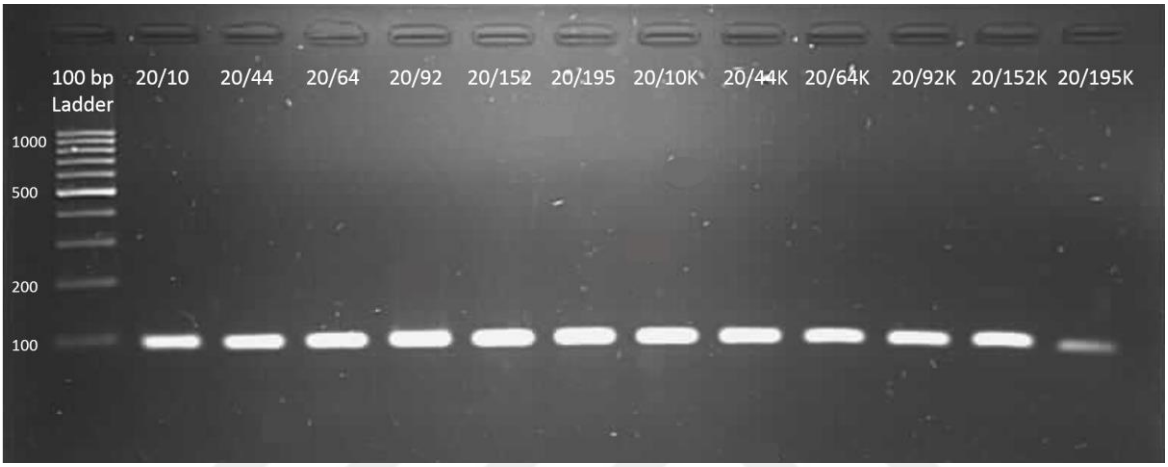

Şekil 5.4. *B2M* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü




A



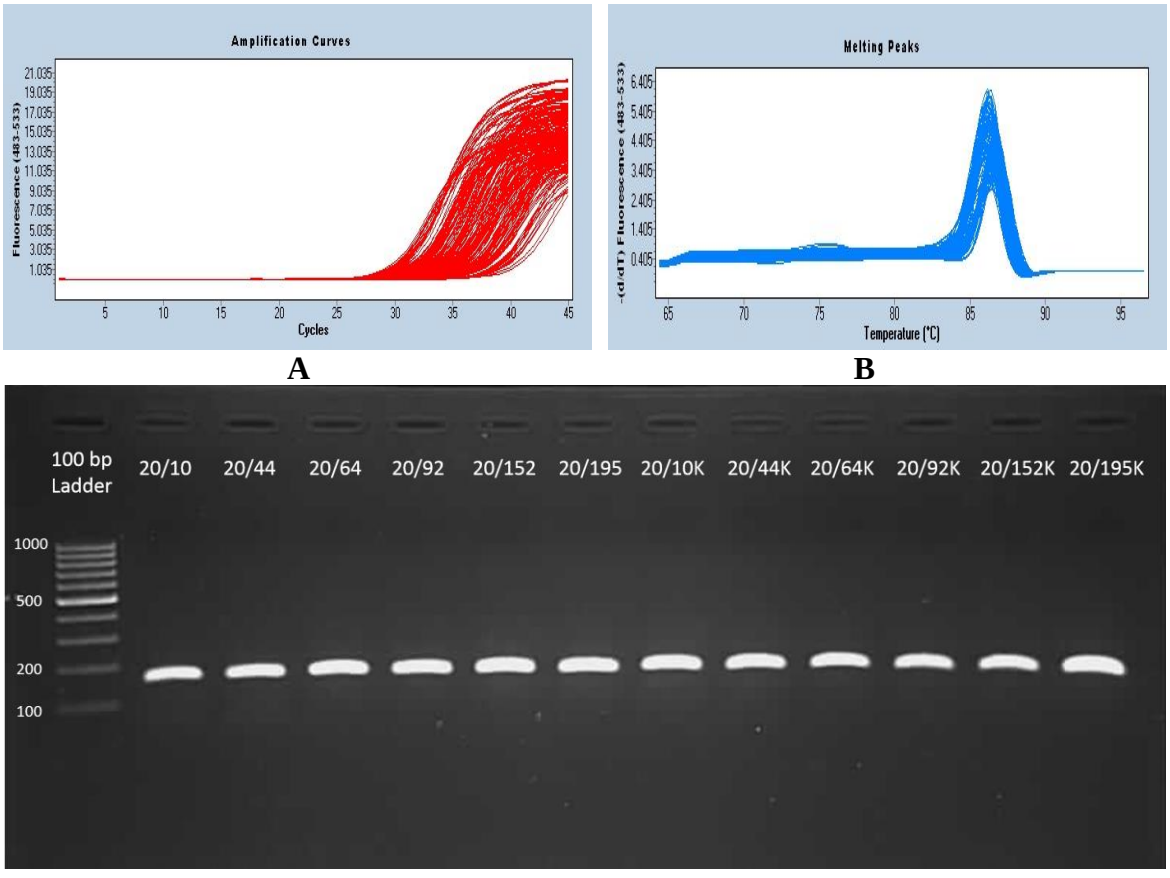

B




C

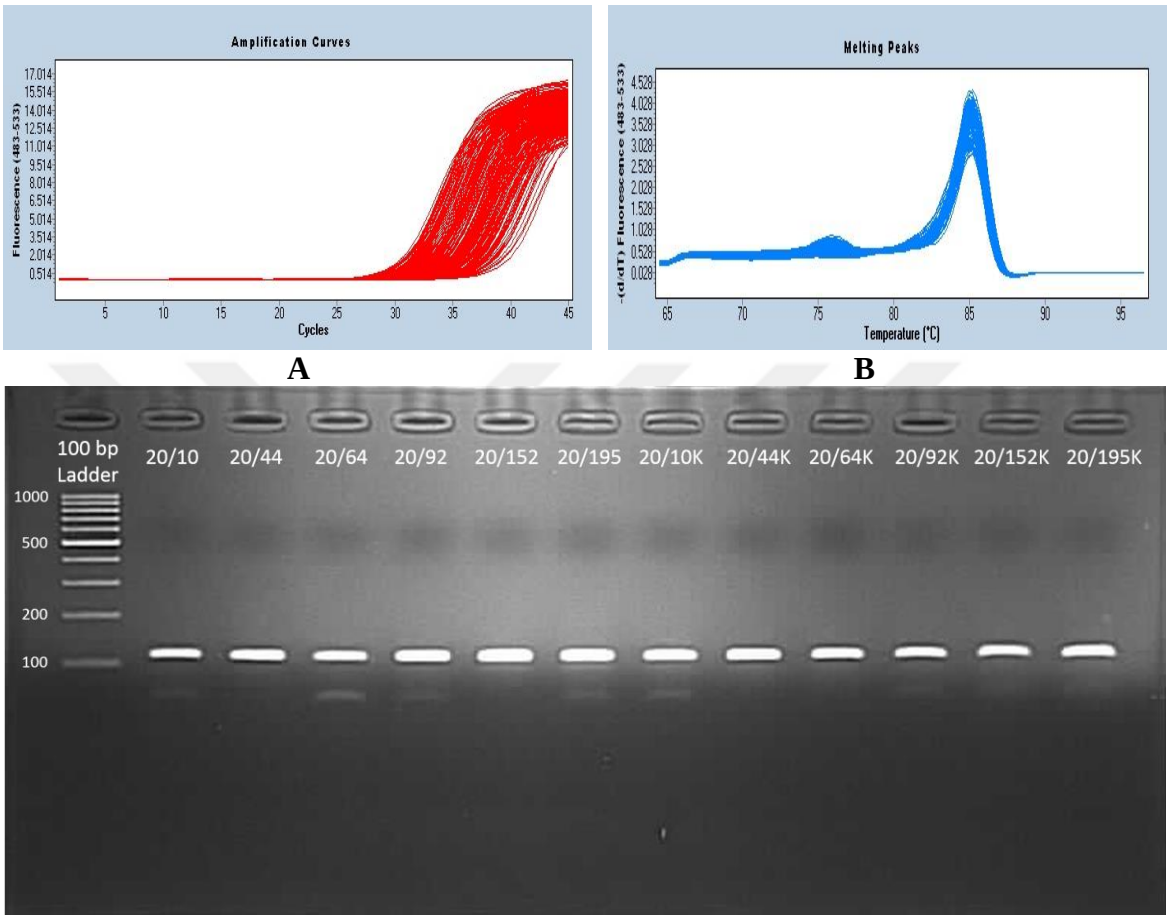
Şekil 5.5. *HPRT* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü

*COL1A1* geninin primer bağlanma sıcaklığı 56°C olarak belirlenmiştir. Agaroz jelinde görüldüğü üzere qRT PCR deneyi sonucu 156 baz çiftlik ürün elde edilmiştir. Deney sonucu şekil 5.6'da sunulmuştur.



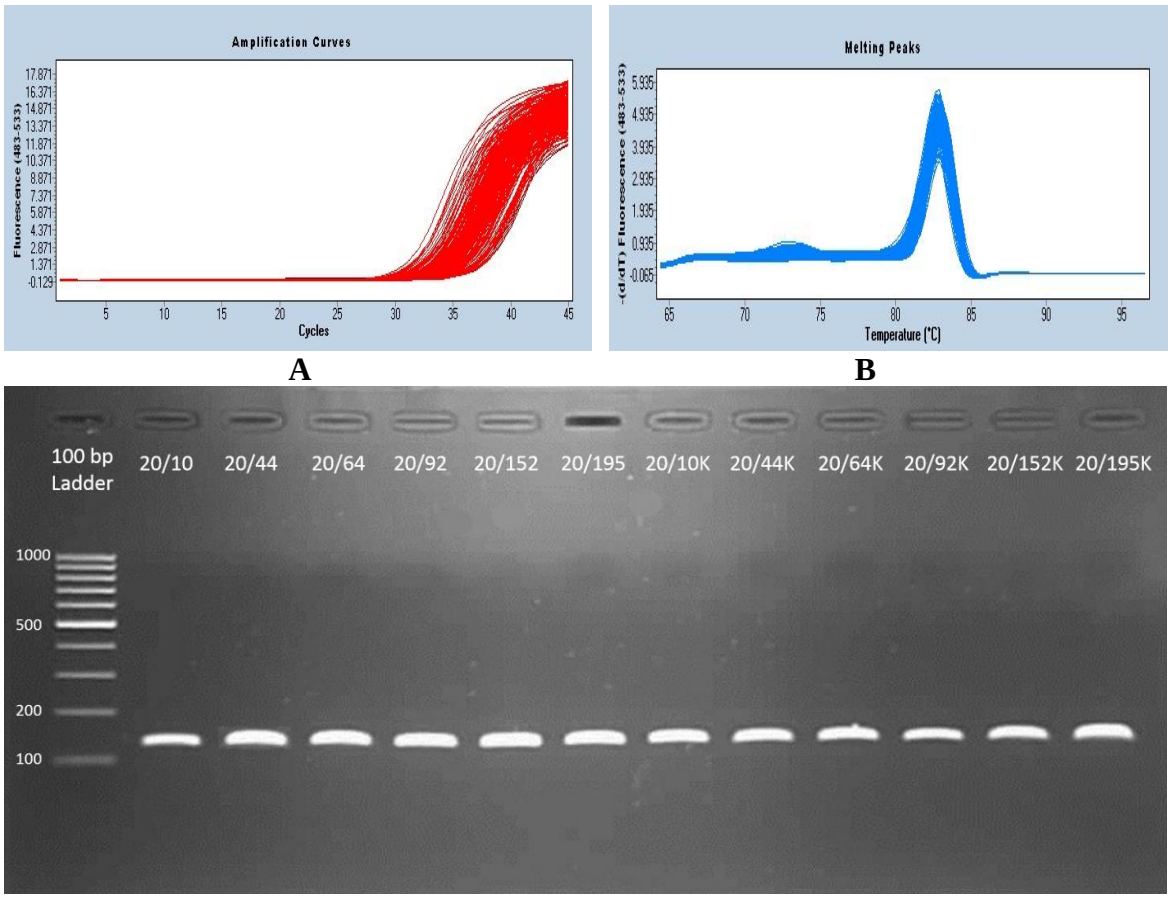

Şekil 5.6. *COL1A1* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü

Diğer çalışma geni olan *COL5A1* 55°C primer bağlanma sıcakılığında çalıştırılmış olup, sonuç şekil 5.7.'de yer almaktadır. Burada erime eğrisinde hafif primer-dimer gözlemlenmiş olup bu dimer %2'lik agaroz jelinde de görülmektedir. Bununla birlikte deney sonucu istenilen 112 baz çiftlik ürün elde edilmiştir.



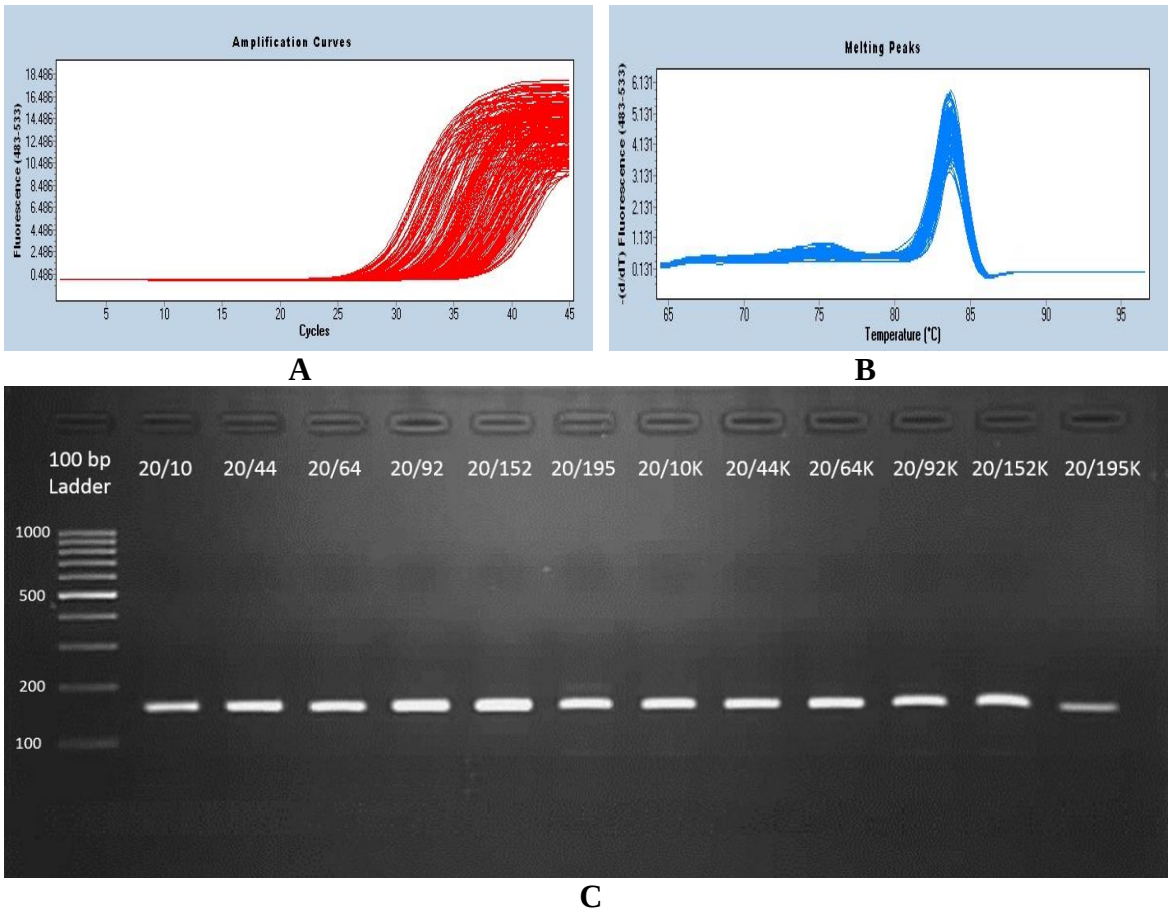

Şekil 5.7. *COL5A1* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü

*THBS2* geni 0.5M MgCl2 ilavesi ile birlikte 60°C bağlanma sıcaklığında çalıştırılmış ve 128 baz çiftlik amplikon elde edilmiştir. Çalışmanın erime eğrisinde çok hafif primer dimer gözlemlenmektedir. Sonuç şekil 5.8.'de yer almaktadır.



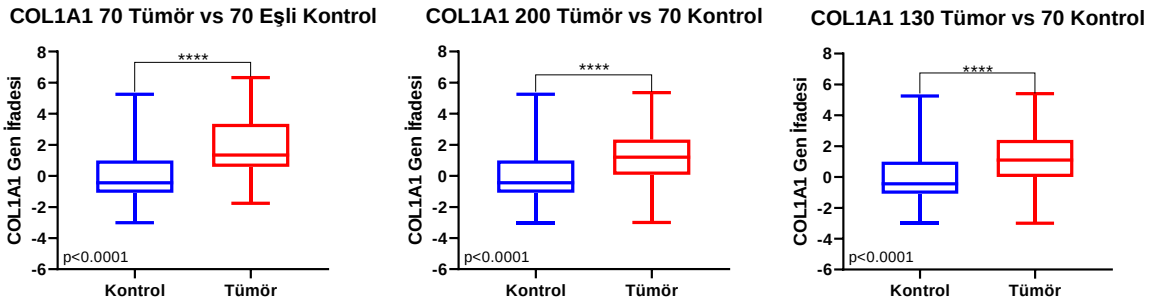

Şekil 5.8. *THBS2* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü

*FN1* geninin qRT-PCR sonucu şekil 5.9.'da verilmektedir. *FN1* primerinin optimal bağlanma sıcaklığı 55°C olarak belirlenmiş olup aynı *COL5A1*'deki gibi erime eğrisinde hafif primer dimer gözlenmektedir. Deney sonucu 155 baz çiftlik amplikon elde edilmiştir.



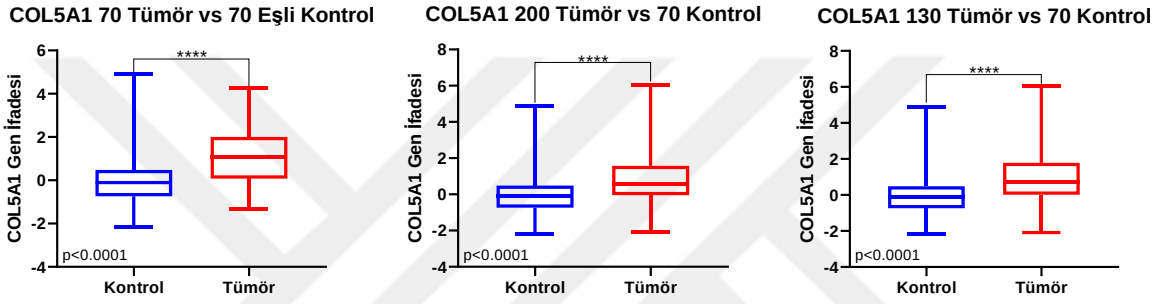

Şekil 5.9. *FN1* geni için qPCR sonucu: A – amplifikasyon eğrisi, B – erime eğrisi, C – agaroz jel görüntüsü

Neticede, olguların 200 tümör ve 70 eşli kontrol örneklerinin qRT-PCR deneyleri başarıyla tamamlanmıştır ve genlerin ekspresyon verisi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü üzerinden hesaplanmıştır. Önceden de belirtildiği üzere aday genler B2M ve HPRT referans genleri ile normalize edilmiştir (şekil 5.4., 5.5.). Burada tümör ve kontrol grupları: 200 tümör vs 70 kontrol, 130 tümör vs 70 kontrol ve 70 tümör ve 70 eşli kontrol şeklinde karşılaştırılmış olup genlerin kat değişimi şekil 5.10.-5.13.'de ve çizelge 5.2'de sunulmuştur. Ayrıca bu genler için qPCR sonucu elde edilen ham verinin - Ct değerlerinin ortalaması ek 4 ve 5 olarak ekler kısmında da verilmiştir. Sonuç olarak tüm genlerin ekspresyonu tümör örneklerinde kontrol ile kıyasla daha yüksek bulunmuş ve önceki yapılan çalışmalar ile uyumluluk göstererek valide olmuştur.



