

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**KÖK HÜCRE İLİŞKİLİ FAKTÖRLERİN
İNSAN KOLON KANSERİ OLUŞUMUNDAKİ ROLLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. İbrahim ŞAHİN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdulgani TATAR

ERZURUM – 2017

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

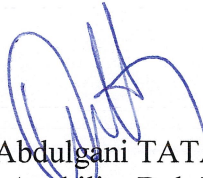
İLGİ: 23.02.2017 tarih ve 42190979-302.14.05-E.1700059667 sayılı yazınız.

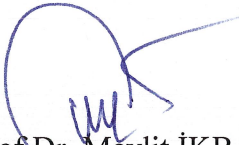
TIPTA UZMANLIK TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

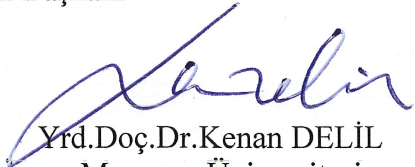
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tıpta uzmanlık öğrencisi Arş.Gör.Dr. İbrahim ŞAHİN'in "Kök Hücre İlişkili Faktörlerin İnsan Kolon Kanseri Oluşumundaki Rollerinin Araştırılması" konulu tezini incelemek üzere oluşturulan tez jürisine üye olarak seçildiğimiz ilgi yazınızla bildirilmesi üzerine jüri üyeleri, 01.03.2017 tarihinde toplanmış ve ilgili öğrenci tez savunmasına alınmıştır.

Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. maddesi gereğince yapılan tez savunmasının tamamlanması sonucunda adı geçen tezi jüri üyelerince oy birliği ile kabul edilmiştir.

Bilgilerinize arz ederiz.


Prof.Dr. Abdulgani TATAR
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı


Prof.Dr. Mevlit İKBAL
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi


Yrd.Doç.Dr.Kenan DELİL
Marmara Üniversitesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik anabilim dalında ihtisas sürem boyunca bilgi ve desteklerini esirgemeyen tez hocam ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdulgani TATAR'a,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, Erzurum'da bulunduğum süre boyunca hem kardeşim hem arkadaşım olan tıbbi genetik camiasının gururu Araş. Gör. Dr. Haktan Bağış ERDEM'e,

Anabilim dalımızda görev yapan tüm arkadaşlarıma ve İsmail Hakkı TAŞ'a,

Desteklerini her daim hissettiğim, evlatları için hayatlarını ortaya koyan annem Latife ŞAHİN ve babam Bekir ŞAHİN başta olmak üzere kardeşim İsmail ŞAHİN ve biricik yeğenim Ömer ŞAHİN'e,

Ve son olarak vatanımızda huzur ve güven içerisinde yaşamamız ve çalışmamız için gece gündüz demeden canını ortaya koyarak mücadele eden kahraman güvenlik güçlerimize sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Dr. İbrahim ŞAHİN

	İÇİNDEKİLER	SAYFA NO
	TEŞEKKÜR	ii
	TABLolar DİZİNİ	vi
	ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
	KISALTMALAR DİZİNİ	viii
	ÖZET	ix
	ABSTRACT	xi
1.	GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.	GENEL BİLGİLER	2
2.1	Kolon kanseri	2
2.1.1.	Epidemiyoloji	2
2.1.2.	Etyoloji	2
2.1.2.1.	Risk faktörleri	3
2.1.3.	Evreleme	5
2.1.4.	Tipler	6
2.1.4.1.	Sporadik KK	6
2.1.4.2.	Hereditör Nonpolipozisli Kolorektal Kanser	7
2.1.4.3.	Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP)	8
2.1.4.4.	MYH-İlişkili Polipozis (MAP)	9
2.1.4.5.	Peutz-Jeghers Sendromu (PJS)	9
2.1.4.6.	Juvenil Polipozis Sendromu (JPS)	9
2.1.5.	KK'da Tanı ve Tarama	10
2.1.5.1.	KK'de Biyoişaretleyicilerin Kullanımı	11
2.1.5.2.	Gen İfadesi Profilleme (GEP)	12
2.1.5.3.	Dışkıda gizli Kan Testi (FOBT)	12
2.1.5.4.	Endoskopik işlemler	13
2.1.5.4.1.	Esnek sigmoidoskopi	13
2.1.5.4.2.	Kolonoskopi	13
2.1.5.5.	KK taraması için görüntüleme yöntemleri	14
2.1.5.5.1.	Baryum Enema	14
2.1.5.5.2.	Bilgisayarlı Tomografi (BT veya CT) kolonografi (Sanal Kolonoskopi)	15

2.1.5.6.	Dışkı DNA ve RNA taraması	15
2.1.5.7.	KK tespiti için serum (kan) testi	16
2.2.	Kolon kanseri oluşumu	17
2.2.1.	Karsinogenezin Klasik Modeli: Çok vuruşlu Hipotez	17
2.2.2.	Genomik Aberasyonların KK Sonuçlarına Etkisi	20
2.2.3.	KK'da ncRNA'nın Rolü	22
2.2.4.	Kolon Kanserinde Modern Yönler	24
2.2.4.1.	Kromozom instabilitesi (CIN)	26
2.2.4.2.	Mikrosatellitlerin Kararsızlıkları (MSI)	28
2.2.4.3.	CpG Adası Metilatör Fenotipi (CIMP)	29
2.3.	KK oluşumu ve kanser kök hücreleri (KKH) ile ilişkili yollar	30
2.3.1.	Wnt- β -Katenin Yolu	31
2.3.2.	Tirozin Kinaz Reseptörleri Yolu	33
2.3.3.	TGF- β Yolu	34
2.3.4.	Apoptotik Yollar	35
2.3.5.	Hedgehog Yolu	35
2.3.6.	Notch Yolu	36
2.4.	Kolon polipleri	36
2.4.1.	Hiperplastik polip	37
2.4.2.	Hamartomatöz polip	38
2.4.3.	İnflamatuvar polip	38
2.4.4.	Neoplastik polip	39
2.4.5.	Adenomlar	39
2.4.5.1.	Adenomdan karsinoma dönüşüm	41
2.5.	Kök hücreler	43
2.5.1.	Kanser kök hücreleri (KKH) veya tümör başlatıcı hücreler (TIC)	43
2.6.	Kök Hücre İlişkili Faktörler (KİF)	45
2.6.1.	OKSMN (Oct4, Klf4, Sox2, Myc ve Nanog)	45
2.6.2.	OCT4 (Pou5f1)	45
2.6.3.	SOX2	46
2.6.4.	KLF4	47
2.6.5.	Myc	48
2.6.6.	NANOG	51

2.6.7.	CD133 (PROM1 veya PROMININ-1)	52
2.6.8.	LGR5 (GPR49)	53
2.6.9.	Rex1 (Zfp42 veya Rexo1)	54
2.7.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	55
2.7.1.	Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) Tekniğinin Prensipleri	55
2.7.2.	Erime Eğrisi Analizi (Melting)	56
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	58
3.1	Materyal seçimi	58
3.2.	RNA İzolasyonu	58
3.2.1.	RNA miktar ve kalitesinin ölçülmesi	62
3.3.	cDNA Sentezi ve Preamplifikasyon	64
3.3.1.	cDNA Sentezi	64
3.3.2.	cDNA Hedef Örneklerinin Preamplifikasyonu	66
3.4.	Gerçek Zamanlı PCR	68
3.4.1.	Erime Analizi (Melting)	70
3.4.2.	Veri Analizi	71
4.	BULGULAR	72
4.1.	OCT4	74
4.2.	KLF4	75
4.3.	SOX2	76
4.4.	MYC	77
4.5.	NANOG	78
4.6.	REX1	79
4.7.	CD133	80
4.8.	LGR5	81
5.	TARTIŞMA	84
6.	SONUÇLAR	92
	KAYNAKLAR	94