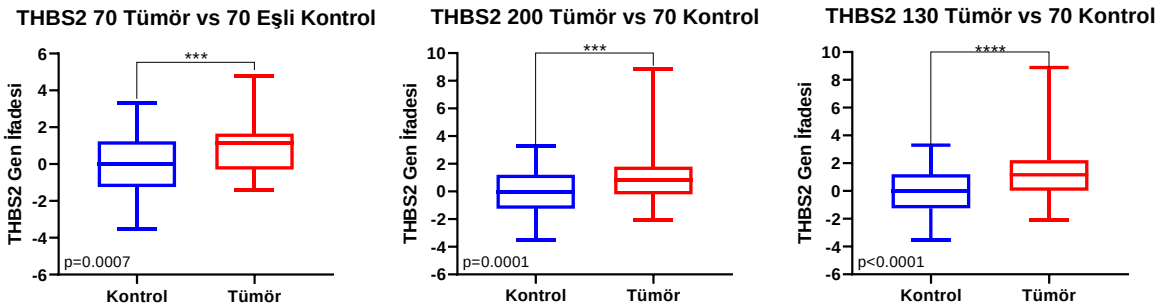

**A** **B** **C**

Şekil 5.10. *COL1A1* geni için tümör ve kontrol grup karşılaştırması: A – 70 tümör ve eşli kontrol, B – 200 tümör ve 70 kontrol, C – 130 tümör ve 70 kontrol



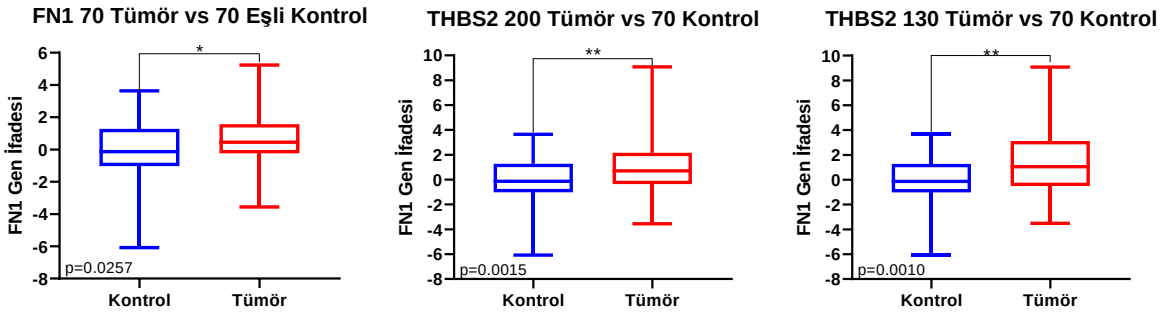

**A** **B** **C**

Şekil 5.11. *COL5A1* geni için tümör ve kontrol grup karşılaştırması: A – 70 tümör ve eşli kontrol, B – 200 tümör ve 70 kontrol, C – 130 tümör ve 70 kontrol




**A** **B** **C**

Şekil 5.12. *THBS2* geni için tümör ve kontrol grup karşılaştırması: A – 70 tümör ve eşli kontrol, B – 200 tümör ve 70 kontrol, C – 130 tümör ve 70 kontrol




**A** **B** **C**

Şekil 5.13. *FN1* geni için tümör ve kontrol grup karşılaştırması: A – 70 tümör ve eşli kontrol, B – 200 tümör ve 70 kontrol, C – 130 tümör ve 70 kontrol

Çizelge 5.2. Tüm aday genler için tümör ve kontrol gruplarının karşılaştırması ve kat değişimi

| Gen ismi | 70 KRK tümör ve eşli kontrol | | 200 KRK tümör ve 70 kontrol | | 130 KRK tümör ve 70 kontrol | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Kat değişimi | p değeri | Kat değişimi | p değeri | Kat değişimi | p değeri |
| COL1A1 | 3.8 | <0.0001 | 2.1 | <0.0001 | 2.2 | <0.0001 |
| COL5A1 | 1.8 | <0.0001 | 1.8 | <0.0001 | 2.2 | <0.0001 |
| THBS2 | 1.9 | 0.0007 | 4.8 | 0.0001 | 6.6 | <0.0001 |
| FN1 | 1.6 | 0.0257 | 9.0 | 0.0015 | 13.1 | 0.0010 |

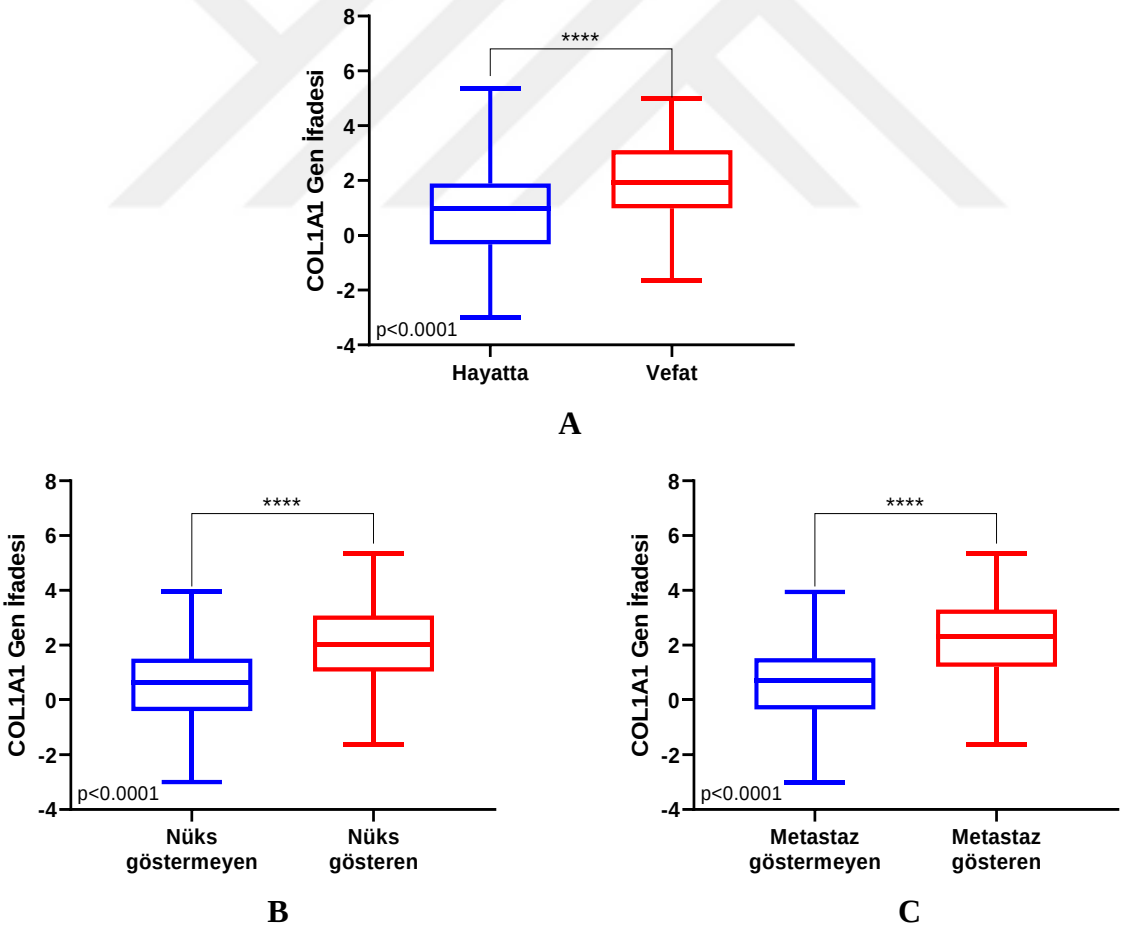
Burada tüm gruplar için (200 tümör vs 70 kontrol, 130 tümör vs 70 kontrol ve 70 tümör ve eşli kontrol) yapılan karşılaştırmalarda tümör örneklerinde kontrol ile kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur. Bu bağlamda *COL1A1* geni için en yüksek artış 70 tümör ve eşli kontrol grubunda görülmüşken diğer *COL5A1, THBS2* ve *FN1* aday biyobelirteçler için en yüksek ve anlamlı artış 130 tümör vs 70 kontrol gruplarında gözlemlenmiştir.

### 5.2.2. 200 TÜMÖR ÖRNEĞİNİN HAYATTA KALIM VE NÜKS-METASTAZ İLİŞKİ BULGULARI

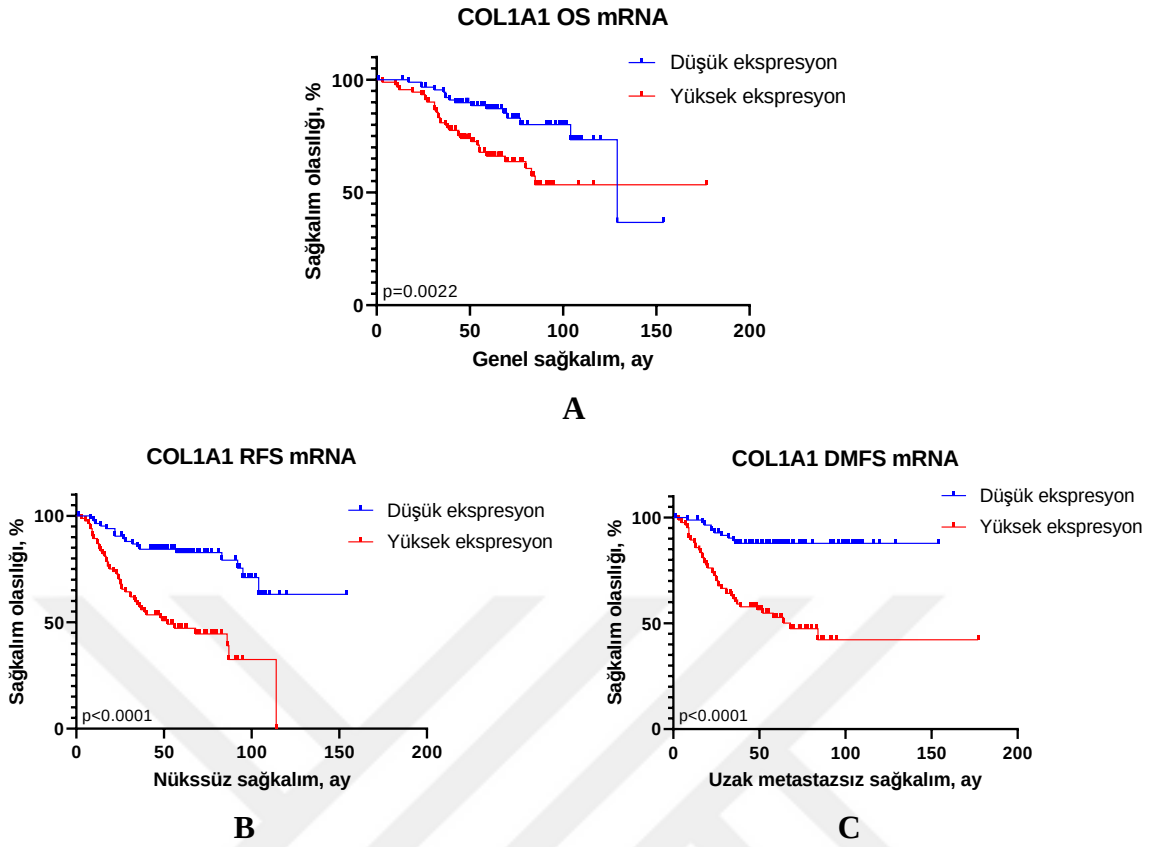
Tez çalışması kapsamında *B2M, HPRT, COL5A1, COL1A1, FN1* ve *THBS2* genlerinin prognostik gücünü denetlemek adına 200 hastanın tümör cDNA örnekleri ile qRT-PCR deneyi kurulmuştur. Deney sonucu amplifikasyonun verimli geçtiği ve spesifik ürün elde edildiği gözlemlenmektedir. *B2M, HPRT, COL5A1, COL1A1, FN1* ve *THBS2* genlerine ait amplifikasyon ve erime eğrileri önceki bölümde, şekil 5.4-5.9.'da sunulmuştur. *COL1A1, COL5A1, THBS2 ve FN1* genlerinin 200 tümör örneklerinde yapılan qRT-PCR ham verisi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü üzerinden değerlendirilmiştir. Daha sonra vefat eden, nüks ve metastaz

gösteren grupların ekspresyon değişimi t test ve Mann Whitney testi üzerinden belirlenmiştir. Ayrıca genlerin eskpresyon verilerine göre hastalar median değerinden ikiye ayrılarak düşük ve yüksek eskpresyon olarak sınıflandırılmıştır ve Kaplan Meier eğrisi çizilmiştir. Bu aday genlerin prognostik özelliği önce tek değişkenli Cox analizi üzerinden denetlenmiştir. Ardından, tanı yaşı, cinsiyet, grade ve TNM evresi parametreleri ile ve tek değişkenli Cox analizinde ortaya çıkan diğer önemli değişkenleri içeren çok değişkenli Cox regresyonu yapılmıştır.

*COL1A1* geninin vefat eden, nüks ve uzak metastaz gösteren gruplarındaki ifade değişimi şekil 5.14.'de, Kaplan-Meier eğrileri şekil 5.15.'de, Cox regresyon analizi ise çizelge 5.3.-5.5.'de sunulmuştur. Burada *COL1A1* ifadesi genel sağkalım, nükssüz ve uzak metastazsız sağkalım ile ilşkili bulunmuş olup çok değişkenli Cox regresyon analizi ile bu genin KRK hastalarının sağkalım tahminlerinde evre belirteci yanında bağımsız bir faktör olabileceği belirlenmiştir.




Şekil 5.14. *COL1A1* geninin A - vefat eden, B – nüks gösteren ve C – metastaz gösteren gruplarında kat değişimi




Şekil 5.15. *COL1A1* Kaplan-Meier sağkalım eğrisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım

Çizelge 5.3. *COL1A1* ekspresyonu ile genel sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 1.004 (0.980-1.030) | 0.728 | 1.010 (0.984-1.037) | 0.440 |
| Cinsiyet | 1.051 (0.592-1.867) | 0.865 | 0.907 (0.486-1.690) | 0.758 |
| Grade | 0.803 (0.367-1.757) | 0.583 | 0.683 (0.683-0.288) | 0.386 |
| TNM Evresi | 1.602 (0.986-2.603) | 0.057 | 1.543 (0.931-2.557) | 0.093 |
| COL1A1 İfadesi | 2.143 (1.190-3.857) | **0.011*** | 2.186 (1.184-4.038) | **0.012*** |

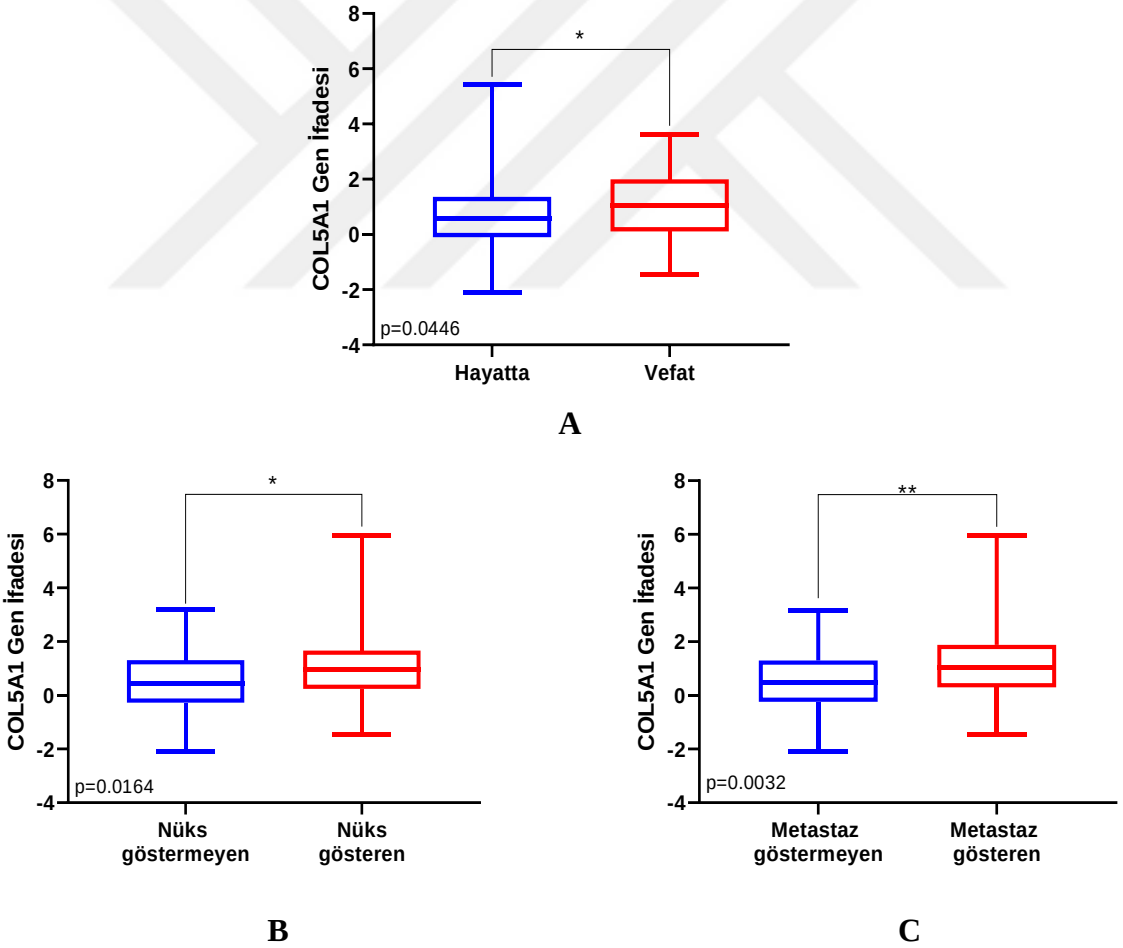
Çizelge 5.4. *COL1A1* ekspresyonu ile nükssüz sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 0.984 (0.964-1.004) | 0.121 | 0.993 (0.972-1.014) | 0.515 |
| Cinsiyet | 0.897 (0.541-1.489) | 0.675 | 0.650 (0.375-1.126) | 0.125 |
| Grade | 0.891 (0.473-1.677) | 0.720 | 0.475 (0.223-1.011) | 0.053 |
| TNM Evresi | 2.134 (1.339-3.399) | **0.001*** | 2.298 (1.427-3.703) | **0.001*** |
| COL1A1 İfadesi | 3.768 (2.168-6.548) | **<0.0001*** | 4.321 (2.411-7.742) | **<0.0001*** |

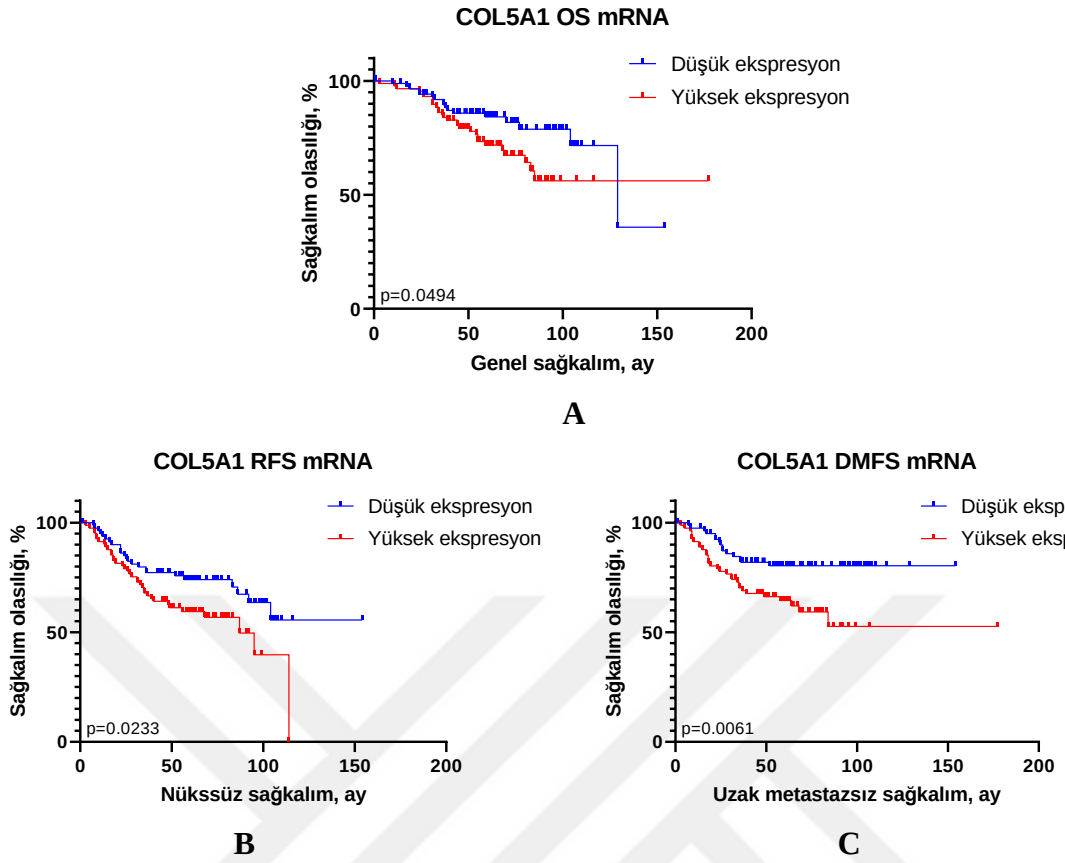
Çizelge 5.5. *COL1A1* ekspresyonu ile uzak metastazsız sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 0.992 (0.969-1.015) | 0.489 | 0.997 (0.974-1.021) | 0.794 |
| Cinsiyet | 0.765 (0.426-1.374) | 0.370 | 0.473 (0.251-0.892) | 0.021 |
| Grade | 0.613 (0.267-1.405) | 0.247 | 0.322 (0.118-0.880) | 0.027 |
| TNM Evresi | 2.032 (1.208-3.419) | **0.008*** | 2.529 (1.487-4.301) | **0.001*** |
| COL1A1 İfadesi | 4.846 (2.477-9.483) | **<0.0001*** | 6.105 (3.016-12.360) | **<0.0001*** |

*COL5A1* geninin vefat eden, nüks ve metastaz gösteren gruplarındaki ifade değişimi şekil 5.16.'da Kaplan-Meier eğrileri şekil 5.17.'de, Cox regresyon analizi ise çizelge 5.6.-5.8.'de sunulmuştur. Burada *COL5A1* ifadesi genel sağkalım, nükssüz ve uzak metastazsız sağkalım ile ilşkili bulunmuş olup çok değişkenli Cox regresyon analizi ile bu genin KRK hastalarının sağkalım tahminlerinde evre belirteci yanında bağımsız bir faktör olabileceği belirlenmiştir.




Şekil 5.16. *COL5A1* geninin A - vefat eden, B – nüks gösteren ve C – metastaz gösteren gruplarında kat değişimi




Şekil 5.17. *COL5A1* Kaplan-Meier sağkalım eğrisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım

Çizelge 5.6. *COL5A1* ekspresyonu ile genel sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 1.004 (0.980-1.030) | 0.728 | 1.004 (0.977-1.031) | 0.792 |
| Cinsiyet | 1.051 (0.592-1.867) | 0.865 | 0.925 (0.497-1.724) | 0.807 |
| Grade | 0.803 (0.367-1.757) | 0.583 | 0.624 (0.276-1.412) | 0.258 |
| TNM Evresi | 1.602 (0.986-2.603) | 0.057 | 1.628 (0.968-2.737) | 0.066 |
| COL5A1 İfadesi | 1.855 (1.024-3.363) | **0.042*** | 1.921 (1.028-3.587) | **0.041*** |

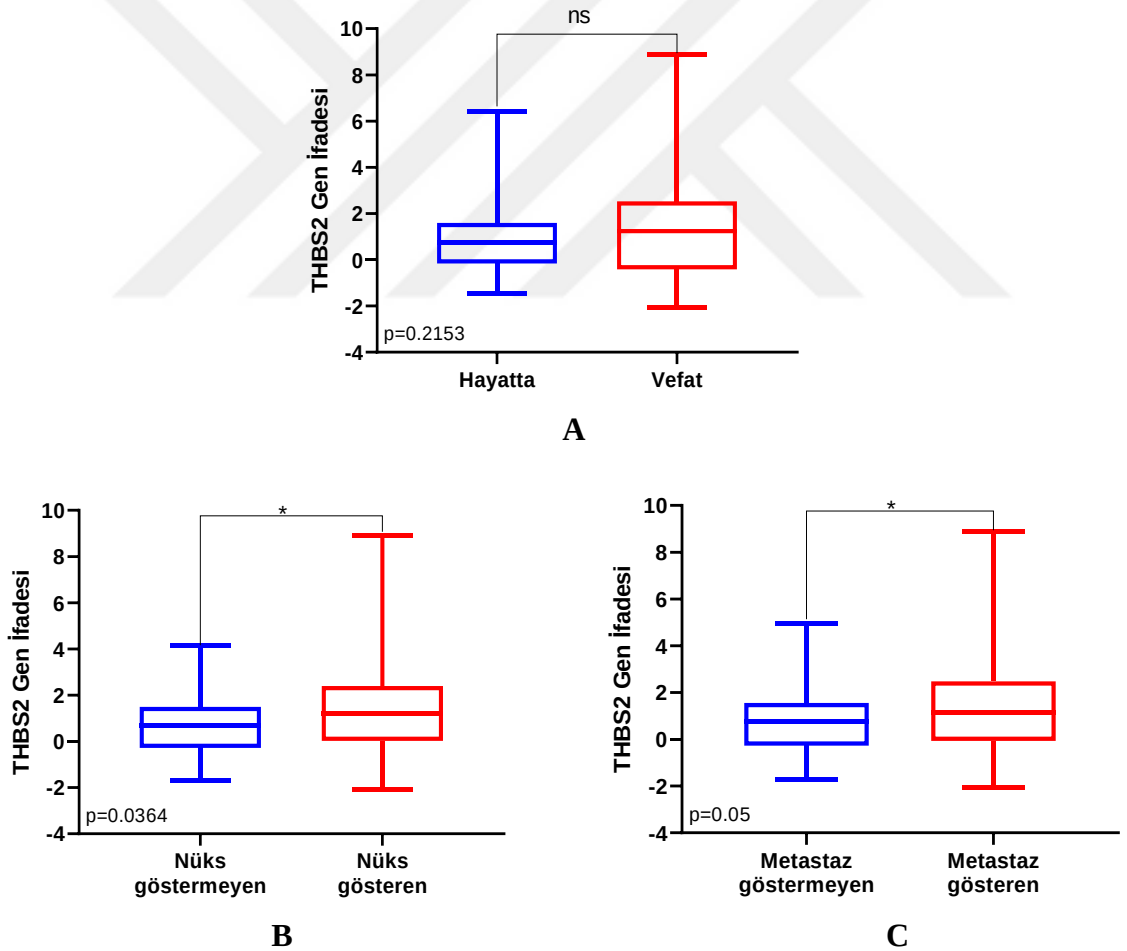
Çizelge 5.7. *COL5A1* ekspresyonu ile nükssüz sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 0.984 (0.964-1.004) | 0.121 | 0.981 (0.959-1.003) | 0.091 |
| Cinsiyet | 0.897 (0.541-1.489) | 0.675 | 0.669 (0.387-1.155) | 0.149 |
| Grade | 0.891 (0.473-1.677) | 0.720 | 0.461 (0.228-0.931) | 0.031 |
| TNM Evresi | 2.134 (1.339-3.399) | **0.001*** | 2.503 (1.509-4.152) | **<0.0001*** |
| COL5A1 İfadesi | 1.919 (1.150-3.200) | **0.013*** | 2.413 (1.396-4.171) | **0.002*** |