TABLolar DİZİNİ		SAYFA NO
Tablo 1	Doku tiplerinin özellikleri	59
Tablo 2	12-23 nolu örneklerimizi içeren QIAxpert Rapor örneği	63
Tablo 3	Genomik DNA eliminasyon miksi	65
Tablo 4	Ters transkripsiyon karışımı	65
Tablo 5	Preamplifikasyon karışımı hazırlama	67
Tablo 6	cDNA'nın preamplifikasyonu için PCR koşulları	67
Tablo 7	RT2 qPCR Primer Assay karışımı hazırlama rehberi	68
Tablo 8	Bir reaksiyon için PCR bileşen karışımı	69
Tablo 9	Döngü koşulları	69
Tablo 10	Kontrol grubuna göre diğer grupların gen ekspresyon kat değişimlerinin karşılaştırılması	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA NO

Şekil 1	Amplifikasyon ve erime analizi sırasında gerçek zamanlı izleme	57
Şekil 2	İnkübasyon için kullanılan T-shaker ve Dry Bath (EuroClone, İtalya)	60
Şekil 3	QIAcube (Qiagen, Germany)	61
Şekil 4	QIAxpert (Qiagen, Germany)	62
Şekil 5	QIAxpert raporunda 19. örneğin grafik olarak gösterimi	64
Şekil 6	Labcycler (SensoQuest, Germany), XP cycler (Bioer, China) ve Rotor-Gen Q (Qiagen, Germany)	66
Şekil 7	20, 21, 23, 25, 26, 27, 28, 29 nolu örneklerimize ait CT değerleri görülmektedir.	70
Şekil 8	Seçilen genlerin erime sıcaklıkları	71
Şekil 9	Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların POU5F1 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi	74
Şekil 10	Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların KLF4 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi	75
Şekil 11	Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların SOX2 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi	76
Şekil 12	Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların MYC geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi	77
Şekil 13	Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların NANOG geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi	78
Şekil 14	Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların REX1 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi	79
Şekil 15	Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların PROM1 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi	80
Şekil 16	Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların LGR5 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi	81
Şekil 17	Multigrup plot grafiği üzerinde ortalama delta CT değerlerine göre grupların gen ekspresyonlarının çizgisel şekilde gösterimi	82
Şekil 18	Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların gen ekspresyonlarının çizgisel şekilde gösterimi	83

KISALTMALAR DİZİNİ

APC	Ailesel Adenomatöz Polipozis
BMP	Kemik Morfogenik Proteinler
CIN	Kromozomal instabilite
CIMP	CpG adası metilator fenotipi
CRC	Kolorektal kanser
ESC	Embriyonik kök hücreler
FAP	Ailevi Adenomatöz Polipozis
FFPE	Formalinle sabitlenmiş parafine gömülü
FOBT	Dışkıda gizli Kan Testi
HGD	Yüksek dereceli displazi
Hh	Hedgehog
HNPCC	Kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanseri
iPSC	İndüklenmiş pluripotent kök hücreler
JPS	Juvenil Polipozis Sendromu
KİF	Kök hücre ilişkili faktörler
KH	Kök hücreler
KK	Kolon kanseri
KKH	Kanser Kök hücreleri
LGD	Düşük dereceli displazi
MMR	Hatalı uyuşmazlık onarımı
MSI	Mikrosatellit instabilitesi
ncRNA	Kodlamayan RNA'lar
NP	Neoplastik polipler
OKSMN	(Oct4, Klf4, Sox2, Myc ve Nanog) farklı şekillerde kullanılmıştır: OKS, OSMN
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PJS	Peutz-Jeghers Syndrome
TGF-β	Transforming büyüme faktörü- β
TIC	Tümör başlatıcı hücreler

ÖZET

Kolon kanseri (KK), dünyada kanser ölümlerinin en sık üçüncü sebebinin oluşturmaktadır. Çoğunlukla kolon poliplerinden köken alan KK, etiyolojisi en çok aydınlatılmış kanserlerden biri olmasına rağmen; KK'ın yılda yaklaşık bir milyon yeni vakaya ve beş yüz bin üzerinde ölüme sebep olması bu konunun daha iyi aydınlatılması gerektiğini gözler önüne sermektedir. Dolayısıyla bu süreçte tanı, tedavi ve prognoza yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kolon kanserlerinin çoğu neoplastik (adenomatöz) poliplerden (NP) kaynaklanır. NP histopatolojik olarak tübüler, villöz ve tübülovillöz olmak üzere üçe ayrılır. Polipin invazif karsinoma dönüşmesi histopatolojik tipi ve boyutu ile ilişkilidir. Bütün adenomlar belli derecelerde, anormal bez yapısı ve hücre içi yapısal hasarla kendini gösteren, displazi sergilerler. Displazinin derecesi de adenomun kansere dönüşümünü belirler. Yüksek dereceli displazilerin (HGD) kansere dönüşme riski düşük dereceli displazilere (LGD) göre daha fazladır. Adenomdan karsinoma dönüş sadece belirli genlerdeki mutasyonlarla açıklanamadığından, epigenetik değişikliklerle birlikte düşünmek gerekmektedir.

Kanser oluşumundaki en önemli faktörlerden biri de tümör başlatan hücreler ya da kanser kök hücreleridir (KKH). KKH birçok kanserde tümörün başlangıcından, farklılaşmadan, invazyondan, metastazdan, tekrar ortaya çıkmasından, tedavi direncinden, sorumlu tutulan; kendi kendini yenileyebilme özelliği taşıyan hücrelerdir. Kanser dokusunda çok küçük miktarda olmalarına rağmen kanser tedavisindeki başarısızlığın en önemli sebeplerinden biri olarak görülmektedirler. Çalışmada her biri parafinize, normal kolon dokusu, hiperplastik polipler, histopatolojik (HGD ve LGD) olarak evrenmiş tübüler, tübülovillöz ve villöz polipler ve kolon kanseri doku örnekleri kullanılmıştır. Belirlenen dokulardan ekspresyonları ölçülmek üzere; hem embriyonik kök hücreleriyle, indüklenmiş pluripotent kök hücreleriyle ve hem de KKH ile ilişkili olan transkripsiyon faktör genleri (OCT4, KLF4, SOX2, MYC, NANOG ve REX1) ve hücre yüzey belirteçleri (CD133, LGR5) seçilmiştir.

Projenin amacı, kolon kanserinin oluşum mekanizmalarının aydınlatılabilmesi ve kolon kanserinin tanı ve tedavisinde kök hücre ilişkili faktörlerin (KİF) etkin kullanımına katkı sağlamak için; histopatolojik olarak evrenmiş normal kolon dokusu, kolon polipleri ve kanserinde KİF ekspresyonlarını karşılaştırmak ve kolon kanseri oluşumunda KİF'in rollerini açıklamaktır.

Parafinize dokulardan total RNA izolasyonları yapıldıktan sonra, KİF ekspresyonları RT-qPCR yöntemiyle ölçüldü. Normal kolon-polip-kanser dönüşümünde KİF ekspresyon farklılıkları belirlendi.