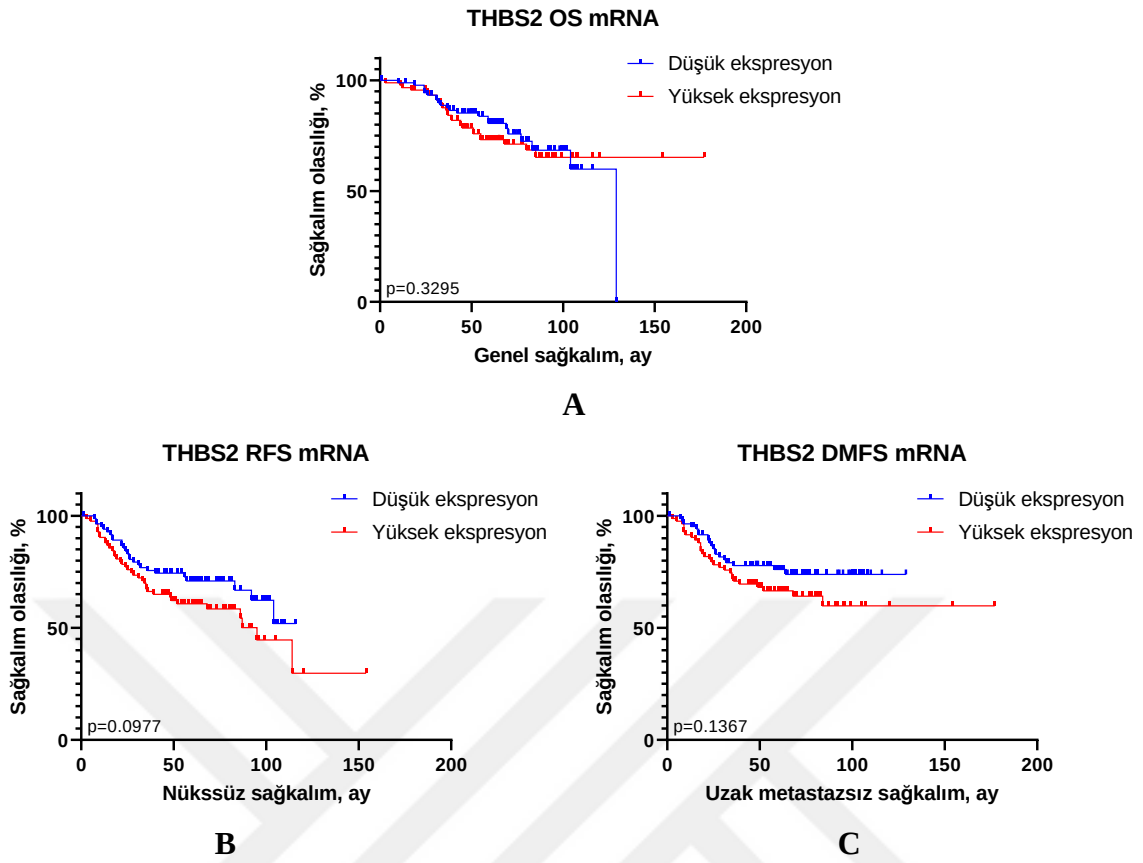
Çizelge 5.8. *COL5A1* ekspresyonu ile uzak metastazsız sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 0.992 (0.969-1.015) | 0.489 | 0.982 (0.958-1.008) | 0.172 |
| Cinsiyet | 0.765 (0.426-1.374) | 0.370 | 0.491 (0.263-0.917) | 0.026 |
| Grade | 0.613 (0.267-1.405) | 0.247 | 0.282 (0.115-0.688) | 0.005 |
| TNM Evresi | 2.032 (1.208-3.419) | **0.008*** | 2.479 (1.558-4.851) | **<0.0001*** |
| COL5A1 İfadesi | 2.532 (1.381-4.641) | **0.003*** | 3.637 (1.900-6.961) | **<0.0001*** |

*THBS2* geninin vefat eden, nüks ve metastaz gösteren gruplarındaki ifade değişimi şekil 5.18.'de, Kaplan-Meier eğrileri şekil 5.19.'da, Cox regresyon analizi ise çizelge 5.9.-5.11.'da sunulmuştur. Burada *THBS2* ifadesi nüks veya metastaz gösteren gruplarda yüksek bulunsa bile hayatta kalım analizi sonucu genel, nükssüz ya da uzak metastazsız sağkalım ile ilişkili bulunamamıştır.




Şekil 5.18. *THBS2* geninin A - vefat eden, B – nüks gösteren ve C – metastaz gösteren gruplarında kat değişimi




Şekil 5.19. *THBS2* Kaplan-Meier sağkalım eğrisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım

Çizelge 5.9. *THBS2* ekspresyonu ile genel sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 1.004 (0.980-1.030) | 0.728 | 1.007 (0.981-1.034) | 0.589 |
| Cinsiyet | 1.051 (0.592-1.867) | 0.865 | 0.935 (0.503-1.738) | 0.833 |
| Grade | 0.803 (0.367-1.757) | 0.583 | 0.715 (0.315-1.628) | 0.425 |
| TNM Evresi | 1.602 (0.986-2.603) | 0.057 | 1.604 (0.955-2.695) | 0.074 |
| THBS2 İfadesi | 1.284 (0.723-2.28) | 0.394 | 1.338 (0.732-2.443) | 0.344 |

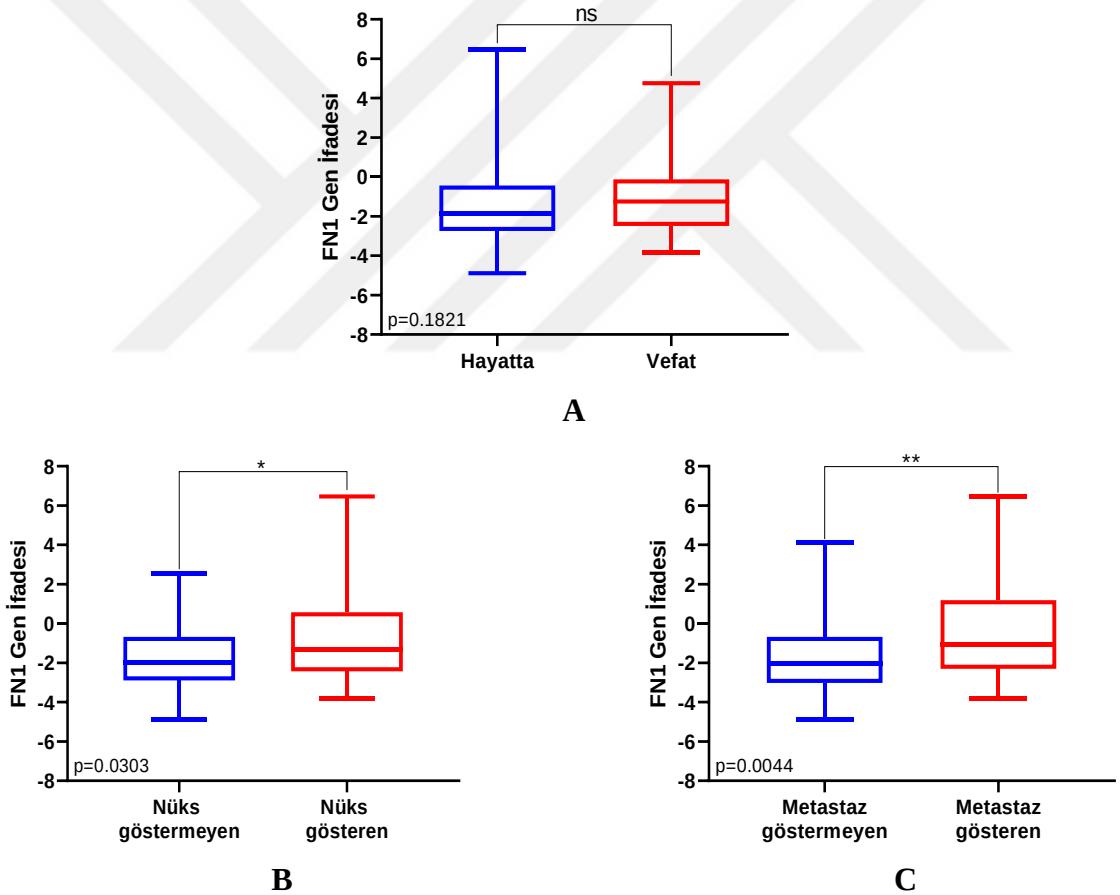
Çizelge 5.10. *THBS2* ekspresyonu ile nükssüz sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 0.984 (0.964-1.004) | 0.121 | 0.987 (0.966-1.009) | 0.243 |
| Cinsiyet | 0.897 (0.541-1.489) | 0.675 | 0680 (0.394-1.175) | 0.167 |
| Grade | 0.891 (0.473-1.677) | 0.720 | 0.603 (0.301-1.204) | 0.152 |
| TNM Evresi | 2.134 (1.339-3.399) | **0.001*** | 2.363 (1.445-3.865) | **0.001*** |
| THBS2 İfadesi | 1.508 (0.911-2.494) | 0.110 | 1.715 (1.019-2.888) | 0.042 |

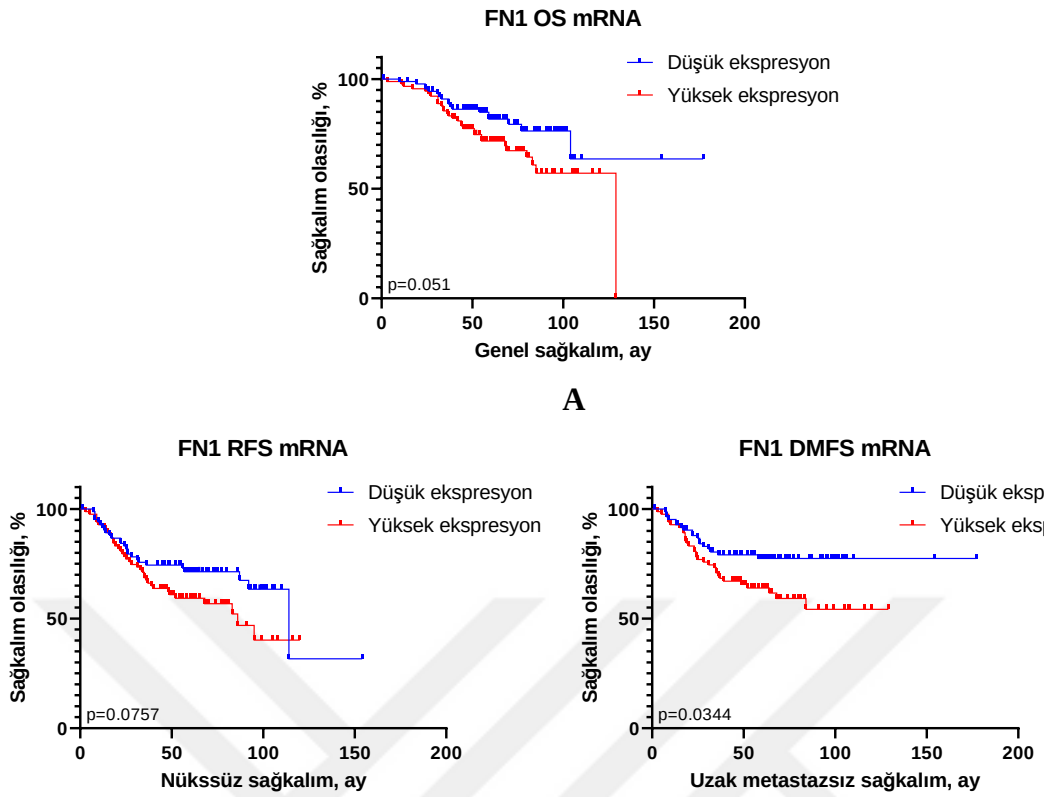
Çizelge 5.11. *THBS2* ekspresyonu ile uzak metastazsız sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 0.992 (0.969-1.015) | 0.489 | 0.993 (0.969-1.017) | 0.570 |
| Cinsiyet | 0.765 (0.426-1.374) | 0.370 | 0.534 (0.286-0.997) | 0.049 |
| Grade | 0.613 (0.267-1.405) | 0.247 | 0.406 (0.164-1.007) | 0.052 |
| TNM Evresi | 2.032 (1.208-3.419) | **0.008*** | 2.551 (1.468-4.435) | **0.001*** |
| THBS2 İfadesi | 1.554 (0.878-2.751) | 0.130 | 1.737 (0.967-3.120) | 0.065 |

*FN1* geninin vefat eden, nüks ve metastaz gösteren gruplarındaki ifade değişimi şekil 5.20.'de, Kaplan-Meier eğrileri şekil 5.21.'de, Cox regresyon analizi ise çizelge 5.12.-5.14.'de sunulmuştur. Burada TNM evresi ile birlikte *FN1* gen ifadesi KRK hastarında uzak metastazsız sağkalımın tahmininde bağımsız bir prognostik belirteç özelliğini göstermiştir.




Şekil 5.20. *FN1* geninin A - vefat eden, B – nüks gösteren ve C – metastaz gösteren gruplarında kat değişimi




Şekil 5.21. *FN1* Kaplan-Meier sağkalım eğrisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım

Çizelge 5.12. *FN1* ekspresyonu ile genel sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 1.004 (0.980-1.030) | 0.728 | 1.007 (0.981-1.034) | 0.602 |
| Cinsiyet | 1.051 (0.592-1.867) | 0.865 | 0.984 (0.526-1.841) | 0.961 |
| Grade | 0.803 (0.367-1.757) | 0.583 | 0.727 (0.318-1.662) | 0.449 |
| TNM Evresi | 1.602 (0.986-2.603) | 0.057 | 1.657 (0.992-2.770) | 0.054 |
| FN1 İfadesi | 1.569 (0.873-2.818) | 0.132 | 1.714 (0.926-3.171) | 0.086 |

Çizelge 5.13. *FN1* ekspresyonu ile nükssüz sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 0.984 (0.964-1.004) | 0.121 | 0.986 (0.965-1.008) | 0.224 |
| Cinsiyet | 0.897 (0.541-1.489) | 0.675 | 0.730 (0.421-1.264) | 0.261 |
| Grade | 0.891 (0.473-1.677) | 0.720 | 0.623 (0.311-1.249) | 0.182 |
| TNM Evresi | 2.134 (1.339-3.399) | **0.001*** | 2.563 (1.554-4.226) | **<0.0001*** |
| FN1 İfadesi | 1.538 (0.932-2.538) | 0.092 | 1.893 (1.126-3.181) | 0.016 |

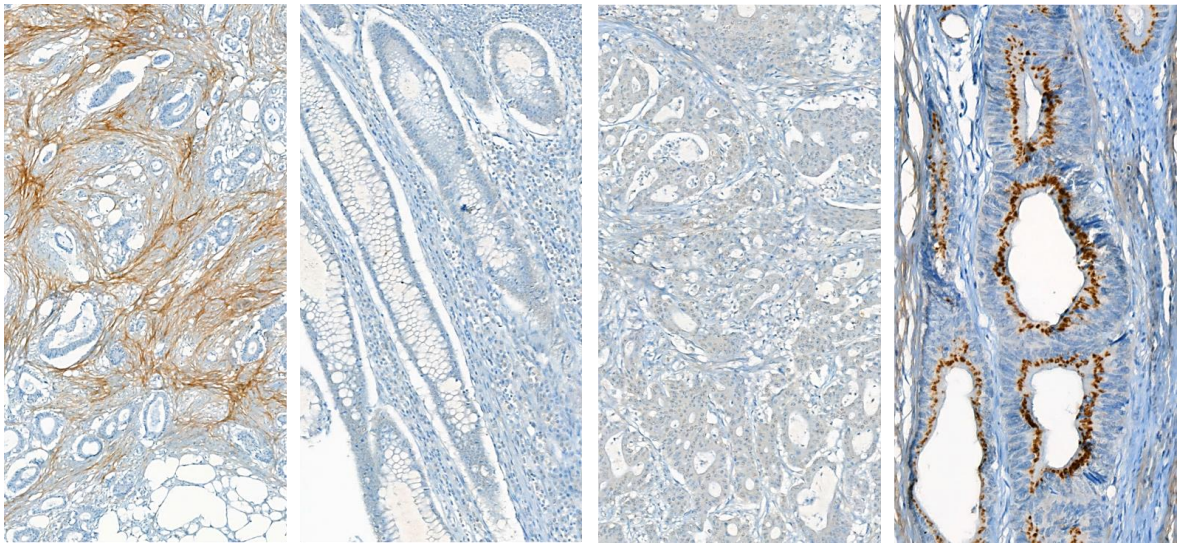
Çizelge 5.14. *FN1* ekspresyonu ile uzak metastazsız sağkalımın tek ve çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu

| **Değişkenler** | **Tek değişkenli analiz** | | **Çok değişkenli analiz** | |
|---|---|---|---|---|
| | **HR (95% CI)** | **p değeri** | **HR (95% CI)** | **p değeri** |
| Yaş | 0.992 (0.969-1.015) | 0.489 | 0.992 (0.968-1.017) | 0.529 |
| Cinsiyet | 0.765 (0.426-1.374) | 0.370 | 0.541 (0.287-1.021) | 0.058 |
| Grade | 0.613 (0.267-1.405) | 0.247 | 0.394 (0.158-0.981) | 0.045 |
| TNM Evresi | 2.032 (1.208-3.419) | **0.008*** | 2.811 (1.600-4.938) | **<0.0001*** |
| FN1 İfadesi | 1.836 (1.030-3.272) | **0.039*** | 2.180 (1.203-3.952) | **0.010*** |

## 5.3. PARAFİNE GÖMÜLÜ DOKULARIN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA BULGULARI

Formalina fiksasyonu yapılıp parafine gömülen 200 KRK tümör dokularında *COL1A1*, *COL5A1* ve *FN1* genlerinin protein ifadesine immünohistokimyasal (İHK) olarak bakılmıştır. Optimizasyon sonrası boyamalar COL5A1 ve FN1 için tek lama iki örnek sığacak şekilde yerleştirilirken COL1A1 doku makroarray bloklarında değerlendirilmiştir.

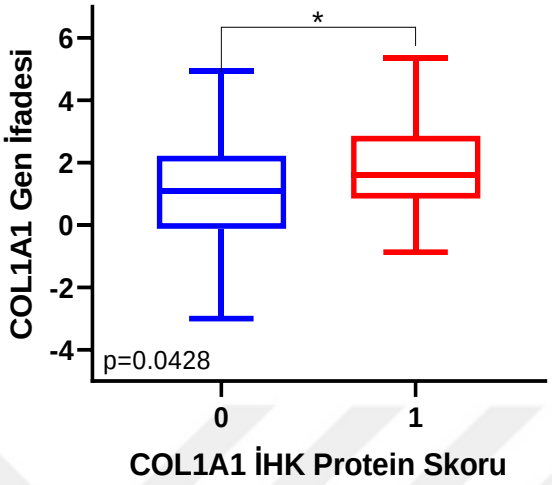
***COL1A1*** İHK sonuçları patolog uzman tarafından semikantitatif olarak değerlendirilerek ikiye ayrılmıştır: 168 olgu negatif ve 32 olgu pozitif olarak kabül edilmiştir. Pozitif vakalar 1, negatif olanlar da 0 skor olarak sınıflandırılmıştır. Pozitif boyanma patterni supranükleer noktasal boyanma şeklindedir. Ayrıca İHK boyamanın başarılı geçtiğinin göstergesi olarak örnekler arasında pozitif iç kontroller de görülmektedir.



Pozitif iç control 10X Normal kolon 20X Negatif boyanma 20X Pozitif boyanma 40X

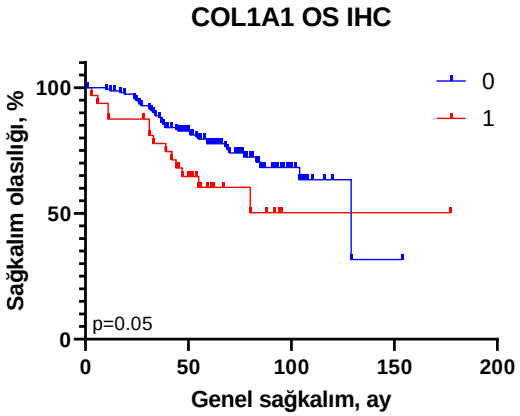
Şekil 5.22. *COL1A1* protein boyanma paterni

İHK boyanma paternine göre skor 0 ve 1 olarak sınıflandırılan protein ekspresyonu ile mRNA korelasyonu şekil 5.24.'de sunulmuştur. Şekilde görüldüğü üzere protein ifadesi pozitif olan sınıfta daha yüksek anlamlı mRNA ekspresyonunu gözlemlenmektedir.

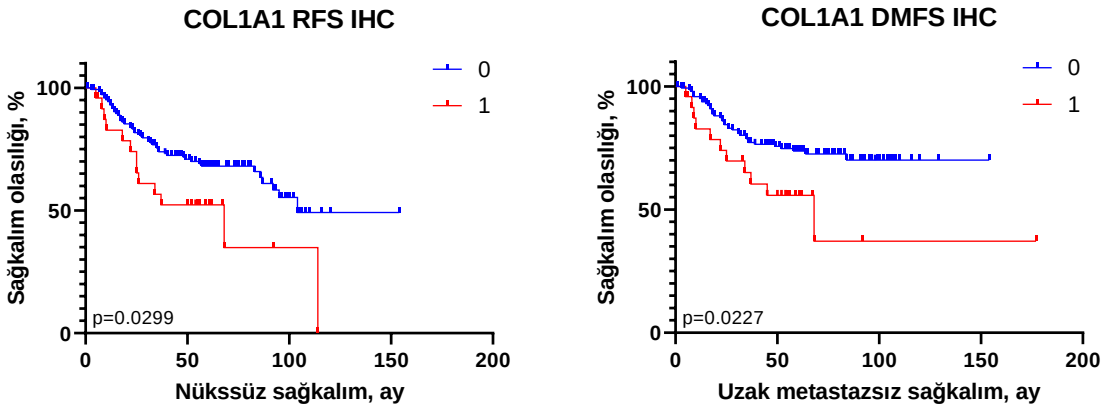



Şekil 5.23. *COL1A1* 0 ve 1 protein ekspresyonu gruplarının mRNA gen ifadesi ile korelasyonu

Pozitif ve negatif (1 ve 0) sınıfları daha sonra hastaların sağkalım verileri ile ilişkilendirilerek pozitif bulunan grup negatife kıyasla daha kısa genel, nükssüz ve metastazsız sağkalım sergilemiştir.