Kolon kanserinde yapılan KİF ekspresyon çalışmaları yetersiz, birbirleriyle tutarsız ve genellikle KK ve normal dokuları kapsamaktadır. Bu çalışmada özellikle histopatolojik olarak derecelendirilmiş (HGD-LGD) normal kolon-polip-kanser dokularında KİF ekspresyon seviyeleri belirlenerek kanser oluşumundaki etkili faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. KK oluşumundaki KİF ekspresyon farklılıklarının belirlenmesinin KK tanı, tedavi ve prognozuna katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışma kanser KİF ekspresyon artışının HGD ve villöz özelliklerle birlikte ortaya çıktığını göstermektedir. Villöz ve özellikle HGD sergileyen poliplerin neden kansere dönüşme yatkınlıklarının fazla olduğunu desteklemektedir. LGR5, PROM1 ve MYC'in HGD ve kanserli dokulardaki artmış ekspresyon seviyeleri kötü prognozu desteklemektedir ve bunların tanı ve prognozu değerlendirmek için kullanılabileceğini göstermektedir. LGR5 ve PROM1 ekspresyonları tümör başlatacak hücrelerin varlığını, kök hücre ilişkili faktörlerin birlikte artmış ekspresyonları ise kanser kök hücrelerinin varlığını ve kötü prognozu göstermektedir. Dokuya özgü KİF ekspresyonlarının tanımlanması, kolonik neoplazinin gelişimini ve ilerlemesini kontrol etmek için gen terapileri tasarlamaya yardımcı olacaktır.

Anahtar sözcükler: kolon kanseri, tübüler, tübülovillöz, villöz, hiperplastik, OCT4, KLF4, SOX2, MYC, NANOG, REX1, CD133, LGR5

ABSTRACT

Colon cancer (CC), is the third most common cause of cancer death in the world. Colon cancer mostly originates from colon polyps. Even though its etiology is one of the most known among cancers; causing about one million new cases and over five hundred thousand deaths per year reveals the need to clarify this issue better. Therefore, new studies are needed for diagnosis, treatment and prognosis in this process.

Most of colon cancers caused by adenomatous or neoplastic polyps (NP). NP histologically divided as tubular, villous and tubulovillous. Turning into invasive carcinoma for polyp is associated with its histologic type and size. All adenomas have abnormal gland structure with varying degrees and dysplasia, which is manifested with intracellular structural damage. The degree of dysplasia determines the transformation of adenoma to cancer; high-grade dysplasia (HGD) has higher risk of turning into cancer when compared with low-grade dysplasia (LGD). Adenoma–carcinoma sequence can not be explained only by mutations in certain genes, so epigenetic changes must be considered.

One of the most important factors in the formation of cancer are tumor-initiating cells or cancer stem cells (CSC). CSC, which have self-renewing ability, are responsible from the onset of tumors, differentiation, invasion, metastasis, relapse and resistance to treatment in many cancers. Despite being in a very small amount of cancer tissue, they are seen as one of the most important cause of cancer treatment failure. In this study transcription factor genes (OCT4, KLF4, SOX2, MYC, NANOG and REX1) and cell surface markers (CD133, LGR5), which are associated with embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells and cancer stem cells, have been selected for measuring expression levels from the selected tissues.

The aim of this project is to identify the differences in expression levels of stem cell related factors (SCRF) in normal colon tissue, histopathologically staged colon polyps and colon cancer, and to explain the roles of SCRFs in the formation of CC for elucidating the formation of CC and for contributing the effectively usage of SCRFs in the diagnosis and treatment of CC.

After isolation of total RNA from FFPE tissues, SCRF expressions was measured by RT-qPCR method. SCRF expression differences was determined in normal colon-polyp-cancer transformation.

SCRF expression studies in colon cancer are inadequate, inconsistent and often include CC and normal tissues. In this study it is our aim to determine the important factors in the formation of cancer with measuring SCRF expressions in histopathologically graded (HGD-LGD) normal colon-polyp-cancer tissues. We think determining the SCRF expression differences in the formation of colon cancer, may contribute to the diagnosis, treatment and prognosis of CC.

This study shows that the increase of cancer SCRF expression occurs together with HGD and villous features. Villous and especially HGD-displaying polyps support why cancer susceptibility is high. Increased expression levels of LGR5, PROM1, and MYC in HGD and cancerous tissues support poor prognosis and demonstrate that they can be used to assess diagnosis and prognosis. LGR5 and PROM1 expresses the presence of tumor-initiating cells and coexpression of stem cell-associated factors indicate the presence of cancer stem cells and poor prognosis. Identification of tissue-specific SCRF expressions will help design gene therapies to control the development and progression of colonic neoplasia.

Key words: colon cancer, tubular, tubulovillous, villous, hyperplastic, OCT4, KLF4, SOX2, MYC, NANOG, REX1, CD133, LGR5

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolon kanseri (KK), dünyada kanser ölümlerinin en sık üçüncü sebebinin oluşturmaktadır. Çoğunlukla kolon poliplerinden köken alan KK, etiyolojisi en çok aydınlatılmış kanserlerden biri olmasına rağmen; KK'ın yılda yaklaşık bir milyon yeni vakaya ve beş yüz bin üzerinde ölüme sebep olması bu konunun daha iyi aydınlatılması gerektiğini gözler önüne sermektedir. Dolayısıyla bu süreçte tanı, tedavi ve prognoza yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kanser oluşumundaki en önemli faktörlerden biri de tümör başlatan hücreler ya da kanser kök hücreleridir (KKH). KKH birçok kanserde tümörün başlangıcından, farklılaşmadan, invazyondan, metastazdan, tekrar ortaya çıkmasından, tedavi direncinden, sorumlu tutulan; kendi kendini yenileyebilme özelliği taşıyan hücrelerdir. Kanser dokusunda çok küçük miktarda olmalarına rağmen kanser tedavisindeki başarısızlığın en önemli sebeplerinden biri olarak görülmektedirler. Çalışmamızda her biri parafinize, normal kolon dokusu, hiperplastik polipler, histopatolojik (HGD ve LGD) olarak evrenilmiş tübüler, tübülovillöz ve villöz polipler ve kolon kanseri doku örnekleri kullanılmıştır. Belirlenen dokulardan ekspresyonları ölçülmek üzere; hem embriyonik kök hücreleriyle, indüklenmiş pluripotent kök hücreleriyle ve hem de KKH ile ilişkili olan transkripsiyon faktör genleri (OCT4, KLF4, SOX2, MYC, NANOG ve REX1) ve hücre yüzey belirteçleri (CD133, LGR5) seçilmiştir.

Projenin amacı, kolon kanserinin oluşum mekanizmalarının aydınlatılabilmesi ve kolon kanserinin tanı ve tedavisinde kök hücre ilişkili faktörlerin (KİF) etkin kullanımına katkı sağlamak için; histopatolojik olarak evrenilmiş normal kolon dokusu, kolon polipleri ve kanserinde KİF ekspresyonlarını karşılaştırmak ve kolon kanseri oluşumunda KİF'in rollerini açıklamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Kanseri (KK)

2.1.1. Epidemiyoloji

Kolon kanseri (KK), dünya çapında en yaygın kanserlerden biridir ve her yıl bir ila iki milyon yeni olgu tanısı konur ve bu KK'yı üçüncü en yaygın kanser haline getirir. Yılda 700.000 ölümle (sadece akciğer, karaciğer ve mide kanseri tarafından aşılmıştır) kansere bağlı ölümün dördüncü en yaygın nedenini oluşturur. Cinsiyete göre KK, kadınlarda en sık ikinci (%9.2), erkeklerde (%10) üçüncü sırada görülmektedir (1). 1990 yılından 2012 yılına kadar her yıl 200.000'den fazla yeni vakayla KK görülme sıklığı arttı. Çoğu KK vakası Batılı ülkelerde (%55) tespit edilmekle birlikte, bu eğilim son yıllarda bazı ülkelerin hızla gelişmesi nedeniyle değişmektedir (2). Sağlık sistemlerinde yapılan iyileştirmeler ve tarama programlarının uygulanması nedeniyle dünyadaki CRC ile ilişkili ölümlerin yalnızca %33'ü, 2010'da Batılı ülkelerde görülmektedir.

Çoğunlukla kolon poliplerinden köken alan KK etiyolojisi en çok aydınlatılmış kanserlerden biri olmasına rağmen; KK'ın yılda yaklaşık bir milyon yeni vaka ve beş yüz bin üzerinde ölüme sebep olması bu konunun daha iyi aydınlatılması gerektiğini gözler önüne sermektedir (3). En sık erkeklerde daha sonra da bayanlarda tespit edilen KK yılda 1.2 milyon yeni vakaya ve yaklaşık 608.700 ölüme sebep olur. Sıklığı bölgelere göre değişim göstermektedir. En sık Avusturalya, Yeni Zellanda, Avrupa ve Kuzey Amerika'da; en az Afrika ve Güney Asya'da görülmektedir (4). Amerika'da yıllık 132.700 yeni vakaya KK tanısı konmaktadır (4).

2.1.2. Etyoloji

Spesifik genlerdeki mutasyonlar, diğer kanser tiplerinde olduğu gibi kolorektal kanserin başlamasına neden olabilir. Bu mutasyonlar, onkogenlerde, tümör süpresör genlerinde ve DNA onarım mekanizmalarıyla ilgili genlerde görülebilir (5). Mutasyonun

kökenine bağlı olarak, kolorektal karsinomlar sporadik, kalıtsal ve ailevi olarak sınıflandırılabilir. Yaşam boyunca ortaya çıkan nokta mutasyonlar, kalıtım yoluyla alınan sendromlarla ilişkili değildir ve sadece bazı hücreleri ve bunların soylarını etkiler. Nokta mutasyonlardan türeyen kanserler, sporadik kanserler olarak adlandırılır ve tüm kolorektal kanserlerin % 70'inden sorumludur. Mutasyonlar farklı genleri hedef alabildiğinden, sporadik kanserin moleküler patogenezi heterojendir (5). Bununla birlikte, KK vakalarının yaklaşık %70'i belirli bir ardışık mutasyonu izlemektedir ve bu daha sonra belirli bir morfolojik sıraya tercüme edilmekte ve bir adenoma oluşumu ve karsinom durumuna kadar uzanmaktadır. Birinci mutasyon, polipler olarak da adlandırılan malign olmayan adenomların oluşumunu tetikleyen bir tümör baskılayıcı gen olan adenomatöz polipozis koli (APC)'de oluşur. Bu adenomların yaklaşık %15'inin on yıllık bir süre içerisinde karsinoma dönüşmesi beklenmektedir. Bu APC mutasyonunu, KRAS, TP53 ve son olarak DCC'deki mutasyonlar takip eder. Kalıtsal kanserler tüm KK vakalarının sadece %5'ini oluşturur. Bu kanserler, mutasyona uğramış genin allellerinden birini etkileyen kalıtsal mutasyonlardan kaynaklanır; yani diğer allelde bir nokta mutasyonu, tümör hücresinin ve daha sonra karsinomun ortaya çıkmasını tetikleyecektir. Kalıtsal kanserlerin daha doğru bir sınıflandırılmasını sağlamak için iki grup, yani polipozis ve polipozis olmayan formlar oluşturulmuştur. Polipozis varyantı, çoğunlukla ailesel adenomatöz polipozis (FAP) içerir ve bu da kolondaki çok potansiyel malign poliplerin oluşumu ile karakterizedir (6). Buna karşılık, kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanseri (HNPCC) DNA onarım mekanizmalarındaki mutasyonlarla ilişkilidir. HNPCC'nin temel nedeni, MSH2, MLH1, MLH6, PMS1 ve PMS2 gibi DNA onarım proteinlerini kodlayan allellerden birinde kalıtsal mutasyonların neden olduğu Lynch sendromudur. Lynch sendromu tüm kolorektal kanser vakalarının %2-3'ünde bulunabilir ve bu nedenle HNPCC grubunda en sık görülen sendromdur (7). Aileler arası KK tüm olguların yaklaşık %25'ini oluşturur ve kalıtsal kanser varyantına dâhil edilemeyeceklerinden kalıtsal kanserler olarak sınıflandırılmamasına rağmen kalıtsal mutasyonlardan da kaynaklanır (8).

2.1.2.1. Risk Faktörleri

Dünya çapında, kolon kanserine maruz kalma ihtimali yaklaşık %4-5'tir. Ayrıca, birçok kişisel özellik veya alışkanlık, risk faktörleri olarak düşünülür; çünkü bunlar polip veya kolorektal kanser geliştirme şansını artırır.

Kolorektal kanser için ana risk faktörü yaştır: beşinci on yılda yaşam boyu KK gelişme riski belirgin şekilde artarken, elli yaşın altındaki kolorektal kanserin başlangıcı nadirdir (kalıtsal kanserler dışında) (9). Yaşa ek olarak, değiştirilemeyen diğer doğal risk faktörleri de vardır. Crohn hastalığından mustarip olan kişilerin kolorektal kanser gelişme riski normal topluma göre %2.5 daha yüksekken, ülseratif kolitli hastalardaki risk %3.7 artar; bunlar kolorektal kanser gelişiminde önemli risk faktörleridir (10). İnflamatuvar Barsak Hastalıkları (IBD)'nda bulunan kronik inflamasyon, genellikle displazi olarak bilinen anormal bir hücre büyümesi üretir. Displastik hücreler hâlâ malign olmasa da, anaplastik hale gelme ve tümör içine gelişme şansları daha fazladır. Bu gruba dâhil edilebilecek bir diğer risk faktörü, özellikle teşhis sırasında elli yaşın altında olan akrabalarında KK öyküsünün pozitif olmasıdır. Ailevi geçmişten dolayı artmış risk, kalıtsal mutasyonlar veya çevreden çıkarılabilir (11).

Yaşam tarzıyla ilişkili bazı diğer risk faktörleri, diyet ve fiziksel aktivite alışkanlıkları açısından mütevazı bir yaşam tarzı değişikliği uygulayarak azaltılabilir. Örneğin, KK ve hareketsizlik arasındaki bu ilişki tamamen tanımlanmamış olmasına rağmen, hareketin az olduğu bir yaşam biçiminin KK gelişme riskini artırabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, ılımlı fiziksel aktivitenin metabolik hızları ve bağırsak motilitesini arttırdığı ve uzun vadede metabolik etkinliği arttırdığı ve kan basıncını düşürdüğü ispatlanmıştır (12). Sedanter bir yaşam tarzı, KK için bir başka önemli risk faktörü olan obezite ile de ilişkilidir. Dikkat çekici bir şekilde, bu artan risk hem gıda alımına hem de artmış vücut yağının bir bileşeni olan viseral yağ dokusunun (VAT) artmasıyla bağlantılıdır ve proinflamatuvar sitokinlerin salgılanması yoluyla KK gelişimini teşvik ederek, kolon ve rektumda iltihaplanmaya, insülin direncine ve adiponektin veya lektin gibi metabolik enzimlerin modülasyonuna yol açar (13). Bu bağlamda, diyet, KK riskine güçlü şekilde bağlıdır; böylelikle sağlıksız beslenme alışkanlıkları KK geliştirme şansını %70'e kadar artırır (14). Örneğin kırmızı et, lipoperoksidasyon yoluyla sitotoksik ve genotoksik aldehitlerin yanı sıra kanserojen N-nitrozol bileşiklerinin oluşumunu arttıran bağırsaktaki heme gruplarını serbest bırakır. Yüksek sıcaklıklarda pişirilmiş etler sindirimden sonra heterosiklik aminler ve polisiklik hidrokarbonlar üretir, her ikisi de potansiyel kanserojen maddeler olarak düşünülür (15). Ayrıca sigara ve alkol kullanımının KK riskini artırdığı gösterilmiştir. Alkol tüketimi durumunda asetaldehit (etanolün ana metaboliti), alkol metabolizması enzimlerinin polimorfizmlerine bağlı popülasyonlar arasında KK gelişme riskini arttıran kanserojen olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, alkol kullanımı ile KK arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Tütün içimi, metabolitleri bağırsağa kolayca erişebilen ve polipler