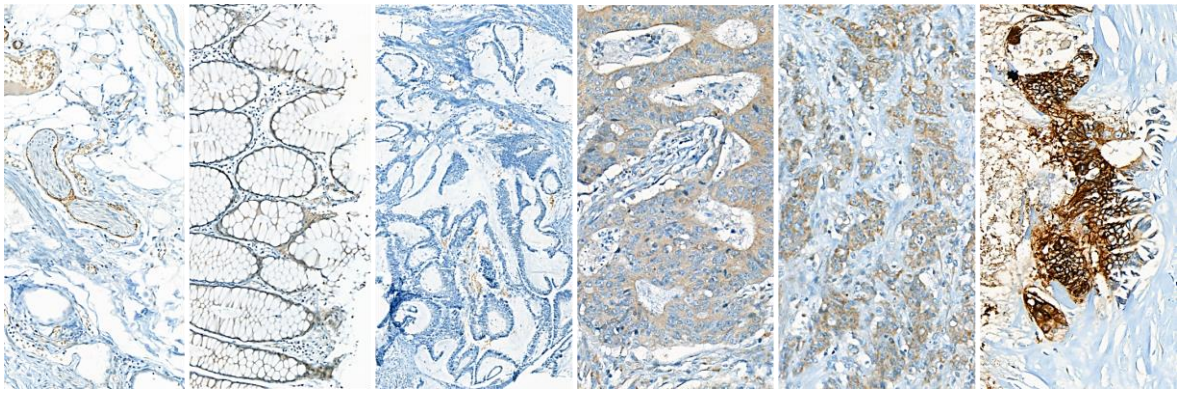

**A**




**B** **C**

Şekil 5.24. *COL1A1* protein ekspersyonu sonucunda 0 ve 1'e ayrılan grupların sağkalım ile ilişkisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım

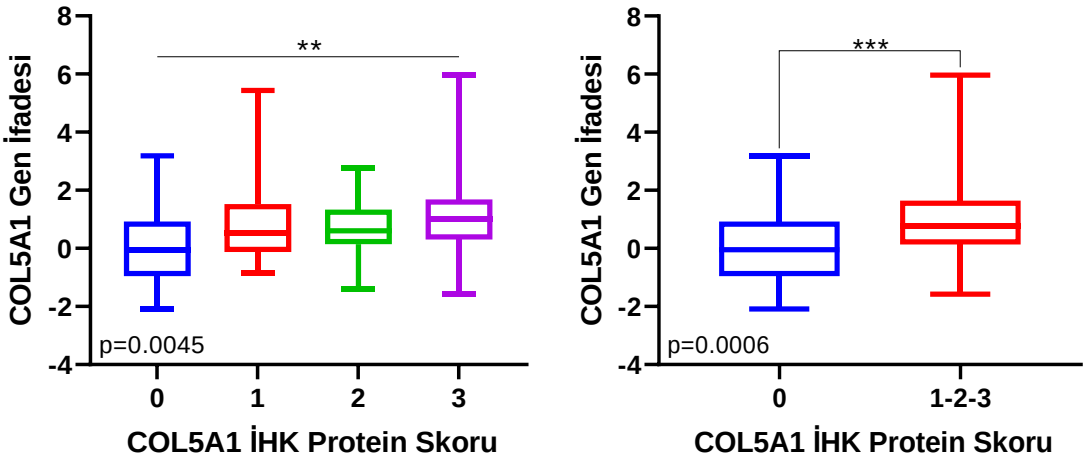
***COL5A1*** İHK sonuçları patolog uzman tarafından semikantitatif olarak değerlendirilerek dörde ayrılmıştır: 32 olgu – negatif (skor 0), 49 olgu – soluk (skor 3), 33 olgu – orta (skor 2) ve 86 olgu – şiddetli (skor 3) ekspresyon sergilemiştir. Soluk ve orta gruplar (skor 1-2) sitoplazmik boyanma paterni, şiddetli (skor 3) olan sınıf ise membranöz boyanma paterni göstermiştir. Ayrıca İHK boyamanın başarılı geçtiğinin göstergesi olarak örneklerde pozitif iç kontroller de görülmektedir. Aşağıdaki şekilde örneğin normal sinir kesiti etrafındaki pozitif iç kontrolü sunulmuştur.



| Pozitif iç kontrol 20X | Normal kolon mukozası 20X | Negatif boyanma 10X | Soluk boyanma 40X | Orta boyanma 40X | Şiddetli boyanma 40X |
|---|---|---|---|---|---|

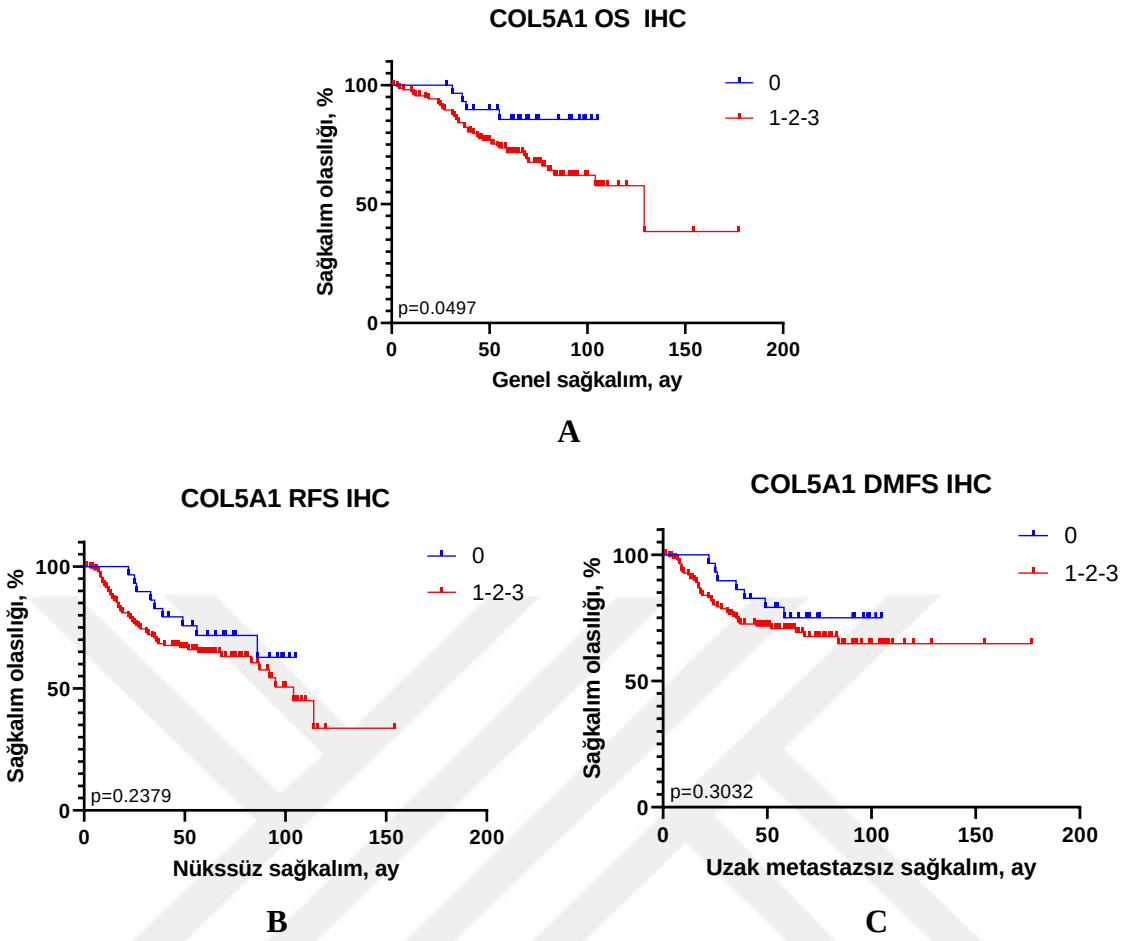
Şekil 5.25. *COL5A1* protein boyanma paterni

İHK boyanma şiddetine göre 0-3 skorlanan sınıfların ve ayrıca pozitif (1-3) ve negatif (0) olarak ayrılan grupların mRNA ifadesi ile korelasyonu şekil 5.27.'de sunulmuştur. Şekilde görüldüğü üzere protein ifade şiddeti arttıkça mRNA ekspresyonunda da anlamlı artış gözlemlenmektedir.



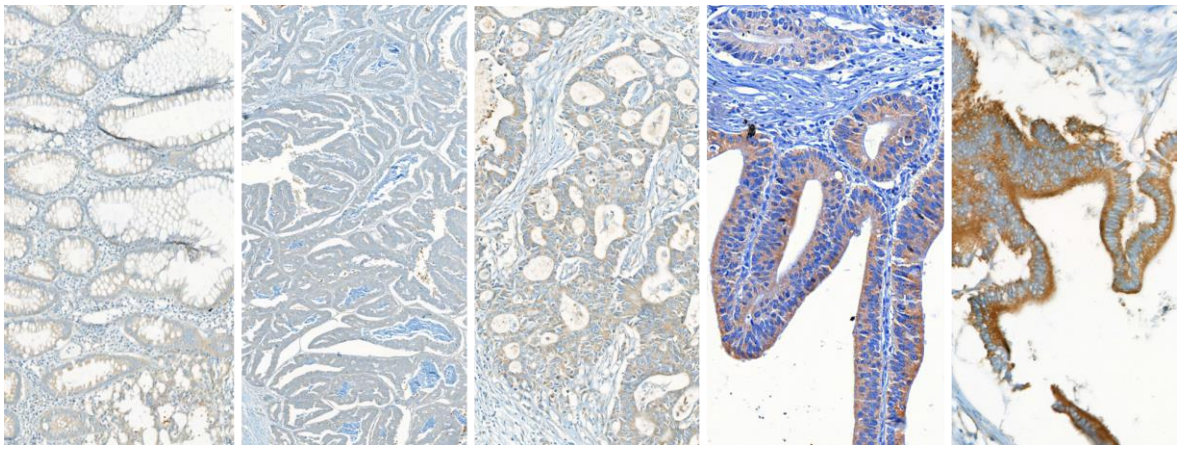

Şekil 5.26. *COL5A1* protein ekspresyonu ile mRNA gen ifadesi korelasyonu: A – skor 0-1-2-3, B – 0 vs 1-2-3

Daha sonra protein negatif (0) ve pozitif (1-2-3) olarak ikiye ayrılan gruplar hayatta kalım verisi ile ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak COL5A1 pozitif hastalar negatifle kıyasla daha kısa genel sağkalım sergilemiştir. Bununla birlikte nükssüz ve metastazsız sağkalımında pozitif vakalar daha kısa hayatta kalım trendi gösterse bile sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0.2379 ve p=0.3032).




Şekil 5.27. *COL5A1* protein ekspresyonu sonucunda 0 ve 1-2-3'e ayrılan grupların sağkalım ile ilişkisi: A – genel sağkalım, B – nükssüz sağkalım, C – uzak metastazsız sağkalım

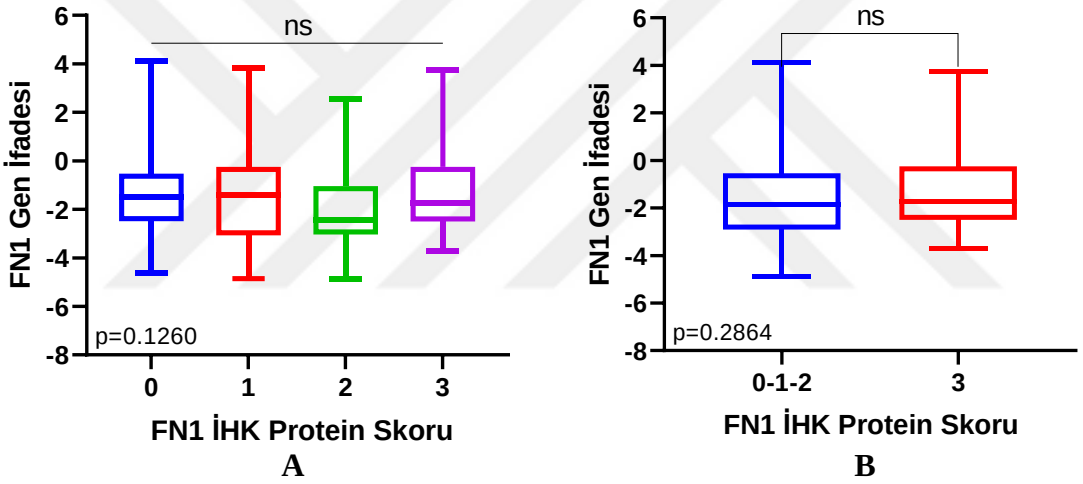
***FN1*** İHK sonuçları patolog uzman tarafından semikantitatif olarak değerlendirilerek dörde ayrılmıştır: 53 olgu – negatif (skor 0), 57 olgu – soluk (skor 3), 44 olgu – orta (skor 2) ve 46 olgu – şiddetli (skor 3) ekspresyon sergilemiştir. Burada soluk ve orta gruplar (skor 1-2) sitoplazmik boyanma paterni göstermiştir. Bununla birlikte soluk boyanma normal kolon mukozası ile neredeyse aynı görünümde iken orta gruplar normal kolon mukozasından daha koyu sitoplazmik ekspresyon sergilemektedir. Şiddetli boyanma (skor 3) ise lüminaldır.



Normal kolon 10X | Negatif boyanma 5X | Soluk boyanma 20X | Orta boyanma 10X | Şiddetli boyanma 40X

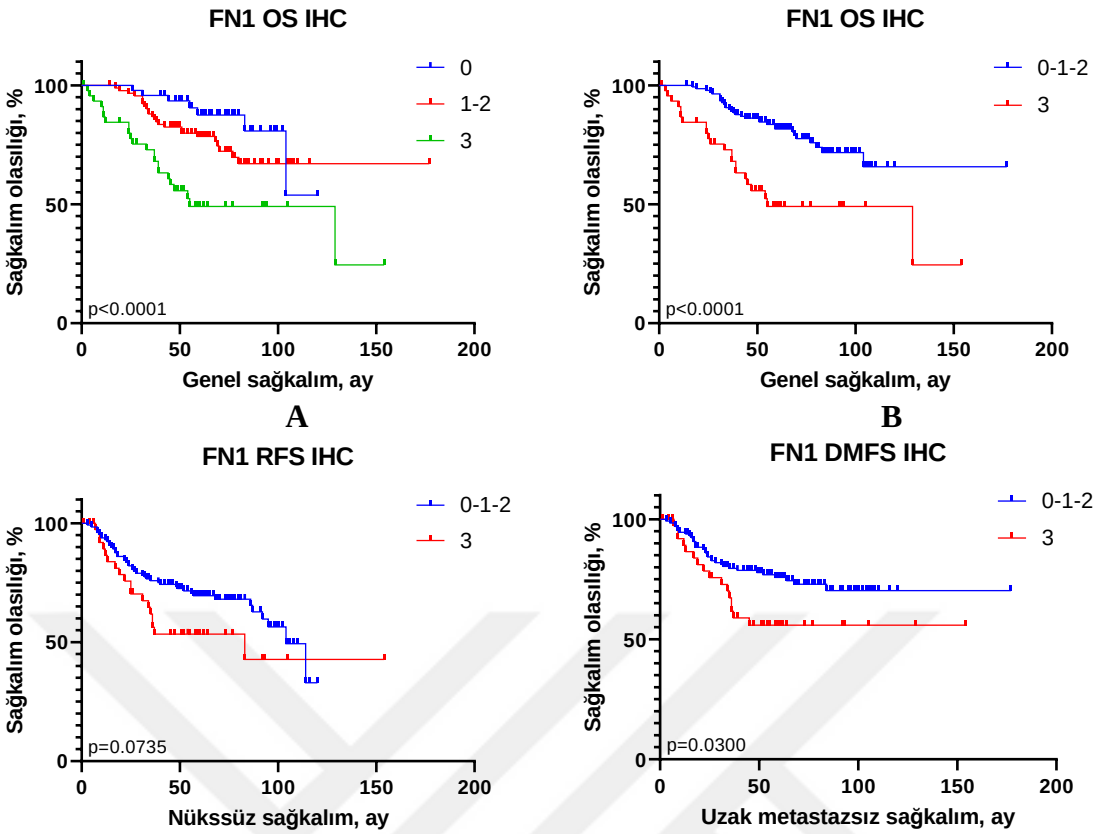
Şekil 5.28. *FN1* protein boyanma paterni

İHK boyanma şiddetine göre 0-3 skorlanan sınıfların ve ayrıca boyanma paternine göre 0-2 ve 3 olarak ikiye ayrılan grupların mRNA ifadesi ile korelasyonu şekil 5.30.'da sunulmuştur.




Şekil 5.29. *FN1* protein ekspresyonu ile mRNA gen ifadesi korelasyonu: A – skor 0-1-2-3, B – 0-1-2 vs 3

Daha sonra boyanma paternine göre 0-2 ve 3 olarak ikiye ayrılan gruplar hayatta kalım verisi ile ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak FN1 protein ekspresyonun skor 3 sınıfı 0-2 ile kıyasla daha kısa genel ve metastazsız sağkalım göstermiştir.




Şekil 5.30. *FN1* protein ekspresyonu ile sağkalım ilişkisi: 0, 1-2 ve 3 grupları için A – genel sağkalım, 0-2 ve 3 grupları için B – genel sağkalım, C – nükssüz sağkalım, D – uzak metastazsız sağkalım

# 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya çapında yaygın malignitelerin biri olan KRK akciğer kanserinden sonra en ölümcül kanser türüdür ve 2020 yılında yaklaşık bir milyon hastanın ölümü ile sonuçlanmıştır (1). KRK'nın yüksek mortalitesi esas olarak geç teşhisinden kaynaklanmakta olup, hastalığın erken tespitine yönelik Türkiye dahil olmak üzere birçok ülkede 50 yaş sonrası bireylere kolonoskopi ve dışkıda gizli kan testi uygulanmaktadır (49). Ancak bu testlerin biri invaziv olup hastaya acı çektirirken diğeri yeterince hassas değildir. Bununla birlikte hastalığın prognozuna yönelik klinikte tümörün patolojik evresi, KRAS, BRAF mutasyonları ve mikrosatellit kararsızlığı dikkate alınmaktadır. Bu bağlamda KRK'nın heterojenliğininden kaynaklı olarak KRAS ve BRAF mutasyonları vakaların %30 ve %10'unda rastlanırken mikrosatellit kararsızlığı tüm kolorektal kanser olgularının sadece %15'inde gözlenmektedir. Sonuç olarak günümüzde mevcut olan biyobelirteçler hastalığın doğru sınıflandırılması ve seyrinin öngörülmesinde yetersiz kalmaktadır. Her ne kadar en iyi çalışılmış modellerin biri olarak görülse bile halen kolorektal kanserin gelişimi ve ilerlemesinde yatan birçok mekanizma karanlık altındadır. Bu doğrultuda teknoloji gelişimiyle tanımlanan yeni biyobelirteçlerin sayısı da artmaktadır, ancak çok az belirteç birçok basamaktan başarıyla geçerek klinik uygulamaya sunulabilmiştir.

Bu bağlamda ekibimiz 2007 yılından itibaren hastalığın tanı ve prognozuna yönelik biyobelirteçlerin tanımlanmasını hedefleyen projeleri yürütmektedir. Bu projelerin özeti şekil 3.1.'de sunulmuş olup genel olarak 50 KRK eşli tümör ve kontrol hastalarından izole edilen RNA'lar ile mikrodizin çalışması yapılmıştır (Tübitak 109S477). Daha sonra elde edilen farklı ekspresyon sergileyen gen seti GEO (Gene Expression Omnibus) ve Array Express'den indirilen meta çalışmayla birlikte değerlendirilerek hücre dışı matris reseptörü etkileşim yolağında zenginleşen *COL1A1*, *COL5A1*, *THBS2* ve *FN1* genlerinin önemli ölçüde yüksek ifade gösterdiği belirlenmiştir. Daha sonra bu genler BAP 19L0415002 projesi kapsamında aynı 50 hasta üzerinde qRT PCR yöntemiyle valide edilmiştir. Sunulan tez çalışmasının ilk amacı bu genlerin bağımsız hasta grubunda denenmesidir. Sonuç olarak BAP 20B0415001 projesi tarafından desteklenen tez çalışmasında 200 KRK tümör ve 70 kontrol FFPE dokularında bu genler qRT-PCR yöntemiyle test edilmiştir ve tümör dokularında yüksek ifade oldukları valide edilmiştir. Bahsi geçen önceki 50 hastanın mikrodizin ve qRT-PCR sonuçları ile birlikte bu tez çalışmasının qRT-PCR sonuçları çizelge

6.1.'de sunulmuştur. Burada belirtilmesi gereken husus mikrodizin ve qRT-PCR platformlarının teknik ve biyolojik prosedürlerdeki değişikliklerden kaynaklı olarak farklı sonuçlarının elde edilmesidir. Mikrodizin teknolojisi hibridizasyon yöntemine dayandığı ve gen ekspresyon seviyesinin doğrudan ölçmediği için bu bağlamda sonuçlar qRT-PCR yöntemiyle doğrulanmaktadır. Önceki yapılan 50 tümör ve eşli kontrol örneklerinin mikrodizin ve qRT-PCR doğrulama çalışmaları 10 yıl fark ile aynı hastanın farklı blokları üzerinden değişik teknoloji ile yapıldığından elde edilen sonuçlar benzer paternde olmasına rağmen genel olarak birbirinden farklı olabilmektedir.

Buna ek olarak qRT-PCR sonucu elde edilen genlerin kat değişimi tüm bireylerin ortalama değeri üzerinden hesaplanmaktadır, dolayısıyla da her bir hastanın tek-tek birebir karşılaştırması sonucu bazı örnekler için tümör ile eşli kontrol arasında gen ifadesi açısından fark bulunmayabilmektedir. Burada belirtilmesi gereken diğer husus ise kanserin heterojenitesi ve hastalığın kendi içinde farklı yolaklardaki genetik ve epigenetik değişiklikler üzerinden ilerlemesidir. Ek olarak belirtilen aday genleri hastalığın oluşumundan ziyade ilerlemesinde ve özellikle epitelyal-mezenkimal geçişi üzerinden metastaz ve nüks gelişimi ve kötü prognozu ile ilişkili olmasıdır. Neticede belirli örneklerin tümör-kontrol karşılaştırması sonucu değişikliğin bulunmaması hem tümör adacıklarının farklı gelişimi hem de bireylerin tanı esnasındaki evresi, farklılaşma derecesi ve invazyonu ile ilişkili olabilmektedir.

Çizelge 6.1. 50 KRK eşli tümör-kontrol mikrodizin ve qRT-PCR sonuçları, bağımsız 200 KRK hastanın tümör ve kontrol örneklerinin qRT-PCR sonucu

| Gen ismi | **50 KRK hastanın eşli tümör-kontrol örneği** | | **Bağımsız 200 KRK hastanın tümör ve eşli 70 kontrol örneği (BAP 20B0415001)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mikrodizin analizi, kat değişimi (Tübitak 109S477) | qRT-PCR validasyonu, kat değişimi (BAP 19L0415002) | 70 Eşli Tümör-Kontrol | p değeri | 200 Tümör ve 70 Kontrol | p değeri | 130 Tümör ve 70 Kontrol | p değeri |
| COL1A1 | 7.5 | 12.0 | 3.8 | <0.0001 | 2.1 | <0.0001 | 2.2 | <0.0001 |
| COL5A1 | 3.7 | 2.7 | 1.8 | <0.0001 | 1.8 | <0.0001 | 2.2 | <0.0001 |
| THBS2 | 20.2 | 1.8 | 1.9 | 0.0007 | 4.8 | 0.0001 | 6.6 | <0.0001 |
| FN1 | 2.7 | 2.0 | 1.6 | 0.0257 | 9.0 | 0.0015 | 13.1 | 0.0010 |

Bunun paralelinde GEO'dan çekilen meta veride *COL1A1, COL5A1, THBS2* ve *FN1* genlerinin yüksek ekspresyonu genel ve hastalıksız sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Bu doğrultuda tezin ikinci amacı bu dört genin mRNA ve protein ifade verisi ile hastaların nüksetme ve hayatta kalım bilgileriyle bağdaştırarak hastalığın prognozunu

değerlendirmektir. Bu bağlamda 200 KRK tümör örneklerinin *COL1A1, COL5A1, THBS2* ve *FN1* genleri için ifade verisi qRT-PCR ile hem mRNA seviyesinde hem immünohistokimyasal (İHK) olarak boyanarak patolog uzman tarafından semikantitatif olarak değerlendirilerek de protein seviyesinde belirlenmiştir. Burada belirtilmesi gereken husus İHK boyamalarının THBS2 için yapılamamış olmasıdır. Anti-THBS2 antikoru ile yapılan optimizasyon denemeler sonucu antikorun çalışmadığı tespit edilmiş olup yenisi sipariş verilmiştir. İleride bu analizin de tamamlanması planlanmaktadır.