üretebilen nikotin gibi kanserojen maddelerdeki yüksek içeriğe bağlı olarak KK'ya maruz kalma şansını %10.8'e kadar arttırabilir (16). Sigara içimi KK riskini arttırsa da, sigara içmeyi bırakan ve bırakmayan uzun vadeli sigara içiciler arasında da anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

2.1.3. Evreleme

KK için en yaygın kullanılan evreleme sistemi, TNM sistemi olarak da bilinen Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) 'dır. Bununla birlikte, Dukes ve Astler-Coller sistemleri gibi diğer evreleme sistemleri hala kullanılmaktadır. Bu eski sistemler TNM sistemi kadar kesin değildir (17). AJCC sisteminde bir araya getirilen üç harf aşağıdaki anlamları taşır:

T, ana (primer) tümörün bağırsağın duvarına ne kadar ilerlediğini ve yakındaki bölgelerde büyüdüğünü anlatmaktadır;

N, yakındaki (bölgesel) lenf nodlarına yayılma derecesini tanımlar. Lenf düğümleri, enfeksiyondan korunmada önemli olan bağışık sistem hücrelerinin küçük fasulye koleksiyonlarıdır. Lenf nodu tutulumu hakkında doğru bir fikir edinmek için, mikroskop altında en az 12 lenf nodu (cerrahi sırasında çıkartılmış) aramak önerilir;

M, kanserin vücudun diğer organlarına yayılıp yayılmadığını gösterir (KK vücudun neredeyse her yerine yayılabilir, ancak yaygın yayılımı karaciğer ve akciğerleredir).

Bu üç harf artan şiddeti belirten rakamlarla (0 ila 4 arasında) bir araya getirilirken, "X" harfi (sayı yerine), bilgilerin mevcut olmadığı anlamına gelir. Evreleme grubu olarak adlandırılan bir süreçte, her harf bilgisini birleştiren evre, I. evre (en az gelişmiş) ile IV. evre (en gelişmiş) arasındaki Roma rakamlarıyla ifade edilir. Bazı evreler harflerle alt bölümlere ayrılmıştır. Sağkalımı analiz etmek için kullanılan bir diğer faktör kanser derecesi'dir. Grade, mikroskop altında kanserin normal kolorektal dokuya ne kadar yakından benzediğinin bir açıklamasıdır. Bir KK derecelendirmesi için kullanılan ölçek G1'den (kansere normal kolorektal dokuya benzemektedir) G4'e (kansere çok anormal görünüyorsa) geçer. G2 ve G3 bunların arasında bir yere düşer. Genellikle "düşük dereceli" (G1 veya G2) veya "yüksek dereceli" (G3 veya G4) olarak basitleştirilir. Düşük dereceli kanserler, yüksek dereceli kanserlere göre yavaş büyür ve yayılır (18).

2.1.4. Tipler

KK'ların yaklaşık %50'si nüksettiği için toplum için çok ciddi ve dikkat edilmesi gereken konulardan biridir (19). Çoğunlukla kendiliğinden oluşan KK'da intrinsek (yaş, erkek olmak, diyabet, obezite, inflamatuvar barsak hastalığı...) ve ekstrinsek (sigara, alkol, kırmızı et ve bol yağlı gıdalar, fiberli gıdaların az tüketilmesi...) etkiler artmış riskle ilişkilidir (20-22). KK'ın yaklaşık %80'i sporadik ve %20'si aileseldir; ama Lynch sendromu (Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer veya HNPCC) ve Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP) gibi tanımlanmış ailesel kanserler bunların sadece %6'sını oluşturur (23). Lynch 2 olarak isimlendirilen tür endometriyum, over, mide, pankreas ve diğer organ kanserleriyle ilişkilidir. Lynch vakalarının %70'inden MSH2, MLH1 genleri sorumludur, diğer sorumlu genler ise PMS1, PMS2 ve MSH6 genleridir (24). FAP'tan ise APC genindeki mutasyonlar sorumludur (25). KK oluşumu benin adenomdan malin adenokansere ve metastaza giden aşamalı uzun bir süreci takip eder (26). Dolayısıyla bu süreçte tanı, tedavi ve prognoza yönelik yeni çalışmalara ihtiyacımız var. KK oluşum mekanizmaları düşünüldüğünde onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin yanında genetik bilgiyi DNA'dan proteinlere aktaran ve düzenleyici görevleri olan RNA'lar pasif kalmışlardır. Yine de kanser oluşumundaki önemli rolleri anlaşılmaya başlanan RNA'lara ilgi giderek artmaktadır (27).

2.1.4.1. Sporadik KK

Hatalı uyuşmazlık onarımı (MMR) eksikliği taşıyan tümörlerin yaklaşık %60 ila %80'i, her iki alleli de etkileyen somatik olaylardan kaynaklanır ve dolayısıyla kalıtsal değildir. Bunların ezici çoğunluğu MLH1'in hipermetilasyonundan kaynaklanmaktadır. Metillenmeyi test etmenin basit bir yolu metilasyona özgü PCR metodudur (MSP). MLH1 yokluğunda, kalıtsal (Lynch sendromu) ve sporadik formu ayırt etmek için, mikrosatellit instabilitesi (MSI) pozitif tümörlerin %40-60'ında ve MSI pozitif tümörlerin %69'unda mevcut olan ancak Lynch sendromunda bulunmayan BRAF geni (ortak somatik V600E mutasyonu) dâhil olmak üzere diğer metilasyonlar immünohistokimyasal yöntemle analiz edilir. Tanımlanmış kromozomal bölgelerin kaybı veya kazanımı veya heterozigotluk kaybı (LOH), çok küçük boyutlu insan sporadik kolorektal adenomlarında da gözlenmiştir (17).

2.1.4.2. Herediter Nonpolipozisli Kolorektal Kanser

(Lynch Sendromları, HNPCC)

Henry Lynch, 1966'da kolon polipozisi olmadan kolon, endometrial ve gastrik kanseri tanımladı (28). Bu kanser ailesi sendromları daha sonra Lynch sendromları 1 ve 2 olarak adlandırıldı ve ayrıca HNPCC (kalıtsal nonpolipozis kolon kanseri) olarak tasarlandı. HNPCC hastalarının tüm kolorektal kanserlerinin %90'ından fazlası MSI-H'yi gösterir. Bu, HNPCC ailelerinde veya atipik HNPCC ailelerinde en az beş genin mutasyona uğradığı anlamına gelir. Bu mutasyonlar KK'nın yanı sıra mide, ince bağırsak, karaciğer, safra kanalı, üriner sistem, beyin ve merkezi sinir sistemi ve göğüs kanserlerini de artırabilir. HNPCC, kalıtsal kolorektal kanserin en yaygın şeklidir ve tüm kolorektal malignitelerin %3-5'ini oluşturur. Hatalı uyuşmazlık onarımı (MMR)(kromozom 2p16 üzerinde MSH2, kromozom 3p21'de MLH1, kromozom 2p16'da MSH6 veya Kromozom 7p22 üzerinde bulunan PMS2 genlerinden birinin yetmezliğiyle oluşur) sonucunda oluşan hastalık otozomal dominant olarak kalıtılır (29).