*COL1A1* geni deri, kemik ve kas bağlarının hücre dışı matrislerinde bol miktarda bulunan tip I kollajen alfa-1 alt ünitesini kodlamaktadır (116). Kolorektal kanserde *COL1A1* geninin tümör dokularında yüksek olduğu ve tümör farklılaşmasına katkıda bulunduğu öne sürülmektedir (117). Üstelik kollajen tip I'in, integrin ve *AKT* yolakları üzerinden hücre içi sinyalleşmeye katılarak malign fenotipe katkıda bulunduğu bildirilmektedir (118). *COL1A1* geni E-kaderin ve β-katenin regülasyonunda rol alarak metastatik potansiyeli desteklediği ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) benzeri fenotipi gösterdiği ortaya atılmıştır (119). Tümör ve eşleştirilmiş lenf nodu dokularında bulunan *COL1A1*'in aşırı ekspresyonu *WNT/PCP* sinyal yolu genleri ve kötü uzak metastazsız sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (120). Ayrıca *COL1A1*'in yüksek ifadesi mide ve mesane kanserinde kötü hayatta kalımı ile anlamlı bulunmuştur (121,122).

Tez çalışmasında *COL1A1* geni 200 tümör ve 70 kontrol grubunda 2.1 kat ($p<0.0001$), 130 tümör ve 70 kontrol grubunda 2.2 kat ($p<0.0001$) ve 70 tümör ve 70 eşli kontrol grubunda ise tümör dokularında 3.8 kat artış ($p<0.0001$) göstermiştir ve önceki yapılan çalışmalar ile benzer paterni sergileyerek valide olmuştur (çizelge 6.1.). Ayrıca *COL1A1*'in yüksek mRNA eskpresyonu genel sağkalım, nükssüz ve uzak metastazsız sağkalım ile ilişkili bulunmuş olup çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu *COL1A1*'in KRK hastalarının sağkalım tahmininde evre belirteci yanında bağımsız bir faktör olabileceği ve kötü prognozun göstergesi olarak rol oyanayabileceği gösterilmiştir (OS: HR=2.186, %95 CI = 1.184-4.038, $p=0.012$, RFS: HR=4.321, %95 CI=2.411-7.742, $p<0.0001$, DMFS: HR=6.105, %95 CI=3.016-12.360, $p<0.0001$, çizelge 5.2-5.4.). Aynı şekilde immünohistokimyasal boyama sonucu pozitif olarak sınıflandırılan grupta *COL1A1*'in ifadesi kötü hayatta kalım ile bağdaştırılmıştır ($p=0.05$, $p=0.0299$, $p=0.0227$, şekil 5.23.). Sonuç olarak *COL1A1* bir aday

onkogen görevini görmektedir ve KRK'da potansiyel prognostik belirteç olarak kullanılabilecektir.

Diğer bir kollajen geni olan *COL5A1* düşük verimli fibril kollajen tip V'in alfa zincirini kodlamaktadır. *COL5A1* akciğer ve meme gibi dünyada hem ölüm oranları hem de insidansı boyunca en önde gelen kanser tiplerinde yüksek bulunmaktadır ve prognozu kötü yönde etkilemektedir (123,124). Bununla birlikte COL5A1'in aşırı ifadesi yumurtalık kanserinde ve böbrek hücreli karsinomunda kısa hayatta kalım ile bağdaştırılmıştır. Bu genin susturulması yumurtalık kanserinde hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu önemli ölçüde inhibe etmiştir (125,126).

Ekstraselluler matris ilişkili *COL5A1* geninin tümörigenez mekanizması tam bilinmemekle birlikte kanser hücrelerinin yüzeyindeki reseptörler ile etkileşime geçerek tümör hücreleriyle iletişim kurduğu ve çeşitli sinyal yolaklarını aktive ederek kanserin ilerlemesini desteklediği düşünülmektedir (125). Kolorektal kanserde *COL5A1* geninin *FN1 ve THBS2* ile birlikte hücre dışı matris reseptör etkileşimi, fokal adezyon ve TGF-beta sinyal yolunda zenginleştiği gösterilmiştir (127). Literatürde *COL5A1* ile ilgili yayınlar sınırlı olup bu genin kolorektal kanser üzerindeki etkisi çok çalışılmamıştır ve dolayısıyla da yeterince bilgi bulunmamaktadır.

Tez çalışmasında *COL5A1* geni 200 tümör ve 70 kontrol grubunda 1.8 kat ($p<0.0001$), 130 tümör ve 70 kontrol grubunda 2.2 kat ($p<0.0001$) ve 70 tümör ve 70 eşli kontrol grubunda ise tümör dokularında 1.8 kat artış ($p<0.0001$) göstermiştir ve önceki yapılan çalışmalar ile benzer paterni sergileyerek valide olmuştur (çizelge 6.1.). Ayrıca *COL5A1*'in yüksek mRNA ekspresyonu genel sağkalım, nükssüz ve uzak metastazsız sağkalım ile ilişkili bulunmuş olup çok değişkenli Cox regresyon analizi sonucu *COL5A1*'in KRK hastalarının sağkalım tahmininde evre belirteci yanında bağımsız bir faktör olabileceği ve kötü prognozun göstergesi olarak rol oyanayabileceği gösterilmiştir (OS: HR=1.921, %95 CI=1.028-3.587, p=0.041, RFS: HR=2.413, %95 CI=1.396-4.171, p=0.002, DMFS: HR=3.637, %95 CI=1.900-6.961, p<0.0001, çizelge 5.5-5.7.). İHK sonuçlarına göre *COL5A1* pozitif kabul edilen vakalar daha kısa genel hayatta kalım (p=0.0497) sergilerken nükssüz ve metastazsız sağkalım da belirli bir trend görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmamıştır (p=0.2379, p=0.3032, şekil 5.27.). Sonuç olarak *COL5A1*'in onkojenik

özellik sergilediği ve hastalığın prognozu açısından aday biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

Fibronektin ailesinin üyesi olan *FN1*, plazmada, hücre yüzeyinde ve hücre dışı matrisinde farklı formlarda bulunan glikoproteindir. *FN1* embriyogenez, yara iyileşmesi, kan pıhtılaşması, karsinojenez ve metastaz gibi hücre adezyonu, göçü ve farklılaşma işlemlerinde yer almaktadır (128). *FN1* böbrek ve tiroid kanserlerde yüksek bulunmuş ve hastalığın agresifliği ve metastatik potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir (129,130). *FN1* geninin *HMGA2* tarafından transkripsiyonel aktivasyonunun *STAT3* yolağı üzerinden epitelyal-mezenkimal tranzisyon işlemini indüklediği keşfedilmiştir (131). Kolorektal kanserde *FN1* proteininin integrin genlerine bağlanarak apoptozu bastırdığı ve böylelikle hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu teşvik ettiği bildirilmiştir (132).

Tez çalışmasında *FN1* geni 200 tümör ve 70 kontrol grubunda 9 kat (p=0.0015), 130 tümör ve 70 kontrol grubunda 13.1 kat (p=0.0010) ve 70 tümör ve 70 eşli kontrol grubunda ise tümör dokularında 1.6 kat artış (p=0.0257) göstermiştir ve önceki yapılan çalışmalar ile benzer paterni sergileyerek valide olmuştur (çizelge 6.1.). Ayrıca tümör dokularında *FN1* geninin mRNA ifadesinin median üzerinden ikiye ayrılarak sınıflandırması ve sağklım ilişkilendirme çalışması sonucu bu genin yüksek ekspresyonu hastalığın uzak metastazsız sağkalım ile ilşkilendirilmiştir ve uzak metastazsız sağkalımın tahmininde bağımsız bir faktör olabileceği ortaya konmuştur (HR=2.180 %95 CI= 1.203-3.952 ve p=0.010, çizelge 5.13.). Aynı şekilde immünohistokimyasal analizi sonrası ikiye ayrılan protein ifade sonuçlarına göre tümör hücrelerinin şiddetli lüminal ekspresyonu (skor 3) hastalığın daha kısa genel hayatta kalımı (p<0.0001) ve uzak metastazsız sağkalımı (p=0.0300, şekil 5.31.) ile bağdaştırılmıştır. Bu doğrultuda *FN1* geninin yüksek ifadesinin uzak metastazın öngörülmesinde bir aday prognostik biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

Trombospondin ailesinin bir üyesi olan *THBS2*, çeşitli hücre tiplerinde salınan çok işlevli disülfit bağlı bir homotrimerik glikoproteindir (133). *THBS2*, hücre dışı matris ve hücre yüzeyi proteinlerine bağlanarak anjiyogenez, apoptoz, hücre iskelet organizasyonu, hücre tutunması ve göçü gibi çeşitli biyolojik süreçlerde görev görmektedir (127). *THBS2*'nin düşük ekspresyonu prostat, meme ve mide kanserinde kötü prognoz ile ilişkilendirilirken

kolorektal kanserde tam tersi bu genin aşırı ifadesi olumsuz hastalık seyri ile bağdaştırılmaktadır.

Tez çalışmasında *THBS2* geni 200 tümör ve 70 kontrol grubunda 4.8 kat (p=0.0001), 130 tümör ve 70 kontrol grubunda 6.6 kat (p<0.0001) ve 70 tümör ve 70 eşli kontrol grubunda ise tümör dokularında 1.9 kat artış (p=0.0007) göstermiştir ve önceki yapılan çalışmalar ile benzer paterni sergileyerek valide olmuştur (çizelge 6.1.). Buna ek olarak *THBS2* ifadesinin hayatta kalım verisi ile ilişkilendirme analizleri sonucu bu gen genel, nükssüz veya uzak metastazsız sağkalım ile ilişki bulunmamıştır (çizelge 5.8-5.10.). Bu genin protein ekspresyonu ile denemeler sonucu kullanılan antikorun çalışmadığı tespit edilmiş olup yenisi sipariş verilmiştir, analiz ilerleyen süreçte tamamlanacaktır. Genel olarak özetlemek gerekirse, yapılan çalışma sonucu *THBS2* geninin KRK'nın prognozunun öngörülmesi açısından biyobelirteç özelliği taşımadığı belirlenmiştir.

***Sonuç olarak***, sunulan tez çalışmasında *COL1A1, COL5A1, THBS2* ve *FN1* genlerinin hastalığın prognozu açısından biyobelirteç olma potansiyeli bağımsız kolorektal kanser vakalarında denenmiştir. Burada kollajen genleri *COL1A1* ve *COL5A1,* kollajen fibrillojenezini modüle eden *THBS2* ve hücre yüzeyinde bol bulunan *FN1* genlerinin tümü ekstrasellüler matris fonksiyonlarında önemli rol oynamaktadır. Görüldüğü üzere bu genlerin prognoz ile ilişkisi ilk kez bu çalışmayla ortaya konmuş değildir ve önceden de kolorektal kanser dahil olmak üzere farklı kanser türlerinde kötü prognozun belirteci olarak bildirilmiştir. Ancak *COL5A1* ifadesi bu bağlamda güncel literatürde kolorektal kanserin prognozu ile henüz ilişkilendirilmemiş olup sunulan çalışma ile ortaya konmuş olacaktır.

Yapılan çalışma sonucu *COL1A1, COL5A1, FN1* ve *THBS2* genleri normal mukozayla kıyasla tümör dokularında yüksek bulunmuştur ve önceki yapılan araştırmalar ile benzer patern göstererek valide olmuştur. Buna ek olarak *COL1A1, COL5A1* ve *FN1* genlerinin yüksek ifadesi hastalığın sağkalımı ile ilişkili bulunmuştur ve kötü prognozun göstergesi olarak değerlendirilebilme potansiyeline sahiptir. Bu belirteçlerin ileri çalışmalar ile denenmesi ve çok basamaklı fazlardan geçerek prospektif validasyonu sonrası belirteç olarak önerilmesi mümkün olacaktır. Halihazırda ekibimiz tarafından bu genlere dayalı bir risk skor analizi geliştirilmekte olup an itibariyle yayını hazırlanmaktadır.

## KAYNAKLAR


1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca-Cancer J Clin.* 2021.

2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.

3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.

4. Sarkar S, Horn G, Moulton K, et al. Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013;14(10):21087-21113.

5. Cooper, M G. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition.* Sinauer Associates, Incorporated; 2000.

6. Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science.* 2017;357(6348).

7. Darwiche N. Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. *Am J Cancer Res.* 2020;10(7):1954-1978.

8. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Gene Dev.* 2018;32(19-20):1267-1284.

9. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 2017;7(5):1016-1036.

10. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv.* 2016;2(5).

11. Warburg O, Wind F, Negelein E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol.* 1927;8(6):519-530.

12. Tobore TO. On the need for the development of a cancer early detection, diagnostic, prognosis, and treatment response system. *Futur Sci Oa.* 2020;6(2).

13. Koo MM, Swann R, McPhail S, et al. Presenting symptoms of cancer and stage at diagnosis: evidence from a cross-sectional, population-based study. *Lancet Oncology.* 2020;21(1):73-79.

14. Naylor S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2003;3(5):525-529.

15. Schmidt M, Fasching PA, Beckmann MW, Kolbl H. Biomarkers in Breast Cancer - An Update. *Geburtsh Frauenheilk.* 2012;72(9):819-832.

16. Le Du F, Ueno NT, Gonzalez-Angulo AM. Breast Cancer Biomarkers: Utility in Clinical Practice. *Curr Breast Cancer Rep.* 2013;5(4).

17. Colomer R, Aranda-Lopez I, Albanell J, et al. Biomarkers in breast cancer: A consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clin Transl Oncol.* 2018;20(7):815-826.

18. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *New Engl J Med.* 2004;351(27):2817-2826.

19. van't Veer LJ, Dai HY, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415(6871):530-536.

20. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *Journal of Clinical Oncology.* 2009;27(8):1160-1167.

21. Saarenheimo J, Eigeliene N, Andersen H, Tiirola M, Jekunen A. The Value of Liquid Biopsies for Guiding Therapy Decisions in Non-small Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* 2019;9.

22. I H, Cho J-Y. Chapter Three - Lung Cancer Biomarkers. In: Makowski GS, ed. *Advances in Clinical Chemistry.* Vol 72. Elsevier2015:107-170.

23. Villalobos P, Wistuba II. Lung Cancer Biomarkers. *Hematol Oncol Clin N.* 2017;31(1):13.

24. Sears CR, Mazzone PJ. Biomarkers in Lung Cancer. *Clin Chest Med.* 2020;41(1):115.

25. Pinero F, Dirchwolf M, Pessoa MG. Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis, Prognosis and Treatment Response Assessment. *Cells-Basel.* 2020;9(6).

26. Lou J, Zhang L, Lv S, Zhang C, Jiang S. Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Biomark Cancer.* 2017;9:1-9.

27. Khomiak A, Brunner M, Kordes M, et al. Recent Discoveries of Diagnostic, Prognostic and Predictive Biomarkers for Pancreatic Cancer. *Cancers.* 2020;12(11).

28. Kunovsky L, Tesarikova P, Kala Z, et al. The Use of Biomarkers in Early Diagnostics of Pancreatic Cancer. *Can J Gastroenterol.* 2018;2018.

29. Gaudreau PO, Stagg J, Soulieres D, Saad F. The Present and Future of Biomarkers in Prostate Cancer: Proteomics, Genomics, and Immunology Advancements. *Biomark Cancer.* 2016;8(Suppl 2):15-33.

30. Visser WCH, de Jong H, Melchers WJG, Mulders PFA, Schalken JA. Commercialized Blood-, Urinary- and Tissue-Based Biomarker Tests for Prostate Cancer Diagnosis and Prognosis. *Cancers.* 2020;12(12).

31. Alford AV, Brito JM, Yadav KK, Yadav SS, Tewari AK, Renzulli J. The Use of Biomarkers in Prostate Cancer Screening and Treatment. *Rev Urol.* 2017;19(4):221-234.

32. Rastogi M, Gupta S, Sachan M. Biomarkers towards Ovarian Cancer Diagnostics: Present and Future Prospects. *Braz Arch Biol Techn.* 2016;59.

33. Ueland FR. A Perspective on Ovarian Cancer Biomarkers: Past, Present and Yet-To-Come. *Diagnostics.* 2017;7(1).

34. Koncina E, Haan S, Rauh S, Letellier E. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers for Colorectal Cancer: Updates and Challenges. *Cancers.* 2020;12(2).

35. Toma SC, Ungureanu BS, Patrascu S, Surlin V, Georgescu I. Colorectal Cancer Biomarkers - A New Trend in Early Diagnosis. *Curr Health Sci J.* 2018;44(2):140-146.

36. Clark-Langone KM, Wu JY, Sangli C, et al. Biomarker discovery for colon cancer using a 761 gene RT-PCR assay. *Bmc Genomics.* 2007;8.

37. Batista R, Vinagre N, Meireles S, et al. Biomarkers for Bladder Cancer Diagnosis and Surveillance: A Comprehensive Review. *Diagnostics.* 2020;10(1).

38. Soria F, Krabbe LM, Todenhofer T, et al. Molecular markers in bladder cancer. *World J Urol.* 2019;37(1):31-40.

39. Türkiye Kanser İstatistikleri 2015. 2018. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf.

40. Maringe C, Spicer J, Morris M, et al. The impact of the COVID-19 pandemic on cancer deaths due to delays in diagnosis in England, UK: a national, population-based, modelling study. *Lancet Oncology.* 2020;21(8):1023-1034.

41. Kempf E, Lame G, Layese R, et al. New cancer cases at the time of SARS-Cov2 pandemic and related public health policies: A persistent and concerning decrease long after the end of the national lockdown. *Eur J Cancer.* 2021;150:260-267.

42. American Society of Clinical Oncology. Colorectal Cancer: Risk Factors and Prevention. Jan. 2021.

43. Burt R. Inheritance of Colorectal Cancer. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2007;4(4):293-300.

44. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2044-2058.

45. Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience.* 2014;1(6):400-406.

46. Macrae FA. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. Feb. 2021 https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors.

47. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol.* 2019;14(2):89-103.

48. Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009;22(4):191-197.

49. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Daire Başkanlığı. Kolorektal Kanser Tarama Programı Ulusal Standartları. 2017; https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-tarama-standartlari/.

50. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(3):153-173.

51. Nitsche U, Zimmermann A, Spath C, et al. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. *Ann Surg.* 2013;258(5):775-782; discussion 782-773.

52. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(12):713-732.

53. Recio-Boiles A, Cagir B. Colon Cancer. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2021.

54. 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;187:105-118.

55. Rosen RD, Sapra A. TNM Classification. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2021.

56. National Institutes of Health. Advances in Colorectal Cancer Research. 2015, Aug 20; https://www.nih.gov/research-training/advances-colorectal-cancer-research.

57. Nguyen HT, Duong HQ. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncol Lett.* 2018;16(1):9-18.

58. Frucht H, Lucas AL. Molecular genetics of colorectal cancer. In: Goldberg RM, Raby BA, eds: UpToDate; 2019, Jan 15.

59. Taghizadeh E, Hayat SMG, Rosengren RJ, Rostami D, Abdolkarimi H, Sahebkar A. Molecular Pathways, Screening and Follow-up of Colorectal Carcinogenesis: An Overview. *Curr Cancer Ther Rev.* 2020;16(2):88-96.

60. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1).

61. Bogaert J, Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol.* 2014;27(1):9-14.

62. Nojadeh JN, Behrouz Sharif S, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J.* 2018;17:159-168.

63. Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, Hiraishi H. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer.* 2016;35:4.

64. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011;25(10):1010-1022.

65. Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2013;6(3):120-128.

66. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15065.

67. Juo YY, Johnston FM, Zhang DY, et al. Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.* 2014;25(12):2314-2327.

68. Hinoue T, Weisenberger DJ, Lange CP, et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res.* 2012;22(2):271-282.

69. Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int.* 2015;2015.

70. Nikolouzakis TK, Vasilopoulou L, Fragkiadaki P, et al. Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients (Review). *Oncol Rep.* 2018;39(6):2455-2472.

71. Loktionov A. Biomarkers for detecting colorectal cancer non-invasively: DNA, RNA or proteins? *World J Gastro Oncol.* 2020;12(2).

72. Oh HH, Joo YE. Novel biomarkers for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Intest Res.* 2020;18(2):168-183.

73. Peluso G, Incollingo P, Calogero A, et al. Current Tissue Molecular Markers in Colorectal Cancer: A Literature Review. *Biomed Res Int.* 2017;2017.

74. Annahazi A, Abraham S, Farkas K, et al. A pilot study on faecal MMP-9: a new noninvasive diagnostic marker of colorectal cancer. *Brit J Cancer.* 2016;114(7):787-792.

75. Berretta M, Alessandrini L, De Divitiis C, et al. Serum and tissue markers in colorectal cancer: State of art. *Crit Rev Oncol Hemat.* 2017;111:103-116.

76. Vacante M, Borzi AM, Basile F, Biondi A. Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. *World J Clin Cases.* 2018;6(15):869-881.

77. Tiwari A, Saraf S, Verma A, Panda PK, Jain SK. Novel targeting approaches and signaling pathways of colorectal cancer: An insight. *World J Gastroenterol.* 2018;24(39):4428-4435.

78. Li YJ, Li WE. BRAF mutation is associated with poor clinicopathological outcomes in colorectal cancer: A meta-analysis. *Saudi J Gastroentero.* 2017;23(3):144-149.

79. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(5):625-657.

80. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene.* 2008;27(41):5486-5496.

81. Molinari F, Frattini M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2013;3:326.

82. Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF-beta/SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci.* 2018;14(2):111-123.

83. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, et al. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. *New Engl J Med.* 2014;370(14):1287-1297.

84. Hauptman N, Glavac D. Colorectal Cancer Blood-Based Biomarkers. *Gastroenterol Res Pract.* 2017;2017:2195361.

85. Marshall KW, Mohr S, El Khettabi F, et al. A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010;126(5):1177-1186.

86. O'Connell MJ, Lavery I, Yothers G, et al. Relationship Between Tumor Gene Expression and Recurrence in Four Independent Studies of Patients With Stage II/III Colon Cancer Treated With Surgery Alone or Surgery Plus Adjuvant Fluorouracil Plus Leucovorin. *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28(25):3937-3944.

87. Salazar R, Roepman P, Capella G, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(1):17-24.

88. Galamb O, Bartak BK, Kalmar A, et al. Diagnostic and prognostic potential of tissue and circulating long non-coding RNAs in colorectal tumors. *World J Gastroentero.* 2019;25(34):5026-5048.

89. Deng H, Wang JM, Li M, et al. Long non-coding RNAs: New biomarkers for prognosis and diagnosis of colon cancer. *Tumor Biol.* 2017;39(6).