Lynch sendromuna neden olan çoğu mutasyon MLH1 veya MSH2 genlerinde bulunur, ancak Lynch sendromu bulunan tüm ailelerde MLH1, MSH2, MSH6 veya PMS2'de mutasyon bulunmayabilir. Lynch sendromuyla ilişkili diğer genleri tanımlamak için araştırma devam ediyor. Lynch sendromu tanısı alan ailelere ait hastalarla yapılan bir çalışmadan, tümörlerin %80'den fazlası MSI görüntüler (30). Lynch sendromunda MSI yokluğunun en yaygın nedeni, yetersiz sayıda mikrosatellit belirteçlerinden veya numunedeki tümör hücrelerinin yetersiz bir oranından kaynaklanan yanlış negatif bir durumdur. Daha az yaygın neden, tümörün fenokopi olması, yani Lynch sendromlu bir bireyde spontan (sporadik) bir tümör olmasıdır. Uygulamada, Lynch sendromu ile ilişkili güçlü bir aile hikâyesi yoksa beş işaretli Bethesda pozitif paneline ya da başka bir yüksek kalitede panele sahip hastalar olası bir Lynch sendromu tanısı için daha fazla değerlendirmeye ihtiyaç duymazlar. MSI-L'li hastalar, MLH1 veya MSH2 (Muir-Torre sendromu) veya MSH6 veya PMS2'de (Turcot sendromu) mutasyona sahipse Lynch sendromu tanısı konulabilir. Muir-Torre sendromu, bazı durumlarda MSH6'da mutasyonlarla tanımlanmış olsa da, esasen MLH1 veya MSH2 genlerinde mutasyonlar ile karakterize edilen bir HNPCC türüdür (31). Muir-Torre sendromlu hastalar erişkinlikte, sebaceous adenomlar, sebace epitelomalar, sebace karsinomalar ve keratoakantomları içeren sebace bezlerde belirli cilt değişiklikleri geliştirme riski taşırlar.

Turcot sendromu, birden fazla adenomatöz kolon polipi ve artmış KK ve beyin kanseri riski ile karakterize edilen HNPCC ve FAP'ın bir türüdür (32). Beyin kanseri türü, Turcot sendromunun HNPCC'ye (glioblastoma) veya FAP (medulloblastoma)'a daha fazla benzemesine bağlıdır. HNPCC'nin diğer özelliklerini taşıyan glioblastomalı ailelerde, iki gende mutasyonlar bulunmuştur: MLH1 ve PMS2. FAP'ın diğer özelliklerini taşıyan medulloblastomalı ailelerde ise APC geninde mutasyonlar saptanmıştır.

2.1.4.3. Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP)

Klasik familial adenomatöz polipozis (FAP veya klasik FAP) ilk polipozis sendromu olarak kabul edildi ve iyi karakterize edildi. FAP, kromozom 5q21'de bulunan APC genindeki bir mutasyonun neden olduğu otozomal dominant bir hastalıktır (33). APC bir tümör süpresör genidir ve FAP'a neden olmanın yanı sıra, sporadik KK'nın erken başlangıcında da rol almaktadır. Rutin tarama yöntemleri ile klasik FAP hastalarının %20-30'unda APC mutasyonu saptanmamıştır. Bununla birlikte, monoallelik mutasyon analizi sayesinde FAP hastalarının %95'inden fazlası tanımlanabilir bir mutasyonu göstermektedir.

FAP'ın ayırt edici özelliği, çoğunlukla ergenlik döneminden başlamak üzere kolonda ve rektumda 100'ün üzerinde adenomatöz polip gelişimidir. FAP hastalarının yaklaşık %90'ında üst gastrointestinal polipler 70 yaşına kadar mevcuttur. CRC'nin sadece küçük bir fraksiyonu FAP'a (<%1) neden olur ve bu fraksiyon iyileşmiş teşhis ve tedavi ile azalmaktadır.

Hafifletilmiş FAP (AFAP), Gardner sendromu ve Turcot sendromu olarak adlandırılan klasik FAP'ın üç alt tipi vardır (34). AFAP'da kolondaki adenomatöz polipler 100'den az, (ortalama 30 kadar) olup, polipler geç ergenlik döneminde oluşabilmesine rağmen, bu polipler klasik FAP'lı bireylere göre daha ileri yaşlarda ortaya çıkar. AFAP'da da APC geni mutasyonları gözlenebilir. Gardner sendromu, çenenin osteomaları (kemikli tümörleri), ekstra dişler, lipomlar (yağlı doku) ve fibromalar (fibröz doku) dahil olmak üzere yumuşak doku tümörleri ile ilişkili bir FAP türüdür.

2.1.4.4. MYH-İlişkili Polipozis (MAP)

MAP, KK riskini artıran çok sayıda adenomatöz polip ile bağlantılı olan, MYH'nin belirli bir genetik mutasyonunun (MUTYH, mut Y homologu olarak da adlandırılır) neden olduğu kalıtsal bir durumdur. Hastalık nispeten genç yaşta (20 ila 50 yaş arası) görülür (35). MAP bir otozomal resesif kalıtım kalıbını takip eder ve hastalığın gelişimi için genin her iki kopyasında bir mutasyona ihtiyaç duyulur. Böylece, taşıyıcılar (gen mutasyonunun yalnızca bir kopyası olan kişiler) hastalığa yakalanmaz. MYH'de Y165C ve G382D olarak bilinen iki ortak mutasyon vardır.

2.1.4.5. Peutz-Jeghers Sendromu (PJS)

PJS, STK11'in (serin / treonin kinaz 11) spesifik bir genetik mutasyonunun neden olduğu kalıtsal bir koşuldur. Otozomal resesif geçiş gösteren çok nadir bir hastalıktır, çünkü 100.000 kişiden birinin hastalığa yakalanacağı tahmin edilmektedir. Bu sendrom, daha sonra sindirim sistemi, göğüs veya kolorektal kanserler geliştirebilen sindirim sistemindeki hamartomatöz poliplerin (noncancerous tumors) gelişimi ile ilişkilidir. PJS, özellikle ağız çevresinde ve dudak, el ve ayak parmaklarının etrafında koyu mavi veya koyu kahverengi bir çillenme yayma eğilimi gösterir (36). Çiller genellikle çocuklukta görülür ve yaşla birlikte solabilir.

2.1.4.6. Juvenil Polipozis Sendromu (JPS)

JPS, genellikle kolonda ancak bazen mide, ince bağırsak ve pankreasta ortaya çıkan hamartomatöz polipler ile karakterize, otozomal dominant bir durumdur. Bu polipler baskın bir stroma, kistik boşluklara ve yumuşak kası olmayan bol miktarda lamina propriaya sahiptirler, bu özellikler onları Peutz-Jeghers poliplerinden ayırt eder. JPS hastalarında çocuk ve ergenlerin %2'sini etkileyebilen ve malign potansiyelleri az olan veya hiç olmayan yalnız juvenil poliplerin aksine, gastrointestinal malignite riski de artar.

BMPRIA (kemik morfogenetik protein reseptörü, tip IA) geninde veya SMAD4 geninde bir mutasyon, juvenil polipler ve sindirim sistemi kanseri geliştirme olasılığını artırır. Yine de, JPS ile olan bağlantıları ile ilgili diğer genler üzerinde çalışılıyor.

Juvenil polipler, baskın şekilde taşınan ailesel kanser sendromlarının bir belirtisi olarak ortaya çıkar: birden fazla hamartoma, makrosefali, trikilemmoma ve tiroid, meme, rahim ve cilt benign ve malign neoplazileri ile karakterize, Cowden sendromu (CS) (37); zekâ geriliği, makrosefali, lipomatoz, hemanjiyom ve genital pigmentasyon ile karakterize Bannayan-Ruvalcaba-Riley sendromu (Bannayan-Zonana sendromu, BRRS, BZS) (38); ve çoklu nevoid bazal karsinomalar, iskelet anormallikleri ve odontojenik keratinositler, makrosefali, intrakraniyal kalsifikasyon ve kraniofasial anormalliklerle karakterize Gorlin sendromu (GS) (39). JPS ile karşılaştırıldığında, CS, BRRS ve GS'de gastrointestinal malignite riski düşüktür. CS tanısı konan hastaların yaklaşık %85'i ve BRRS'li hastaların %60'ı PTEN (fosfataz ve tensin homologu) geninde bir mutasyona sahiptir. PTEN fosfat gruplarını tirozin, serin ve treoninden uzaklaştıran dual- spesifik fosfataz olarak işlev görür.

2.1.5. KK'da Tanı ve Tarama

Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da yaşayan ortalama riske sahip nüfus için CRC'nin yaşam boyu insidansı %5'tir. Vakaların büyük çoğunluğu (%90) 50 yaşından sonra ortaya çıkar (40). Bu yaşla ilişkili risk nedeniyle, mevcut tarama klavuzları 50 yaşından sonra rutin test önermektedir. Risk faktörleri olan hastalarda yaşa göre düzenleme gerekir. Ailesel Adenomatöz polipozis (FAP) veya varyantları, MYH'ye bağlı polipozis, Lynch sendromu (kalıtsal Polipsizsiz kolon kanseri - HNPCC), BRCA2, çocuk polipozisi gibi kalıtsal KK sendromlarının varlığı veya herhangi bir kişisel veya aile geçmişi olan sporadik KK veya adenomatöz poliplerin varlığı en güçlü risk faktörüdür. Hâlihazırda tarama önerilerini etkileyen diğer risk faktörleri uzun süren bir inflamatuvar bağırsak hastalığı ve abdominal radyasyon öyküsünün varlığı içerir. Tarama kolonoskopisi Afrikalı Amerikalılar'da 45 yaşla birlikte önerilir, ancak tarama önerileri cinsiyete göre bireyleri sınıflandırmaz (41). Geliştirilmiş tarama önerileri ve teknikleriyle birlikte artmış farkındalığa rağmen, KK hem erkek hem de kadınların kansere bağlı ölümlerinde ikinci en önemli neden olmaya devam ediyor. Erken tanının KK'ya bağlı mortalite oranını azaltmada önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Evre I veya II 'de tespit edildiğinde, beş yıllık sağkalım oranları sırasıyla %90 ve %75'tir. Bununla birlikte, hastalar daha gelişmiş ve mortalite ilişkili lezyonlarla semptomatik hale gelinceye kadar tanı genellikle geciktirilir. Buna göre, evre III ve IV 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla sırasıyla %65 ve %5'tir (42).

2.1.5.1. KK'de Biyoışaretleyicilerin Kullanımı

Bir biyolojik belirteç, belirli bir hastalığın varlığını veya ilerlemesini veya tedavinin etkilerini ölçmek için kullanılabilen biyolojik bir şeydir. Biyogöstergeler, hassas bir tanı kurulması ve tedavi seçiminin kolaylaştırılması için ölçülmesi kolay ve yararlı olmasının yanı sıra yüksek hassasiyet, özgüllük ve güvenlik gibi birçok önemli özelliğe sahip olmalıdır.

Daha önce de belirtildiği gibi, mikrosatellit istikrarsızlığı (MSI), kromozomal instabilite (CIN) ve CpG adası metilator fenotipi (CIMP) olmak üzere üç ana değişiklik KK'da görülmektedir. Bu değişiklikler tümör numunesinde, kanda veya gaytada ölçülebilen DNA, RNA, proteinler veya metabolitlerde modifikasyonlar üretir ve bu nedenle biyolojik belirteç olarak kullanılabilir (43). Halihazırda kullanılan yöntemlerin (kolonoskopi, sigmoidoskopi, çift kontrast baryumlu lavman, bilgisayarlı tomografik kolonoskopi ve dışkıda kan testi (FOBT)) aksine, moleküler testlerin daha spesifik, hassas ve hastalar tarafından daha iyi tolere edilmesi beklenir, ancak onların geçerliliği için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. KK'da en yaygın kullanılan biyobelirteçler şu anda tümörü sınıflandırmak, hastalığın prognozunu tanımlamak ve tedaviyi yönetmek için tümör numunelerindeki MSI ve KRAS mutasyonlarının belirlenmesidir. Teşhis için FOBT ve CEA'nın belirlenmesi de dâhil olmak üzere diğer biyolojik belirteçler kullanılmasına rağmen, bunlar yüksek özgünlük ancak çok düşük duyarlılık sergiliyorlar (44). Araştırmacıların KK'nin erken teşhisi için daha iyi moleküller araştırmalarının başlıca nedeni budur. Bu bağlamda, en dikkate değer bulgular, dışkıda veya kanda saptanabilen CpG adası metilator fenotipini, miRNA ve gen mikroarraylerini değerlendirmek için kitlerin kullanımını içerir. Bu kitlerin çoğunda klinik değerlendirme yapabilmek için umut vadeden bir gelecek var.

KK invazivliği, düşük özgüllük ve hassasiyet ve yüksek maliyet için fiili tarama yöntemlerinin sınırlandırılması göz önüne alındığında, KK'da prediktif ve/veya prognostik önem taşıyan yeni moleküler biyolojik belirteçlerin belirlenmesi, anti kanser tedavileri ve hasta sonuçlarının iyileştirilmesi için önemli bir konudur. Son yirmi yılda, birkaç moleküler biyolojik belirteç incelenmiş ve elde edilen sonuçlar cesaret vericidir; bununla birlikte, birkaç dezavantaj, sonuçların güvenilirliğini etkiler. Birincisi, yayınlanan çalışmaların çoğu, tek bir markırın geriye dönük analizleri ya da küçük bir örneklem boyutunu içermekte ve sonuç olarak, tahminlerde çözünürlük ve tekrarlanabilirlik bulunmamaktadır. İkinci olarak, veri analizi ve yorumlanması zor olmaya devam etmektedir; elde edilen veriler çoğunlukla tanımlama ve yeterli validasyona sahip değildir ve bu nedenle klinik uygulamada kullanılacak

kadar güvenilir değildirler. Dahası, standartlaştırılmış metotların olmaması ve standart endojen kontrollerin bulunmaması, elde edilen sonuçların sayısallaştırılmasını ve onaylanmasını güçleştirmektedir.