90. Liang WC, Fu WM, Wong CW, et al. The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2015;6(26):22513-22525.

91. Wang HY, Wang YP, Zeng X, et al. Circular RNA is a popular molecule in tumors of the digestive system (Review). *Int J Oncol.* 2020;57(1):21-42.

92. Weng WH, Wei Q, Toden S, et al. Circular RNA ciRS-7-A Promising Prognostic Biomarker and a Potential Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(14):3918-3928.

93. Hao SH, Cong L, Qu RF, Liu R, Zhang GZ, Li YR. Emerging roles of circular RNAs in colorectal cancer. *Oncotargets Ther.* 2019;12:4765-4777.

94. Ahlquist DA. Multi-Target Stool DNA Test: A New High Bar for Noninvasive Screening. *Digest Dis Sci.* 2015;60(3):623-633.

95. The United States Food and Drug Administration. Cologuard - Patient Guide. 2014.

96. Lidgard GP, Domanico MJ, Bruinsma JJ, et al. Clinical Performance of an Automated Stool DNA Assay for Detection of Colorectal Neoplasia. *Clin Gastroenterol H.* 2013;11(10):1313-1318.

97. Maak M, Simon I, Nitsche U, et al. Independent Validation of a Prognostic Genomic Signature (ColoPrint) for Patients With Stage II Colon Cancer. *Annals of Surgery.* 2013;257(6):1053-1058.

98. Kopetz S, Tabernero J, Rosenberg R, et al. Genomic Classifier ColoPrint Predicts Recurrence in Stage II Colorectal Cancer Patients More Accurately Than Clinical Factors. *Oncologist.* 2015;20(2):127-133.

99. You YN, Rustin RB, Sullivan JD. Oncotype DX((R)) colon cancer assay for prediction of recurrence risk in patients with stage II and III colon cancer: A review of the evidence. *Surg Oncol.* 2015;24(2):61-66.

100. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(14):1054-1061.

101. Manne U, Srivastava RG, Srivastava S. Recent advances in biomarkers for cancer diagnosis and treatment. *Drug Discov Today.* 2005;10(14):965-976.

102. Mordente A, Meucci E, Martorana GE, Silvestrini A. Cancer Biomarkers Discovery and Validation: State of the Art, Problems and Future Perspectives. *Adv Exp Med Biol.* 2015;867:9-26.

103. Scatena R. Advances in Cancer Biomarkers: a Preface. *Advances in Cancer Biomarkers: From Biochemistry to Clinic for a Critical Revision.* 2015;867:V-V.

104. Clark-Langone KM, Sangli C, Krishnakumar J, Watson D. Translating tumor biology into personalized treatment planning: analytical performance characteristics of the Oncotype DX (R) Colon Cancer Assay. *Bmc Cancer.* 2010;10.

105. Gray RG, Quirke P, Handley K, et al. Validation Study of a Quantitative Multigene Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay for Assessment of Recurrence Risk in Patients With Stage II Colon Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2011;29(35):4611-4619.

106. Venook AP, Niedzwiecki D, Lopatin M, et al. Biologic Determinants of Tumor Recurrence in Stage II Colon Cancer: Validation Study of the 12-Gene Recurrence Score in Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 9581. *Journal of Clinical Oncology.* 2013;31(14):1775-+.

107. Yothers G, O'Connell MJ, Lee M, et al. Validation of the 12-Gene Colon Cancer Recurrence Score in NSABP C-07 As a Predictor of Recurrence in Patients With Stage II and III Colon Cancer Treated With Fluorouracil and Leucovorin (FU/LV) and FU/LV Plus Oxaliplatin. *Journal of Clinical Oncology.* 2013;31(36):4512-+.

108. Yamanaka T, Oki E, Yamazaki K, et al. 12-Gene Recurrence Score Assay Stratifies the Recurrence Risk in Stage II/III Colon Cancer With Surgery Alone: The SUNRISE Study. *J Clin Oncol.* 2016;34(24):2906-2913.

109. Cartwright T, Chao C, Lee M, et al. Effect of the 12-gene colon cancer assay results on adjuvant treatment recommendations in patients with stage II colon cancer. *Curr Med Res Opin.* 2014;30(2):321-328.

110. Srivastava G, Renfro LA, Behrens RJ, et al. Prospective Multicenter Study of the Impact of Oncotype DX Colon Cancer Assay Results on Treatment Recommendations in Stage II Colon Cancer Patients. *Oncologist.* 2014;19(5):492-497.

111. Brenner B, Geva R, Rothney M, et al. Impact of the 12-Gene Colon Cancer Assay on Clinical Decision Making for Adjuvant Therapy in Stage II Colon Cancer Patients. *Value Health.* 2016;19(1):82-87.

112. Hornberger J, Lyman GH, Chien R, Meropol NJ. A Multigene Prognostic Assay for Selection of Adjuvant Chemotherapy in Patients with T3, Stage II Colon Cancer: Impact on Quality-Adjusted Life Expectancy and Costs. *Value Health.* 2012;15(8):1014-1021.

113. Alberts SR, Yu TM, Behrens RJ, et al. Comparative Economics of a 12-Gene Assay for Predicting Risk of Recurrence in Stage II Colon Cancer. *Pharmacoeconomics.* 2014;32(12):1231-1243.

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

115. Buechler SA, Stephens MT, Hummon AB, et al. ColoType: a forty gene signature for consensus molecular subtyping of colorectal cancer tumors using whole-genome assay or targeted RNA-sequencing. *Sci Rep-Uk.* 2020;10(1).

116. The National Center for Biotechnology Information N. COL1A1 collagen type I alpha 1 chain [Homo sapiens (human)]. 2019, July 30; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1277#gene-expression.

117. Drew JE, Farquharson AJ, Mayer CD, et al. Predictive Gene Signatures: Molecular Markers Distinguishing Colon Adenomatous Polyp and Carcinoma. *Plos One.* 2014;9(11).

118. Zou X, Feng B, Dong TT, et al. Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis. *J Proteomics.* 2013;94:473-485.

119. Kirkland SC. Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *Brit J Cancer*. 2009;101(2):320-326.

120. Zhang ZY, Wang YX, Zhang JH, Zhong JT, Yang R. COL1A1 promotes metastasis in colorectal cancer by regulating the WNT/PCP pathway. *Mol Med Rep.* 2018;17(4):5037-5042.

121. Li J, Ding YM, Li AQ. Identification of COL1A1 and COL1A2 as candidate prognostic factors in gastric cancer. *World J Surg Oncol.* 2016;14.

122. Brooks M, Mo Q, Krasnow R, et al. Positive association of collagen type I with non-muscle invasive bladder cancer progression. *Oncotarget.* 2016;7(50):82609-82619.

123. Liu WB, Wei HF, Gao ZY, et al. COL5A1 may contribute the metastasis of lung adenocarcinoma. *Gene.* 2018;665:57-66.

124. Wu M, Sun Q, Mo CH, et al. Prospective molecular mechanism of COL5A1 in breast cancer based on a microarray, RNA sequencing and immunohistochemistry. *Oncol Rep.* 2019;42(1):151-175.

125. Zhang JG, Zhang JH, Wang FC, et al. Overexpressed COL5A1 is correlated with tumor progression, paclitaxel resistance, and tumor-infiltrating immune cells in ovarian cancer. *J Cell Physiol.* 2021.

126. Feng G, Ma HM, Huang HB, et al. Overexpression of COL5A1 promotes tumor progression and metastasis and correlates with poor survival of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Manag Res.* 2019;11:1263-1274.

127. Wang X, Zhang L, Li H, Sun WJ, Zhang HH, Lai MD. THBS2 is a Potential Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer. *Sci Rep-Uk.* 2016;6.

128. The National Center for Biotechnology Information N. FN1 fibronectin 1 [Homo sapiens (human)]. 2019 July 23; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2335.

129. Waalkes S, Atschekzei F, Kramer MW, et al. Fibronectin 1 mRNA expression correlates with advanced disease in renal cancer. *Bmc Cancer.* 2010;10.

130. Sponziello M, Rosignolo F, Celano M, et al. Fibronectin-1 expression is increased in aggressive thyroid cancer and favors the migration and invasion of cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;431(C):123-132.

131. Wu JJ, Wang YH, Xu X, et al. Transcriptional activation of FN1 and IL11 by HMGA2 promotes the malignant behavior of colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2016;37(5):511-521.

132. Cai X, Liu C, Zhang TN, Zhu YW, Dong X, Xue P. Down-regulation of FN1 inhibits colorectal carcinogenesis by suppressing proliferation, migration, and invasion. *J Cell Biochem.* 2018;119(6):4717-4728.

133. Adams JC, Lawler J. The Thrombospondins. *Csh Perspect Biol.* 2011;3(10).

## EKLER

## EK 1. TÜMÖR ÖRNEKLERİNİN RNA İZOLASYON SONUÇLARI

| Lab kodu | Konsantrasyon, ng/ul | 260/280 | 260/230 | Lab kodu | Konsantrasyon, ng/ul | 260/280 | 260/230 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 20/01 | 336.03 | 2.0 | 2.0 | 20/101 | 423.26 | 2.0 | 2.0 |
| 20/02 | 423.81 | 2.0 | 2.0 | 20/102 | 446.23 | 2.0 | 2.1 |
| 20/03 | 494.77 | 2.1 | 2.2 | 20/103 | 119.48 | 1.8 | 1.4 |
| 20/04 | 248.53 | 2.0 | 1.9 | 20/104 | 239.40 | 2.0 | 1.9 |
| 20/05 | 479.68 | 2.0 | 2.0 | 20/105 | 302.29 | 2.1 | 2.1 |
| 20/06 | 526.06 | 2.1 | 2.2 | 20/106 | 314.85 | 1.9 | 1.8 |
| 20/07 | 461.35 | 2.1 | 2.1 | 20/107 | 427.68 | 2.0 | 1.9 |
| 20/08 | 429.61 | 2.0 | 2.1 | 20/108 | 458.36 | 2.0 | 2.0 |
| 20/09 | 322.47 | 2.0 | 2.1 | 20/109 | 430.91 | 2.0 | 2.0 |
| 20/10 | 473.32 | 2.0 | 2.1 | 20/110 | 301.81 | 2.1 | 2.0 |
| 20/11 | 422.23 | 2.0 | 2.1 | 20/111 | 451.74 | 2.0 | 2.2 |
| 20/12 | 343.02 | 2.0 | 2.1 | 20/112 | 458.37 | 2.0 | 2.1 |
| 20/13 | 408.63 | 2.1 | 2.1 | 20/113 | 464.98 | 2.0 | 2.0 |
| 20/14 | 498.96 | 2.1 | 2.1 | 20/114 | 318.63 | 2.0 | 1.9 |
| 20/15 | 399.17 | 2.0 | 1.9 | 20/115 | 441.36 | 2.0 | 2.0 |
| 20/16 | 317.73 | 2.1 | 2.1 | 20/116 | 485.79 | 2.0 | 2.1 |
| 20/17 | 473.40 | 2.0 | 2.1 | 20/117 | 458.01 | 2.1 | 1.7 |
| 20/18 | 501.12 | 2.1 | 1.9 | 20/118 | 431.14 | 2.0 | 2.0 |
| 20/19 | 461.02 | 2.0 | 2.0 | 20/119 | 419.69 | 2.0 | 2.0 |
| 20/20 | 420.23 | 2.0 | 1.9 | 20/120 | 535.49 | 2.0 | 2.0 |
| 20/21 | 464.55 | 2.0 | 1.9 | 20/121 | 426.80 | 2.0 | 2.0 |
| 20/22 | 493.97 | 2.1 | 1.9 | 20/122 | 473.66 | 2.0 | 2.1 |
| 20/23 | 432.58 | 2.1 | 2.1 | 20/123 | 455.45 | 2.0 | 2.1 |
| 20/24 | 316.63 | 2.0 | 1.6 | 20/124 | 482.04 | 2.0 | 2.0 |
| 20/25 | 23.80 | 1.6 | 1.7 | 20/125 | 451.97 | 2.0 | 1.9 |
| 20/26 | 422.18 | 2.0 | 1.9 | 20/126 | 470.70 | 2.1 | 2.2 |
| 20/27 | 419.29 | 2.0 | 2.0 | 20/127 | 449.87 | 2.0 | 2.0 |
| 20/28 | 515.84 | 2.1 | 1.2 | 20/128 | 451.00 | 2.1 | 2.0 |
| 20/29 | 479.18 | 2.0 | 1.8 | 20/129 | 425.65 | 2.1 | 2.0 |
| 20/30 | 422.00 | 2.0 | 1.7 | 20/130 | 410.11 | 2.0 | 2.1 |
| 20/31 | 399.62 | 2.0 | 2.1 | 20/131 | 488.42 | 2.0 | 2.1 |
| 20/32 | 450.54 | 2.0 | 1.9 | 20/132 | 467.23 | 2.0 | 1.9 |
| 20/33 | 465.72 | 2.0 | 2.1 | 20/133 | 396.48 | 2.0 | 1.9 |
| 20/34 | 482.71 | 2.0 | 1.9 | 20/134 | 280.55 | 2.0 | 1.8 |
| 20/35 | 285.63 | 2.0 | 2.0 | 20/135 | 454.54 | 2.0 | 2.1 |
| 20/36 | 399.36 | 2.0 | 2.0 | 20/136 | 336.02 | 2.0 | 1.7 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 20/37 | 402.32 | 2.0 | 2.0 | 20/137 | 454.30 | 1.8 | 1.8 |
| 20/38 | 464.78 | 2.1 | 2.1 | 20/138 | 407.53 | 2.1 | 2.1 |
| 20/39 | 428.86 | 2.0 | 2.1 | 20/139 | 447.85 | 2.0 | 2.1 |
| 20/40 | 530.89 | 2.1 | 2.2 | 20/140 | 529.04 | 2.1 | 2.1 |
| 20/41 | 454.66 | 2.1 | 2.1 | 20/141 | 529.32 | 2.1 | 2.1 |
| 20/42 | 324.02 | 2.0 | 1.9 | 20/142 | 474.07 | 2.1 | 2.0 |
| 20/43 | 486.23 | 2.0 | 2.1 | 20/143 | 470.47 | 2.0 | 2.0 |
| 20/44 | 350.86 | 2.1 | 2.1 | 20/144 | 472.78 | 2.0 | 2.1 |
| 20/45 | 389.77 | 2.0 | 2.1 | 20/145 | 443.49 | 2.0 | 2.0 |
| 20/46 | 489.37 | 2.1 | 2.0 | 20/146 | 459.83 | 2.0 | 1.9 |
| 20/47 | 476.16 | 2.0 | 2.1 | 20/147 | 449.09 | 2.1 | 2.1 |
| 20/48 | 206.00 | 2.0 | 2.0 | 20/148 | 462.85 | 2.0 | 1.9 |
| 20/49 | 462.16 | 2.0 | 2.1 | 20/149 | 489.63 | 2.0 | 2.1 |
| 20/50 | 485.94 | 2.2 | 1.9 | 20/150 | 324.16 | 2.0 | 1.7 |
| 20/51 | 388.10 | 2.0 | 1.8 | 20/151 | 473.07 | 2.1 | 2.0 |
| 20/52 | 322.82 | 2.0 | 2.0 | 20/152 | 439.38 | 2.0 | 2.0 |
| 20/53 | 471.56 | 2.0 | 2.0 | 20/153 | 430.08 | 2.0 | 2.0 |
| 20/54 | 428.03 | 2.0 | 2.0 | 20/154 | 460.34 | 2.1 | 2.1 |
| 20/55 | 504.31 | 2.0 | 2.0 | 20/155 | 371.03 | 2.1 | 2.1 |
| 20/56 | 192.05 | 2.0 | 2.0 | 20/156 | 439.86 | 2.0 | 2.0 |
| 20/57 | 276.00 | 2.1 | 2.2 | 20/157 | 443.40 | 2.1 | 2.2 |
| 20/58 | 404.18 | 2.1 | 2.1 | 20/158 | 428.53 | 2.0 | 2.0 |
| 20/59 | 240.78 | 2.0 | 1.8 | 20/159 | 480.73 | 2.0 | 2.2 |
| 20/60 | 484.25 | 2.0 | 2.1 | 20/160 | 470.19 | 2.0 | 1.9 |
| 20/61 | 403.88 | 2.0 | 2.1 | 20/161 | 469.88 | 2.0 | 2.0 |
| 20/62 | 325.04 | 2.1 | 2.0 | 20/162 | 437.51 | 1.9 | 1.9 |
| 20/63 | 461.44 | 2.0 | 1.9 | 20/163 | 464.27 | 2.1 | 1.9 |
| 20/64 | 425.73 | 2.1 | 2.1 | 20/164 | 467.45 | 2.0 | 2.0 |
| 20/65 | 394.07 | 2.0 | 2.0 | 20/165 | 320.46 | 2.1 | 2.1 |
| 20/66 | 466.30 | 2.0 | 2.1 | 20/166 | 492.69 | 2.0 | 2.1 |
| 20/67 | 331.56 | 2.0 | 1.9 | 20/167 | 412.65 | 2.1 | 2.0 |
| 20/68 | 401.71 | 2.1 | 2.0 | 20/168 | 236.90 | 2.1 | 2.0 |
| 20/69 | 382.13 | 2.0 | 1.9 | 20/169 | 490.95 | 2.0 | 2.1 |
| 20/70 | 444.86 | 2.0 | 2.1 | 20/170 | 498.42 | 2.0 | 2.1 |
| 20/71 | 364.99 | 2.0 | 2.1 | 20/171 | 514.19 | 2.1 | 2.1 |
| 20/72 | 403.57 | 2.1 | 2.1 | 20/172 | 494.50 | 2.0 | 1.8 |
| 20/73 | 379.93 | 2.1 | 2.1 | 20/173 | 420.90 | 2.1 | 2.1 |
| 20/74 | 457.30 | 2.0 | 2.1 | 20/174 | 415.15 | 2.1 | 2.1 |
| 20/75 | 440.33 | 2.0 | 2.1 | 20/175 | 463.02 | 2.0 | 2.1 |
| 20/76 | 424.10 | 1.9 | 2.0 | 20/176 | 419.98 | 2.1 | 2.1 |
| 20/77 | 427.34 | 2.0 | 2.1 | 20/177 | 423.96 | 2.1 | 2.0 |
| 20/78 | 400.00 | 2.1 | 2.1 | 20/178 | 443.16 | 2.0 | 2.1 |
| 20/79 | 471.85 | 2.0 | 2.1 | 20/179 | 477.07 | 2.0 | 1.9 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 20/80 | 442.48 | 2.0 | 2.0 | 20/180 | 472.46 | 1.9 | 1.8 |
| 20/81 | 221.28 | 2.1 | 2.1 | 20/181 | 472.89 | 2.0 | 2.0 |
| 20/82 | 440.79 | 2.0 | 2.1 | 20/182 | 476.65 | 2.0 | 2.0 |
| 20/83 | 436.80 | 2.0 | 2.0 | 20/183 | 477.18 | 2.1 | 2.2 |
| 20/84 | 376.82 | 2.0 | 2.1 | 20/184 | 475.70 | 2.0 | 1.9 |
| 20/85 | 421.40 | 2.1 | 2.1 | 20/185 | 272.40 | 2.0 | 2.1 |
| 20/86 | 426.34 | 2.0 | 2.0 | 20/186 | 483.71 | 2.0 | 2.1 |
| 20/87 | 426.27 | 2.0 | 1.9 | 20/187 | 452.71 | 2.0 | 2.0 |
| 20/88 | 453.73 | 2.0 | 1.9 | 20/188 | 436.46 | 2.1 | 1.9 |
| 20/89 | 379.11 | 2.1 | 2.0 | 20/189 | 481.88 | 2.1 | 2.0 |
| 20/90 | 460.66 | 2.0 | 2.0 | 20/190 | 418.87 | 2.0 | 2.1 |
| 20/91 | 462.98 | 2.0 | 2.0 | 20/191 | 367.83 | 2.0 | 1.9 |
| 20/92 | 404.08 | 2.0 | 1.9 | 20/192 | 481.81 | 2.0 | 2.0 |
| 20/93 | 452.99 | 2.0 | 2.2 | 20/193 | 478.98 | 2.0 | 2.0 |
| 20/94 | 466.92 | 2.0 | 2.0 | 20/194 | 474.39 | 2.0 | 2.0 |
| 20/95 | 425.00 | 2.1 | 2.0 | 20/195 | 454.50 | 2.1 | 2.0 |
| 20/96 | 423.15 | 2.0 | 2.0 | 20/196 | 466.52 | 2.0 | 1.9 |
| 20/97 | 480.86 | 2.1 | 2.1 | 20/197 | 436.15 | 2.0 | 2.0 |
| 20/98 | 461.10 | 2.1 | 1.9 | 20/198 | 466.85 | 2.0 | 2.0 |
| 20/99 | 445.40 | 2.0 | 2.0 | 20/199 | 488.76 | 2.0 | 1.9 |
| 20/100 | 408.51 | 2.0 | 2.1 | 20/200 | 503.33 | 2.1 | 2.1 |

## EK 2. KONTROL ÖRNEKLERİNİN RNA İZOLASYON SONUÇLARI

| Lab kodu | Konsantrasyon ng/ul | 260/280 | 260/230 | Lab kodu | Konsantrasyon ng/ul | 260/280 | 260/230 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 20/02K | 453.7 | 2.1 | 2 | 20/98K | 448.6 | 2 | 2 |
| 20/03K | 434.1 | 2 | 2.1 | 20/101K | 502.4 | 2.1 | 2.1 |
| 20/07K | 426.7 | 2 | 2.1 | 20/104K | 490.5 | 2.1 | 2.2 |
| 20/08K | 431.5 | 2 | 2.1 | 20/107K | 470.1 | 2.1 | 2 |
| 20/10K | 196.7 | 2.1 | 2 | 20/108K | 421.2 | 2 | 2.1 |
| 20/18K | 387.5 | 2.1 | 2.1 | 20/109K | 438.6 | 2 | 2 |
| 20/19K | 469.4 | 2 | 2.1 | 20/115K | 329.9 | 2.1 | 2.2 |
| 20/21K | 408.1 | 2 | 2.1 | 20/118K | 447.6 | 2 | 2.1 |
| 20/29K | 472.7 | 2 | 2.1 | 20/119K | 461.6 | 2 | 2.1 |
| 20/32K | 246.1 | 2 | 2.1 | 20/123K | 447.4 | 2.1 | 2.2 |
| 20/37K | 460.2 | 2 | 2.1 | 20/124K | 440.3 | 2 | 2 |
| 20/39K | 353.2 | 2 | 2.1 | 20/125K | 469.5 | 2.1 | 2.2 |
| 20/40K | 484.7 | 2 | 2.2 | 20/126K | 441.2 | 2 | 2.1 |
| 20/41K | 480.5 | 2 | 2.1 | 20/128K | 485.1 | 2 | 2 |
| 20/43K | 452.2 | 2.1 | 2 | 20/129K | 463.2 | 2 | 2 |
| 20/44K | 426 | 2.1 | 2.1 | 20/130K | 437 | 2 | 1.8 |
| 20/45K | 458.6 | 2 | 2.1 | 20/133K | 479.7 | 2.1 | 2.1 |
| 20/49K | 445.2 | 2 | 2.1 | 20/138K | 455.9 | 2.1 | 2 |
| 20/50K | 461.1 | 2.1 | 2.1 | 20/144K | 434.4 | 2 | 2.1 |
| 20/60K | 448.7 | 2 | 2.1 | 20/148K | 397.6 | 2.1 | 2.1 |
| 20/63K | 476.2 | 2 | 2.1 | 20/152K | 371 | 2.1 | 2.1 |
| 20/64K | 309.6 | 2.1 | 2.1 | 20/153K | 378.8 | 2 | 2.1 |
| 20/68K | 453.8 | 2.1 | 2 | 20/154K | 479.3 | 2.1 | 2 |
| 20/69K | 416.2 | 2 | 1.8 | 20/158K | 465.6 | 2 | 2 |
| 20/71K | 469.2 | 2 | 2.1 | 20/159K | 478.5 | 2 | 2 |
| 20/72K | 461.7 | 2 | 2.1 | 20/163K | 459.8 | 2 | 2.1 |
| 20/74K | 421.8 | 2 | 2 | 20/167K | 445.2 | 2 | 2 |
| 20/80K | 443 | 1.9 | 1.7 | 20/171K | 450.8 | 2.1 | 2 |
| 20/85K | 398.3 | 2.1 | 2.1 | 20/174K | 486.7 | 2.1 | 2 |
| 20/87K | 479 | 2 | 2.1 | 20/177K | 417.4 | 2 | 1.9 |
| 20/88K | 508.9 | 2.1 | 2.2 | 20/181K | 466.1 | 2 | 2.1 |
| 20/89K | 312.5 | 2 | 2 | 20/184K | 421.7 | 2 | 2.1 |
| 20/90K | 492.1 | 2.1 | 2.2 | 20/187K | 397.3 | 2 | 2 |
| 20/92K | 439.7 | 2 | 2.1 | 20/191K | 481.7 | 2.1 | 1.9 |
| 20/97K | 484.6 | 2 | 2.1 | 20/195K | 470.8 | 2 | 2.1 |

## EK 3. 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 |
| THBS2 | AGCTCAGCGAGAACCTCAAG | TTCATTTTCCGCAAAGAACC | 128 | 60 |
| B2M | TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT | TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT | 86 | 57 |
| HPRT | TGACACTGGCAAAACAATGCA | GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT | 94 | 59 |

## EK 4. QRT-PCR TÜMÖR SONUÇLARI: ORTALAMA CP DEĞERİ

| Lab kodu | Ortalama Cp değeri | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | COL1A1 | COL5A1 | THBS2 | FN1 | B2M | HPRT |
| 20/01 | 33.9 | 35.1 | 35.0 | 36.9 | 28.5 | 34.1 |
| 20/02 | 33.2 | 35.4 | 36.3 | 35.0 | 26.3 | 32.6 |
| 20/03 | 30.6 | 32.3 | 33.5 | 33.9 | 23.9 | 30.1 |
| 20/04 | 34.9 | 38.8 | 33.7 | 33.3 | 34.0 | 36.6 |
| 20/05 | 34.8 | 37.0 | 37.7 | 36.5 | 29.3 | 34.0 |
| 20/06 | 34.9 | 36.6 | 35.8 | 37.7 | 28.8 | 33.8 |
| 20/07 | 31.4 | 34.8 | 33.7 | 34.6 | 25.2 | 30.9 |
| 20/08 | 30.8 | 33.7 | 33.9 | 34.8 | 26.6 | 30.9 |
| 20/09 | 31.2 | 34.2 | 34.3 | 35.7 | 27.5 | 32.9 |
| 20/10 | 30.3 | 33.6 | 33.8 | 35.4 | 27.0 | 32.4 |
| 20/11 | 32.8 | 35.0 | 35.1 | 34.4 | 27.0 | 32.8 |
| 20/12 | 33.3 | 35.4 | 35.6 | 36.9 | 27.8 | 36.5 |
| 20/13 | 28.6 | 32.1 | 33.7 | 32.8 | 25.2 | 30.8 |
| 20/14 | 29.4 | 33.0 | 33.3 | 34.1 | 24.8 | 29.8 |
| 20/15 | 31.4 | 33.7 | 33.6 | 35.8 | 25.9 | 31.6 |
| 20/16 | 32.5 | 35.4 | 35.8 | 37.0 | 30.4 | 36.0 |
| 20/17 | 30.6 | 33.2 | 32.9 | 33.9 | 25.4 | 31.4 |
| 20/18 | 29.9 | 34.7 | 33.9 | 36.4 | 27.2 | 33.2 |
| 20/19 | 29.0 | 31.8 | 32.1 | 31.8 | 23.1 | 29.6 |
| 20/20 | 30.1 | 32.9 | 33.7 | 34.6 | 26.7 | 30.9 |
| 20/21 | 29.1 | 32.1 | 32.4 | 32.9 | 26.4 | 30.9 |
| 20/22 | 36.1 | 35.9 | 36.7 | 37.0 | 26.3 | 35.2 |
| 20/23 | 28.2 | 31.0 | 31.7 | 32.9 | 24.4 | 29.8 |
| 20/24 | 35.9 | 36.6 | 34.9 | 36.1 | 31.8 | 34.5 |
| 20/25 | 35.7 | 36.5 | 33.6 | 33.1 | 31.5 | 36.2 |
| 20/26 | 37.5 | - | 36.0 | 35.1 | 34.3 | 36.6 |
| 20/27 | 35.6 | 37.3 | 33.6 | 33.5 | 29.0 | 36.4 |
| 20/28 | 34.1 | 36.6 | 33.6 | 34.5 | 29.2 | 36.8 |
| 20/29 | 33.9 | 37.3 | 35.9 | 35.4 | 32.2 | 35.7 |
| 20/30 | 34.5 | 37.8 | 33.8 | 35.1 | 34.2 | 36.8 |
| 20/31 | 36.0 | 38.8 | 34.0 | 33.9 | 32.4 | 36.2 |
| 20/32 | 32.3 | 34.2 | 34.1 | 35.5 | 28.6 | 31.7 |
| 20/33 | 27.3 | 30.7 | 31.0 | 31.9 | 24.9 | 30.4 |
| 20/34 | 33.8 | 36.1 | 36.8 | 36.4 | 29.0 | 34.9 |
| 20/35 | 33.0 | 34.6 | 34.5 | 36.2 | 27.5 | 32.7 |
| 20/36 | 32.5 | 34.6 | 35.1 | 35.8 | 28.9 | 34.2 |
| 20/37 | 27.3 | 30.3 | 31.1 | 31.5 | 24.6 | 30.4 |
| 20/38 | 32.1 | 34.5 | 34.4 | 36.1 | 28.9 | 32.8 |
| 20/39 | 28.6 | 31.3 | 31.7 | 32.3 | 24.6 | 31.9 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 20/40 | 34.8 | 35.7 | 37.4 | 36.7 | 30.0 | 33.9 |
| 20/41 | 30.7 | 33.4 | 34.5 | 35.4 | 25.8 | 30.9 |
| 20/42 | 32.7 | 34.3 | 35.5 | 36.5 | 27.3 | 32.3 |
| 20/43 | 28.1 | 30.7 | 31.2 | 33.0 | 24.8 | 29.7 |
| 20/44 | 29.1 | 31.5 | 32.3 | 33.6 | 25.6 | 31.2 |
| 20/45 | 28.8 | 31.3 | 31.6 | 32.4 | 24.6 | 28.8 |
| 20/46 | 29.2 | 31.6 | 32.0 | 32.0 | 24.8 | 30.5 |
| 20/47 | 36.8 | 37.6 | 35.6 | - | 29.5 | 33.9 |
| 20/48 | 33.0 | 34.9 | 36.2 | 36.4 | 26.6 | 32.2 |
| 20/49 | 28.4 | 31.6 | 32.0 | 34.0 | 24.7 | 28.9 |
| 20/50 | 29.0 | 31.8 | 32.1 | 32.8 | 26.7 | 30.9 |
| 20/51 | 27.4 | 31.3 | 30.7 | 31.2 | 25.8 | 31.0 |
| 20/52 | 32.8 | 35.4 | 34.5 | 37.6 | 27.6 | 31.0 |
| 20/53 | 35.6 | 36.7 | 35.3 | 38.8 | 30.3 | 34.0 |
| 20/54 | 33.5 | 36.7 | 35.0 | 36.5 | 31.2 | 34.1 |
| 20/55 | 36.1 | 36.3 | - | 35.8 | 30.5 | 36.8 |
| 20/56 | 35.6 | 36.7 | 35.8 | 37.2 | 30.1 | 35.6 |
| 20/57 | 32.4 | 34.8 | 34.7 | 36.4 | 27.0 | 32.3 |
| 20/58 | 33.1 | 33.2 | 35.9 | 36.3 | 28.9 | 33.8 |
| 20/59 | 32.2 | 36.4 | 35.6 | 36.8 | 30.9 | 35.6 |
| 20/60 | 35.6 | 36.9 | 35.1 | 38.8 | 30.5 | 32.9 |
| 20/62 | 29.3 | 32.3 | 32.5 | 33.0 | 26.1 | 32.1 |
| 20/63 | 33.9 | 35.6 | 35.3 | 36.3 | 29.3 | 32.7 |
| 20/64 | 31.3 | 34.3 | 34.7 | 36.2 | 26.6 | 31.7 |
| 20/65 | 34.7 | 36.1 | 36.3 | 36.3 | 29.4 | 33.0 |
| 20/66 | 34.6 | 36.5 | 35.9 | 37.2 | 30.7 | 34.6 |
| 20/67 | 34.8 | 39.0 | 34.7 | 35.2 | 33.9 | 35.1 |
| 20/68 | 32.5 | 35.6 | 35.2 | 37.1 | 29.6 | 32.5 |
| 20/69 | 31.8 | 34.6 | 34.7 | 35.0 | 27.4 | 33.1 |
| 20/70 | 35.5 | 37.1 | 36.3 | 37.3 | 31.8 | 36.0 |
| 20/71 | 35.1 | 36.2 | 32.9 | 36.5 | 30.2 | 34.1 |
| 20/72 | 34.2 | 36.2 | 36.3 | 35.3 | 32.0 | 34.9 |
| 20/73 | 33.2 | 35.0 | 35.5 | 35.3 | 28.2 | 32.4 |
| 20/74 | 33.4 | 37.7 | 36.0 | 34.8 | 28.6 | 35.2 |
| 20/75 | 36.0 | 37.1 | 28.1 | 38.2 | 30.2 | 34.4 |
| 20/76 | 34.5 | 36.1 | 34.0 | 34.5 | 31.3 | 34.4 |
| 20/77 | 32.9 | 35.8 | 35.5 | 33.9 | 30.8 | 33.1 |
| 20/78 | 35.2 | 38.1 | 35.3 | 36.0 | 30.9 | 35.7 |
| 20/79 | 32.4 | 34.7 | 36.8 | 36.1 | 27.7 | 32.7 |
| 20/80 | 33.1 | 36.8 | 35.4 | 37.7 | 28.1 | 32.4 |
| 20/81 | 31.9 | 34.8 | 34.1 | 36.1 | 26.9 | 32.0 |
| 20/82 | 35.9 | 37.0 | 35.1 | 36.0 | 29.3 | 33.7 |
| 20/83 | 33.5 | 35.8 | 33.4 | 36.9 | 27.4 | 33.0 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 20/84 | 31.9 | 34.2 | 32.7 | 35.6 | 27.5 | 35.1 |
| 20/85 | 27.0 | 30.7 | 30.8 | 31.3 | 24.1 | 29.8 |
| 20/86 | 29.6 | 32.3 | 31.1 | 35.5 | 25.6 | 31.5 |
| 20/87 | 33.3 | 34.5 | 33.5 | 35.8 | 26.4 | 32.7 |
| 20/88 | 32.1 | 34.1 | 33.9 | 35.7 | 26.1 | 33.0 |
| 20/89 | 30.6 | 33.4 | 32.3 | 34.4 | 24.8 | 31.3 |
| 20/90 | 30.9 | 32.4 | 32.7 | 33.5 | 23.2 | 30.8 |
| 20/91 | 30.8 | 32.9 | 32.0 | 34.5 | 24.6 | 32.1 |
| 20/92 | 29.5 | 32.0 | 31.4 | 32.0 | 23.0 | 30.3 |
| 20/93 | 30.1 | 32.2 | 32.8 | 29.7 | 24.3 | 31.0 |
| 20/94 | 35.5 | 38.0 | 36.8 | 38.1 | 28.6 | 33.0 |
| 20/95 | 31.1 | 33.4 | 32.9 | 35.1 | 23.5 | 30.3 |
| 20/96 | 29.0 | 32.0 | 30.8 | 33.2 | 24.6 | 30.9 |
| 20/97 | 32.2 | 35.0 | 34.0 | 36.9 | 26.0 | 32.1 |
| 20/98 | 31.9 | 34.9 | 33.4 | 36.8 | 27.0 | 33.6 |
| 20/99 | 32.7 | 33.0 | 33.0 | 34.2 | 25.9 | 31.9 |
| 20/100 | 35.4 | 36.0 | 34.2 | 36.5 | 27.5 | 34.4 |
| 20/101 | 32.5 | 33.1 | 32.7 | 33.6 | 24.2 | 31.4 |
| 20/102 | 35.1 | 35.3 | 34.7 | 37.8 | 27.8 | 34.5 |
| 20/103 | 35.8 | 37.1 | 33.3 | 33.7 | 29.0 | 36.1 |
| 20/104 | 32.8 | 33.8 | 34.4 | 33.9 | 25.4 | 32.0 |
| 20/105 | 32.1 | 33.0 | 33.1 | 34.4 | 25.7 | 32.0 |
| 20/106 | 34.1 | 35.4 | 33.7 | 35.4 | 27.6 | 34.7 |
| 20/107 | 33.3 | 34.8 | 34.6 | 36.1 | 26.7 | 32.6 |
| 20/108 | 32.7 | 33.0 | 33.5 | 34.2 | 25.6 | 32.1 |
| 20/109 | 32.0 | 32.4 | 32.8 | 33.8 | 26.1 | 32.5 |
| 20/110 | 29.9 | 30.9 | 30.1 | 29.8 | 25.1 | 32.6 |
| 20/111 | 32.1 | 32.7 | 32.3 | 33.5 | 24.5 | 31.0 |
| 20/112 | 37.2 | 35.6 | 35.7 | 36.3 | 29.2 | 33.9 |
| 20/113 | 33.6 | 33.3 | 34.4 | 35.5 | 28.5 | 34.3 |
| 20/114 | 32.0 | 32.7 | 32.0 | 33.8 | 26.4 | 32.0 |
| 20/115 | 29.2 | 30.9 | 29.8 | 31.3 | 24.7 | 30.4 |
| 20/116 | 37.0 | 37.0 | 36.3 | 38.4 | 28.4 | 34.5 |
| 20/117 | 33.3 | 35.6 | 32.6 | 36.9 | 27.1 | 35.4 |
| 20/118 | 31.7 | 32.0 | 32.6 | 33.8 | 25.3 | 31.8 |
| 20/119 | 31.3 | 31.4 | 31.2 | 31.5 | 24.9 | 31.8 |
| 20/120 | 29.8 | 31.6 | 31.9 | 31.8 | 23.3 | 29.9 |
| 20/121 | 36.8 | 34.0 | 35.4 | 38.5 | 33.1 | 36.7 |
| 20/122 | 33.0 | 33.7 | 32.3 | 35.8 | 26.1 | 32.0 |
| 20/123 | 33.1 | 33.8 | 34.6 | 36.7 | 27.1 | 33.7 |
| 20/124 | 34.3 | 34.7 | 35.8 | 36.3 | 27.6 | 33.2 |
| 20/125 | 33.3 | 34.2 | 33.3 | 34.0 | 24.5 | 30.5 |
| 20/126 | 32.2 | 33.2 | 32.4 | 33.5 | 24.4 | 30.5 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 20/127 | 36.7 | 39.5 | 36.6 | 35.2 | 30.0 | 36.1 |
| 20/128 | 29.2 | 31.0 | 31.8 | 30.5 | 24.1 | 30.7 |
| 20/129 | 32.0 | 34.6 | 33.0 | 36.0 | 26.6 | 33.3 |
| 20/130 | 32.6 | 33.6 | 31.8 | 34.4 | 25.0 | 31.0 |
| 20/131 | 35.4 | 34.6 | 35.5 | 36.6 | 27.9 | 34.9 |
| 20/132 | 33.1 | 35.0 | 34.5 | 38.0 | 29.3 | 34.3 |
| 20/133 | 32.6 | 32.8 | 32.4 | 33.5 | 25.3 | 31.4 |
| 20/134 | 36.6 | 38.3 | 35.8 | 38.4 | 30.2 | 34.5 |
| 20/135 | 33.6 | 35.9 | 34.5 | 36.3 | 29.4 | 34.4 |
| 20/136 | 35.4 | 37.1 | 36.1 | 37.5 | 28.5 | 36.3 |
| 20/137 | 37.6 | 37.2 | 35.0 | 33.5 | 33.2 | 36.5 |
| 20/138 | 31.2 | 33.6 | 31.5 | 34.4 | 27.4 | 32.0 |
| 20/139 | 37.8 | 38.2 | 37.8 | 35.9 | 31.1 | 35.9 |
| 20/140 | 36.9 | 35.4 | 35.5 | 35.4 | 29.9 | 35.1 |
| 20/141 | 32.1 | 33.6 | 33.3 | 34.5 | 25.9 | 31.8 |
| 20/142 | 33.5 | 34.3 | 33.1 | 35.6 | 26.8 | 33.4 |
| 20/143 | 33.6 | 35.2 | 33.5 | 35.2 | 26.8 | 32.6 |
| 20/144 | 35.0 | 35.8 | 34.5 | 36.6 | 26.0 | 32.4 |
| 20/145 | 31.8 | 32.0 | 32.9 | 32.9 | 23.9 | 30.3 |
| 20/146 | 32.8 | 33.1 | 32.2 | 34.5 | 27.5 | 33.5 |
| 20/147 | 38.4 | 37.4 | 37.1 | 38.5 | 28.5 | 34.5 |
| 20/148 | 32.0 | 32.7 | 32.0 | 32.8 | 25.5 | 32.3 |
| 20/149 | 33.4 | 34.6 | 34.1 | 36.6 | 27.8 | 33.2 |
| 20/150 | 35.8 | 33.5 | 38.0 | 35.9 | 33.5 | 35.3 |
| 20/151 | 31.0 | 32.2 | 33.0 | 33.3 | 25.9 | 31.2 |
| 20/152 | 28.8 | 31.2 | 29.8 | 30.0 | 23.8 | 30.1 |
| 20/153 | 31.4 | 32.8 | 32.0 | 33.5 | 25.0 | 32.3 |
| 20/154 | 29.8 | 31.3 | 31.3 | 32.2 | 24.8 | 31.0 |
| 20/155 | 29.5 | 30.9 | 30.3 | 29.9 | 24.0 | 30.1 |
| 20/156 | 33.8 | 34.0 | 34.4 | 33.8 | 26.6 | 31.5 |
| 20/157 | 35.2 | 34.6 | 34.8 | 33.2 | 27.8 | 32.4 |
| 20/158 | 32.9 | 33.3 | 33.3 | 34.1 | 25.8 | 30.8 |
| 20/159 | 35.2 | 35.4 | 35.9 | 36.5 | 27.3 | 34.2 |
| 20/160 | 35.2 | 35.5 | 37.1 | 37.1 | 28.4 | 32.4 |
| 20/161 | 33.6 | 34.0 | 33.5 | 35.5 | 28.0 | 34.2 |
| 20/162 | 37.0 | 36.9 | 36.3 | 35.9 | 30.8 | 35.0 |
| 20/163 | 34.8 | 34.8 | 34.8 | 34.2 | 27.4 | 32.5 |
| 20/164 | 34.1 | 34.6 | 34.2 | 36.2 | 26.7 | 32.4 |
| 20/165 | 29.7 | 31.7 | 30.9 | 31.0 | 25.7 | 32.9 |
| 20/166 | 34.1 | 36.3 | 33.5 | 36.8 | 27.3 | 33.0 |
| 20/167 | 32.9 | 34.0 | 33.5 | 32.4 | 25.0 | 32.2 |
| 20/168 | 34.5 | 36.5 | 34.4 | 36.9 | 27.9 | 33.9 |
| 20/169 | 32.5 | 32.9 | 33.2 | 36.1 | 25.4 | 30.9 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 20/170 | 32.6 | 34.3 | 34.3 | 35.3 | 25.7 | 31.1 |
| 20/171 | 31.2 | 32.3 | 33.1 | 33.6 | 24.5 | 31.0 |
| 20/172 | 31.9 | 33.1 | 32.5 | 32.9 | 26.6 | 32.7 |
| 20/173 | 34.8 | 35.6 | 34.9 | 36.9 | 25.0 | 32.5 |
| 20/174 | 34.4 | 35.0 | 35.4 | 37.5 | 26.1 | 32.4 |
| 20/175 | 35.0 | 36.4 | 34.6 | 37.3 | 27.4 | 32.7 |
| 20/176 | 32.7 | 34.5 | 33.8 | 35.6 | 24.8 | 30.5 |
| 20/177 | 32.2 | 33.7 | 31.7 | 33.6 | 25.1 | 32.7 |
| 20/178 | 37.0 | 38.0 | 36.6 | 37.2 | 28.9 | 33.9 |
| 20/179 | 36.4 | 37.9 | 39.1 | 35.4 | 35.8 | 36.5 |
| 20/180 | 34.9 | - | 34.4 | 32.9 | 25.2 | 37.0 |
| 20/181 | 30.8 | 32.6 | 31.2 | 29.5 | 24.8 | 31.0 |
| 20/182 | 36.5 | 36.1 | 35.6 | 37.5 | 26.5 | 34.4 |
| 20/183 | 35.9 | 36.5 | 34.7 | 37.3 | 27.6 | 33.7 |
| 20/184 | 31.5 | 32.7 | 32.2 | 34.3 | 25.2 | 32.6 |
| 20/185 | 37.2 | 37.0 | 35.7 | 38.3 | 34.0 | 36.9 |
| 20/186 | 29.2 | 31.5 | 30.8 | 31.9 | 23.0 | 30.5 |
| 20/187 | 28.5 | 30.2 | 30.0 | 29.6 | 23.1 | 29.0 |
| 20/188 | 30.5 | 31.8 | 31.0 | 33.9 | 26.9 | 33.6 |
| 20/189 | 32.9 | 33.5 | 32.6 | 33.7 | 26.0 | 32.8 |
| 20/190 | 30.9 | 33.1 | 32.4 | 33.9 | 25.7 | 31.0 |
| 20/191 | 33.8 | 34.8 | 34.0 | 35.4 | 27.5 | 32.0 |
| 20/192 | 35.3 | 36.7 | 36.0 | 35.2 | 36.5 | 36.6 |
| 20/193 | 37.2 | 38.1 | 35.4 | 35.8 | 30.8 | 34.9 |
| 20/194 | 35.5 | 37.1 | 35.3 | 33.9 | 34.2 | 37.0 |
| 20/195 | 31.3 | 32.8 | 33.5 | 32.3 | 24.9 | 30.9 |
| 20/196 | 37.0 | 37.3 | 35.1 | 35.7 | 31.7 | 36.4 |
| 20/197 | 37.9 | 37.9 | 37.0 | 35.6 | 35.0 | 36.5 |
| 20/198 | 37.1 | 38.6 | 36.9 | 35.0 | 30.0 | 34.5 |
| 20/199 | 36.9 | 35.7 | 34.4 | 34.4 | 31.4 | 36.7 |
| 20/200 | 36.1 | 32.4 | 35.7 | 32.0 | 27.6 | 32.5 |

## EK 5. QRT-PCR KONTROL SONUÇLARI: ORTALAMA CP DEĞERİ

| Lab kodu | Ortalama Cp değeri | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | COL1A1 | COL5A1 | THBS2 | FN1 | B2M | HPRT |
| 20/02K | 34.2 | 35.0 | 34.4 | 29.7 | 26.2 | 33.7 |
| 20/03K | 32.0 | 33.3 | 33.3 | 29.8 | 25.1 | 31.9 |
| 20/07K | 32.6 | 35.8 | 35.3 | 29.8 | 26.2 | 32.3 |
| 20/08K | 34.7 | 35.8 | 35.4 | 29.8 | 25.9 | 33.2 |
| 20/10K | 32.2 | 34.4 | 33.9 | 31.5 | 26.7 | 32.3 |
| 20/18K | 30.2 | 32.5 | 33.4 | 29.3 | 24.1 | 30.9 |
| 20/19K | 34.8 | 35.7 | 35.9 | 32.5 | 25.8 | 33.2 |
| 20/21K | 31.7 | 33.8 | 33.4 | 32.2 | 25.1 | 32.5 |
| 20/29K | 34.8 | 36.2 | 35.8 | 32.8 | 29.3 | 35.1 |
| 20/32K | 35.7 | 34.1 | 36.7 | 39.4 | 33.8 | 36.6 |
| 20/37K | 32.4 | 33.8 | 33.9 | 31.5 | 24.5 | 32.2 |
| 20/39K | 29.8 | 33.2 | 33.3 | 29.6 | 25.0 | 31.8 |
| 20/40K | 36.6 | 35.8 | 37.1 | 35.5 | 27.4 | 36.7 |
| 20/41K | 35.0 | 37.7 | 35.4 | 35.6 | 29.0 | 34.3 |
| 20/43K | 36.8 | 36.8 | 34.6 | 34.0 | 29.8 | 34.8 |
| 20/44K | 32.0 | 33.6 | 33.9 | 29.0 | 25.1 | 31.9 |
| 20/45K | 34.1 | 34.5 | 35.0 | 32.1 | 26.1 | 32.3 |
| 20/49K | 31.5 | 33.1 | 33.3 | 29.6 | 24.5 | 31.5 |
| 20/50K | 35.0 | 36.2 | 34.8 | 31.2 | 26.7 | 33.7 |
| 20/60K | 33.9 | 35.2 | 35.1 | 32.2 | 25.5 | 32.9 |
| 20/63K | 37.3 | 38.3 | 36.0 | 36.4 | 29.5 | 35.7 |
| 20/64K | 30.2 | 31.9 | 31.5 | 27.5 | 22.9 | 30.3 |
| 20/68K | 36.2 | 36.3 | 36.6 | 36.7 | 31.0 | 35.6 |
| 20/69K | 36.6 | 35.6 | 34.8 | 30.2 | 26.8 | 33.4 |
| 20/71K | 38.0 | 37.7 | 36.5 | 35.9 | 31.0 | 36.7 |
| 20/72K | 35.0 | 36.0 | 35.4 | 33.7 | 28.4 | 35.3 |
| 20/74K | 35.4 | 35.5 | 33.9 | 31.4 | 28.5 | 33.6 |
| 20/80K | 35.3 | 36.4 | 36.4 | 36.3 | 24.8 | 36.8 |
| 20/85K | 32.2 | 34.1 | 35.0 | 29.3 | 23.6 | 31.5 |
| 20/87K | 36.6 | 36.1 | 35.4 | 31.8 | 28.3 | 34.5 |
| 20/88K | 34.5 | 36.3 | 36.3 | 34.6 | 29.7 | 36.0 |
| 20/89K | 35.4 | 36.0 | 34.7 | 32.3 | 27.8 | 34.7 |
| 20/90K | 36.2 | 36.3 | 35.0 | 33.7 | 27.8 | 34.7 |
| 20/92K | 31.7 | 33.3 | 33.0 | 30.1 | 24.2 | 31.1 |
| 20/97K | 34.4 | 36.7 | 37.1 | 35.8 | 32.1 | 36.9 |
| 20/98K | 34.8 | 35.5 | 34.9 | 33.4 | 26.9 | 33.3 |
| 20/101K | 31.9 | 33.3 | 33.9 | 29.5 | 24.7 | 30.8 |
| 20/104K | 32.8 | 34.3 | 34.3 | 31.9 | 25.1 | 32.1 |
| 20/107K | 33.8 | 34.7 | 34.7 | 32.0 | 25.4 | 32.3 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 20/108K | 32.8 | 33.8 | 33.8 | 28.7 | 26.1 | 32.1 |
| 20/109K | 35.1 | 35.4 | 34.4 | 30.7 | 27.0 | 32.0 |
| 20/115K | 33.5 | 35.6 | 35.1 | 30.0 | 24.9 | 32.3 |
| 20/118K | 34.2 | 34.5 | 36.1 | 31.5 | 25.6 | 32.7 |
| 20/119K | 37.3 | 36.6 | 37.3 | 35.6 | 28.0 | 34.3 |
| 20/123K | 36.1 | 36.8 | 34.0 | 36.5 | 29.9 | 36.4 |
| 20/124K | 35.9 | 36.0 | 35.8 | 36.4 | 30.3 | 36.3 |
| 20/125K | 33.9 | 34.6 | 35.6 | 32.5 | 25.6 | 32.5 |
| 20/126K | 30.8 | 32.7 | 32.3 | 29.0 | 24.1 | 31.1 |
| 20/128K | 34.8 | 36.3 | 36.0 | 36.8 | 29.9 | 36.8 |
| 20/129K | 35.7 | 36.5 | 34.9 | 37.5 | 31.9 | 34.6 |
| 20/130K | 36.6 | 37.6 | 35.5 | 37.5 | 34.0 | 32.1 |
| 20/133K | 35.7 | 36.0 | 34.1 | 34.8 | 27.6 | 32.8 |
| 20/138K | 29.5 | 32.4 | 32.6 | 28.2 | 24.7 | 30.9 |
| 20/144K | 33.1 | 34.1 | 33.7 | 31.0 | 24.7 | 31.6 |
| 20/148K | 34.0 | 34.7 | 34.2 | 30.7 | 25.7 | 33.3 |
| 20/152K | 32.7 | 34.5 | 33.1 | 32.8 | 26.5 | 32.9 |
| 20/153K | 33.9 | 34.7 | 35.4 | 31.9 | 25.5 | 31.6 |
| 20/154K | 30.9 | 32.3 | 32.9 | 28.6 | 23.1 | 30.1 |
| 20/158K | 36.1 | 37.3 | 35.1 | 31.0 | 27.0 | 34.5 |
| 20/159K | 37.9 | 35.9 | 34.5 | 33.4 | 27.6 | 33.6 |
| 20/163K | 34.8 | 37.0 | 36.4 | 37.1 | 31.1 | 34.9 |
| 20/167K | 33.8 | 34.5 | 34.3 | 31.6 | 24.6 | 32.7 |
| 20/171K | 36.2 | 36.0 | 34.6 | 33.2 | 26.8 | 33.2 |
| 20/174K | 34.5 | 35.1 | 27.6 | 29.5 | 26.4 | 34.1 |
| 20/177K | 33.9 | 36.3 | 34.2 | 31.1 | 27.7 | 33.9 |
| 20/181K | 31.9 | 33.8 | 34.4 | 30.2 | 24.2 | 31.1 |
| 20/184K | 34.3 | 35.2 | 35.3 | 31.0 | 24.7 | 31.6 |
| 20/187K | 31.3 | 32.6 | 31.4 | 27.5 | 24.1 | 30.3 |
| 20/191K | 34.1 | 34.6 | 34.2 | 29.7 | 26.2 | 32.0 |
| 20/195K | 31.3 | 33.2 | 32.3 | 28.4 | 24.6 | 30.3 |

## EK 6. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMADA UYGULANAN ANTİKOR BİLGİLERİ

| Adı | Marka | Katalog No | Klon | Konuk organizma |
|---|---|---|---|---|
| Anti-Fibronectin antibody (IST-9) | Abcam | ab6328 | monoklonal | fare |
| Recombinant Anti-Collagen I antibody (EPR7785) | Abcam | ab138492 | monoklonal | tavşan |
| Anti-THBS2 antibody | Sigma | SAB4301622 | poliklonal | tavşan |
| Anti-COL5A1 antibody | Sigma | HPA030769 | poliklonal | tavşan |

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı**: Sulgun Charyyeva

**Yabancı Dili:** İngilizce, Rusça

**Eğitim Durumu**

**Lisans:** Tula Devlet Üniversitesi, Yaşam Bilimler Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü (2011-2015)

**Yayınlar ve Bildiriler**

- Cumaogullari, O., Charyyeva, S., Abaci, E., Bilici, Z., Ozakinci, H., Ilk, O. & Ozdag, H. (2019, October). Seven European colorectal cancer predisposing SNPs are associated with CRC and its prognosis in Turkish population. In European Journal Of Human Genetics (Vol. 27, Pp. 1555-1556). Macmillan Building, 4 Crınan St, London N1 9xw, England: Nature Publishing Group.
- Charyyeva, S., Cumaogullari, O., Abaci, E., Ilk, O., Kuzu, A., Ozdag, H. (2019, April). Family Based GWAS for Colorectal Cancer Identifies Five Susceptibility and Twelve Prognosis Related Loci in Turkish Population. In 13. BALKAN CONGRESS OF HUMAN GENETİCS. Balkan Journal of Medical Genetics (BJMG) supplement abstract book (pp. 123). ® http://www.balkangenetics2019.org/gorseller/files/balkan2019.PDF
- Kamanin S.S., Charyyeva S., Arlyapov V.A., Bykov A.G., Reshetilov A.N. (2015). Effect of glutaraldehyde on the substrate specifity of bacteria Gluconobacter Oxydans subsp. industrius vkm b-1280. Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology. (Vol. 11, No 1, pp. 10-19) ® http://www.biorosinfo.ru/
- Charyyeva S., Kamanin S.S., Arlyapov V.A. (2015). Screen-printed electrodes modified with exfoliated graphite and glucose oxidase as the basis of the biosensor. In the 11th

International scientific-practical conference "Actual problems of modern science-2015" (June, 2015) (pp. 62-63). Przemyśl, Poland.

- Charyyeva S., Kamanin S.S., Arlyapov V.A., Alferov V.A. (2015). Development of modified printing electrodes based on glucose oxidase and expanded graphite to control glucose. In Proceedings of the 3d Annual International science and practice conference "Biotechnology: science & practice" (Sept., 2015) (pp. 111-112). Yalta, Russia.

## TEZDEN ÇIKAN BİLDİRİLER

**Charyyeva, S.**, Cumaogullari, O., Abaci, E., Ilk, O., Kuzu, A., Ozdag, H. (2019, April). Family Based GWAS for Colorectal Cancer Identifies Five Susceptibility and Twelve Prognosis Related Loci in Turkish Population. In 13. Balkan Congress Of Human Genetics. Balkan Journal of Medical Genetics (BJMG) supplement abstract book (pp. 123).

**BJMG**

**P-008 - Family Based GWAS for Colorectal Cancer Identifies Five Susceptibility and Twelve Prognosis Related Loci in Turkish Population**

**Sulgun Charyyeva[1], Ozge Cumaoğulları[2], Edibe Ece Abacı[1], Özlem İlk[3], Ayhan Kuzu[4], Hilal Özdağ[1],**

[1]Ankara University, Biotechnology Institute, [2]Eastern Mediterranean University, Faculty of Medicine, [3]Middle East Technical University, Faculty of Science, Department of Statistics, [4]Ankara University, Faculty of Medicine, Department of General Surgery,

Introduction: In Turkey colorectal cancer (CRC) incidence is in the 3rd place among other cancers. We have conducted the validation study of the first GWAS for CRC conducted in Turkish population. Material and Methods: Family based GWAS was conducted (Affymetrix 250K-Nsp1) for 51 trios. Validation of 75 candidate SNP was performed using KASP (kompetitive allele spesific PCR) on 1019 sporadic CRC cases and 948 controls. SNPs were excluded if their minor allele frequency was <5%, or if the p-value of Hardy-Weinberg equilibrium test was <10-6 or if the linkage disequilibrium measurement, r2>0,8. Multiple logistic regression was used for additive, dominant, and recessive models. Odds ratios were adjusted for gender and the first principal component based on observed data for genomic control of population stratification (inflation factor, λ=0,903). Further analysis is covered to classify the patients by their status of metastasis, cancer type, stage, grade, and tumor location. Results and Discussion: A total of 5 SNPs, rs635833, rs3007737, rs6826441, rs10067633, rs16829831, were found to be significantly associated with CRC risk ($p<0.05$). rs6826441, rs16829831, rs10067633 and rs3007737 were significantly associated with CRC stage. rs878250 and rs635833 showed association with disease grade. Meanwhile, rs1797710, rs17082506 and rs4283324 conferred risk for metastasis. In addition, rs17082506 and rs635833 were significantly associated with mucinous CRC. Whereas, rs6928177, rs16954516 and rs7516468 were associated with tumour location To the best of our knowledge, this is the first GWAS and its validation reporting predisposition to sporadic CRC in Turkish population. This study is supported by TUBITAK project no. 112S634.

**KEYWORDS:** Colorectal Cancer, GWAS, SNP

# Family Based GWAS for Colorectal Cancer Identifies Five Susceptibility and Twelve Prognosis Related Loci in Turkish Population

*Sulgun Charyyeva [1], Özge Cumaoğulları [2], Edibe Ece Abacı [1], Özlem İlk [3], Ayhan Kuzu [4], Hilal Özdağ [1]*

[1] Ankara University Biotechnology Institute, Ankara, Turkey, [2] Eastern Mediterranean University, Faculty of Medicine, Famagusta, Turkish Republic of Northern Cyprus, [3] Middle East Technical University, Ankara, Turkey, [4] Ankara University Faculty of Medicine, Department of General Surgery, Ankara, Turkey

## Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer-related death in developed countries. In Turkey CRC incidence is in the 4th place in man and 3rd place in woman among other cancers and %75 of CRC cases are sporadic. Owing to difficulty of the low allele frequency variations detection genetic association profile of CRC has not been entirely identified. **The aim** of this study is to identify candidate genomic regions associated with sporadic CRC prognosis and predisposition in Turkish population. In the first part of this study we have conducted family based GWAS (Genome wide association study) in 51 trios by Affymetrix GeneChip 250K-Nsp1 array to identify loci associated with colorectal cancer. In the current study, we validated 75 candidate SNP (Single Nucleotide Polimorphism) with kompetitive allele specific PCR (KASP) in 1019 sporadic CRC cases and 948 healthy individuals.

## Material and Method

Validation study of 75 SNPs was performed through KASP technology on 1019 sporadic CRC cases and 948 healthy controls (Figure 1). Statistical analysis was performed by score tests using snp.rhs.tests function in R 3.5.1. SNPs were excluded if the p-value of Hardy-Weinberg equilibrium test was $<10^{-6}$ or if the linkage disequilibrium measurement, $r^2$ >0,8. Multiple logistic regression was used for additive, dominant, and recessive models. Odds ratios were adjusted for gender and the first principal component based on data for genomic control of population stratification (inflation factor, λ=0,903). Further analysis is covered to classify the patients by their status of metastasis, cancer type, stage, grade, and tumor location (Figure 2).

**Figure 1. Study group information**

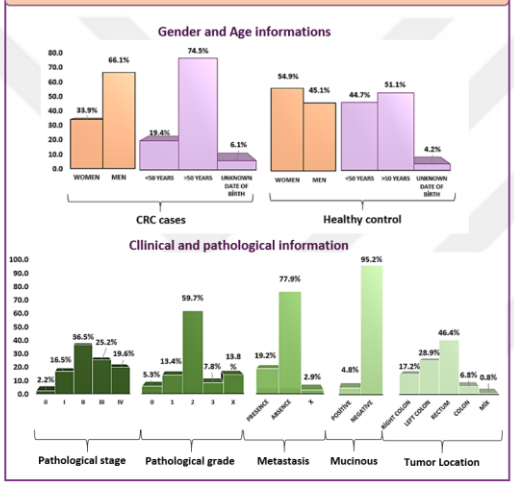
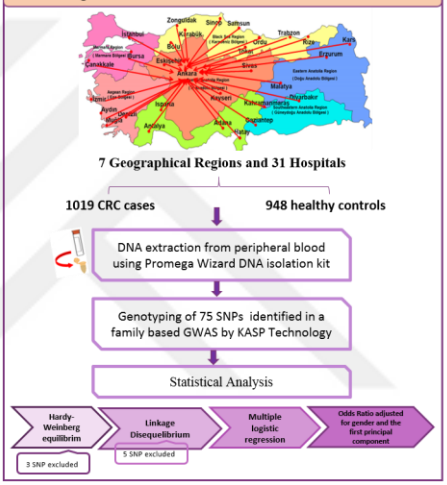



**Figure 2. The scheme of the research method**




## Results

In this study a total of 5 SNPs, namely, rs635833, rs3007737, rs6826441, rs10067633, rs16829831 were found to be significantly associated with the colorectal cancer risk ($p < 0.05$). Moreover our results showed that rs635833, rs3007737, rs6826441, rs10067633, rs16829831, rs17082506, rs11215223, rs1295782, rs878250, rs1797710, rs4283324, rs13049440, rs7516468, rs6928177, rs16954516 SNP's were also associated with prognosis of the disease (Table 1).

**Table 1. CRC Susceptibility and Prognosis Related Loci**

| Rs Number | Alleles | Chromos. Loci | Nearest Cancer Related Gene | SNP Location | Effect |
|---|---|---|---|---|---|
| rs635833 | C>T | 1p32.2 | C8A | Intronic | Susceptibility, Grade, Mucinous cancer |
| rs3007737 | A>G | 1q43 | KMO | Intronic | Susceptibility, Stage |
| rs6826441 | A>G | 4p15.2 | STIM2, TBC1D19 | Intergenic | Susceptibility, Stage |
| rs10067633 | T>C | 5q11.2 | SNX18 | Intronic | Susceptibility, Stage |
| rs16829831 | C>G | 3q25.32 | MFSD1, IQCJ | Intergenic | Susceptibility, Stage |
| rs17082506 | A>C | 9q21.2-31 | LINC01507, TLE4 | Intergenic | Grade, Mucinous Cancer, Metastasis |
| rs11215223 | A>G | 11q23.2-q23.3 | LOC105369506 | Intronic | Grade |
| rs1295782 | C>T | 14q24.1 | RAD51B | Intronic | Grade |
| rs878250 | G>A / G>C | 20p13 | RSPO4, PSMF1 | Intergenic | Grade |
| rs1797710 | A>G | 12q15 | DYRK2 | Intronic | Metastasis, Tumor location |
| rs4283324 | A>G | 18q22.1 | CDH19, CDH7, miR-5011 | Intergenic | Metastasis |
| rs13049440 | C>T | 21q22.11 | KRTAP family, CLDN8, TIAM1 | Intergenic | Metastasis |
| rs7516468 | T>A / T>C | 1q32.2 | C4BPA, CD55 | Intergenic | Tumor location |
| rs6928177 | C>T | 6p25.2 | PXDC1, FAM50B | Intergenic | Tumor location |
| rs16954516 | G>A | 13q32.1-2 | RAP2A, IPO5, FARP1 | İntergenic | Tumor location |

## Conclusion

In current study 15 out of 75 SNPs were found to be associated with sporadic colorectal cancer risk and/or disease prognosis, respectively. To the best of our knowledge, this is the first GWAS and its validation reporting CRC predisposition and prognosis related variations in Turkish population.

## References

1. Organization, W. H. (2014). Cancer country profiles - Turkey.
2. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, *68*(1), 7-34. doi:10.3322/caac.21551
3. Genetics of Colorectal Cancer (PDQ(R)): Health Professional Version. (2002). In *PDQ Cancer Information Summaries*. Bethesda (MD).
4. Kang, B. W., Jeon, H. J., Chae, Y. S., Lee, S. J., Park, I. Y., Choi, J. E., Kim, J. G. (2010). Association between ERAS/Identified Genetic Variations and Disease Prognosis for Patients with Colorectal Cancer. *PLoS One*, *10*(3), doi:ARTN e0119649 10.1371/journal.pone.0119649
5. Mates, I. N., Jinga, V., Ciolci, I. E., Mates, D., Dinu, D., Constantin, A., & Jinga, M. (2012). Single nucleotide polymorphisms in colorectal cancer: associations with tumor site and TNM stage. *J Gastrointestin Liver Dis*, *21*(1), 49-52.
6. Bi, D., Rajabli F., Dunaif DC, Dudag N, Hi NG. A novel approach for small sample size family-based association studies: sequential tests. *Eur J Hum Genet*. 2011 Aug;19(8):865-69. doi: 10.1038/ejhg.2011.53. Epub 2011 Mar 23. PubMed PMID: 21427757; PubMed Central PMCID: PMC3172932.
7. He, C., Holme, J., & Anthony, J. (2014). SNP genotyping: the KASP assay. *Methods Mol Biol*, *1145*, 75-86. doi:10.1007/978-1-4939-0446-4_7

This study is supported by TUBITAK project no. 1125634.

Cumaogullari, O., **Charyyeva, S**., Abaci, E., Bilici, Z., Ozakinci, H., Ilk, O. & Ozdag, H. (2019, October). Seven European colorectal cancer predisposing SNPs are associated with CRC and its prognosis in Turkish population. In European Journal Of Human Genetics (Vol. 27, Pp. 1555-1556). Macmillan Building, 4 Crinan St, London N1 9xw, England: Nature Publishing Group

**P12.044A**

**Seven European colorectal cancer predisposing SNPs are associated with CRC and its prognosis in Turkish population**

***O. Cumaogullari[1,2], S. Charyyeva[2], E. Abaci[2], Z. Bilici[2,3], H. Ozakinci[4], O. Ilk[5], A. Kuzu[6], H. Ozdag[2]***

*[1]Faculty of Medicine, Eastern Mediterranean University, Famagusta, Cyprus, [2]Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey, [3]Department of Molecular Biology and Genetics, GYTE, Gebze Technical University, Kocaeli, Turkey, [4]Department of Medical Pathology, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey, Ankara, Turkey, [5]Department of Statistics, Faculty of Science, Middle East Technical University, Ankara, Turkey, Ankara, Turkey, [6]Department of General Surgery, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey, Ankara, Turkey*

**Introduction:** Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer-related death in developed countries. Owing to difficulty of the low allele frequency variations detection genetic association profile of CRC has not been entirely identified. To show that significance of these variations may change according to population we selected 16 SNPs from GWASs (Genome-wide Association Study) conducted in European CRC population to analyze them in Turkish population.

**Material and Methods:** Validation of 16 European SNP was performed using kompetitive allele spesific PCR on 1019 sporadic CRC cases and 948 controls. SNPs were excluded if their minor allele frequency was <5%, if the p-value of Hardy-Weinberg equilibrium test was $<10^{-6}$, or if the linkage disequilibrium $r^2>0.8$. Multiple logistic regression was used for additive, dominant, and recessive models. Odds ratios were adjusted for gender and the first principal component for population stratification (genomic control inflation factor $\lambda=0.903$). Further analysis is covered to classify the patients by their status of metastasis, cancer type, stage, grade, and tumor location.

**Results and Conclusions:** rs6983267, rs10795668, rs3802842, rs4444235 and rs4939827 were found to be associated with Turkish CRC patients ($p<0.05$). Our results showed that these 5 SNPs were also associated with pathological stage of the disease. Whereas, rs6691170, rs1321311, rs3802842, showed significant association with pathological grade. In addition, rs1321311 increases the risk of mucinous cancer 3,2 times. Our results showed the importance of population specific studies to validate the results of GWASs. This study is supported by TUBITAK grant 112S634, Ankara University 14L0415003

**O. Cumaogullari:** None. **S. Charyyeva:** None. **E. Abaci:** None. **Z. Bilici:** None. **H. Ozakinci:** None. **O. Ilk:** None. **A. Kuzu:** None. **H. Ozdag:** None.