Sonuç olarak, potansiyel biyolojik belirteçlerin sayısı büyük olmakla birlikte, yalnızca KRAS geni rutin klinik uygulamaya girmiştir ve ileri KK evrelerinde EGFR hedefli tedavilere yanıtın prediktif belirteçi olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu konuda yoğun bir çaba gösterilmekte ve tüm gerçek dezavantajlarına rağmen biyolojik belirteçlerin kullanımı CRC'nin tanı ve prognozunda ve kişiselleştirilmiş ve hedefe yönelik terapinin gelişiminde gelecek vaat etmektedir.

2.1.5.2. Gen İfadesi Profilleme (GEP)

Gen ekspresyon profillemesi (GEP) tabanlı çalışmalar, normal ve tümöral doku örneklerinde veya hastalığın farklı evrelerindeki örneklerde gen ifadesini karşılaştırır (45). Bu karşılaştırmaların, hastalığın prognozu ve her hasta için en uygun tedavi hakkında faydalı bilgiler sağlayabileceği düşünülmektedir. Birkaç GEP tekniği şu an kullanılan test türüne ve incelenen gen sayısına göre farklılık gösterecek şekilde CLIA sertifikalı laboratuarlardan temin edilebilir.

Bununla birlikte, son yıllarda ortaya çıkan GEP testlerinin sayısına ve hem hasta (adjuvan tedavilerin zarar ve yan etkilerinin azaltılması) hem toplum (adjuvan tedavilerden fayda göremeyecek hastalar için daha düşük bakım maliyetleri) için potansiyel yararlarına rağmen, Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN), mevcut deneylerin herhangi birinde kemoterapinin potansiyel faydası açısından prediktif değeri ile ilgili hala yeterli kanıt olmadığını belirtmiştir. Dahası, NCCN, adjuvan terapi seçimini bu testlere dayamaya yetecek kadar veri bulunmadığını tespit etmiştir, bu nedenle, bu alandaki daha ileri çalışmalar, tanı ve klinik geçerliliğini ortaya koymak için yapılmalıdır.

2.1.5.3. Dışkıda Gizli Kan Testi (FOBT)

Elli ila 80 yaşları arasında insanlarda rehidrate ya da rehidrate olmayan dışkı örneğinden yapılan Guaiac tabanlı dışkıda gizli kan testi, KK nedenli ölümü azaltmaktadır.

1993 ve 1996'da, 3 klinik çalışma FOBT taramasının KK ilişkili ölüm azalttığına dair kanıtlar sağlanmıştır. Bir ABD klinik araştırmasında hastalara yapılan yıllık rehydrate FOBT testinin mortalitede %33'lük bir azalma; Avrupa'daki iki çalışmada yılda iki defa yapılan rehydrate olmayan FOBT testinin ise mortalitede %33'lük bir azalma sağladığı gösterildi. KK tanısı için yapılan FOBT testi, gizli gastrointestinal kanamanın iyi huylu koşullarda daha fazla yaygın olması, adenomlarda ve erken kanserlerde kanamanın evrensel olmaması nedeniyle nispeten düşük duyarlılık ve özgüllük ile sonuçlanır. Son yıllarda immün tabanlı FOBT tahlillerinin geliştirilmiş hassasiyet ve özgüllüğünü bildiren çalışmalar var. Şu anda İspanya'da Ig-FOBT ile kolonoskopiye karşılaştıran geniş bir klinik çalışma yapılmaktadır (46).

2.1.5.4. Endoskopik İşlemler

2.1.5.4.1. Esnek Sigmoidoskopi

KK taraması için esnek sigmoidoskopinin rolü tartışmalıdır. 60 cm'lik sigmoidoskop dalak kıvrımına erişebilir ve potansiyel olarak kolonun yarısını incelemeye olanak sağlar. Esnek sigmoidoskopinin kolonoskopi ile karşılaştırıldığında faydası daha ucuz ve daha güvenli olmasıdır ve işlem sırasında tam bağırsak hazırlığı gerekli değildir. Vaka kontrollü bir çalışmada, esnek sigmoidoskopi ile tarama sonucunda KK ilişkili mortalitenin azalmış olduğu gösterildi. Bununla birlikte, bu fayda muayene edilen kolonun bir kısmı için geçerlidir. Böylelikle dalak kıvrımının proksimalindeki tek başına sigmoidoskopinin kaçıracağı kanserleri belirlemek önemlidir.

Imperiale vd. sigmoidoskop alanında adenomatöz polip bulunan olgularda tam kolonoskopi ardından esnek sigmoidoskopiye dayalı bir stratejinin ek invaziv kanserleri tespit edeceği ve bu oranı %70-80'e yükselteceğini göstermişlerdir (47).

2.1.5.4.2. Kolonoskopi

Kolonoskopinin invaziv kansere dönüşecek büyük poliplerin çıkarılmasıyla KK'yı önlediği gösterildiğinden beri, kolonoskopi KK taramasında tercih edilen seçenek haline geldi. Ek olarak, kolonoskopi, birçok kanserin daha başlangıç evresinde tanısının koyulmasını ve biyopsi alınmasını sağlar. Bununla birlikte, endoskopistin deneyimi ve bağırsak hazırlığının yeterliliğine bağlı olarak penetrasyon derinliğiyle birlikte prosedürün yeterliliği

incelemeciler arasında değişir ve prosedürün %80-98'inde çekuma ulaşılır. Bugüne kadar kolonoskopinin KK ilişkili ölümleri azaltan bir KK tarama modalitesi olarak etkinliğini inceleyen bir çalışma yapılmadı. Buna ek olarak, kolonoskopinin ne sıklıkla yapılması gerektiği sorusuna yanıt olan kontrollü bir çalışma bulunmamaktadır. Ulusal polip çalışması poliplerin çıkarılmasının KK insidansını azalttığını göstermiştir. Ek olarak, kanser ve kanser öncesi lezyonların erken tespiti KK mortalitesini azaltmaktadır. Komplikasyon oranı ve uyumluluk açısından kolonoskopinin sınırlamaları devam etmektedir. Kolonoskopi sırasındaki komplikasyon oranları: 1.000'de 1 perforasyon ve 1000'de 3 büyük kanama geçirir; ve 10,000'de 1-3'ü prosedür sonucu ölür. Tarama kolonoskopisine uyumla ilişkili veriler daha da üzücüdür. Doktorlar, hemşireler ve eşleri ücretsiz tarama kolonoskopisine girmeleri için mektupla davet edildiğinde, %15'inden daha azı razı oldu. Taranan hastalarda mortalitede önemli bir azalma olduğunu gösteren FOBT tarama çalışmalarının ayrılmaz bir parçası olan kolonoskopi, KK taramasında önemli bir role sahiptir (41).

2.1.5.5. KK Taraması İçin Görüntüleme Yöntemleri

2.1.5.5.1. Baryum Enema

Çift kontrastlı baryumlu lavman (DCBE), kolonoskopiden daha önce poliplerin saptanması için birincil tekniktir. KK için yapısal tarama testlerinin en güvenilir ve ciddi komplikasyon riski 10.000'de 1 olmasına rağmen artık kullanılmamaktadır. DCBE hassasiyeti >1 cm polip için %70-90 arasında, <1 cm olan polipler için %50-80 arasında değişir. Duyarlılık eksikliği bağırsak kısımlarının yetersiz görselleştirilmesi ve hatalı yorumlardan kaynaklanmaktadır. DCBE rektum ve sigmoid kolon muayenesi için uygun kabul edilmez. Tamamlanmış prospektif randomize DCBE taramasının çalışmaları yoktur ve çoğu yayınlanmış çalışmalar asemptomatik yerine semptomatik hastaları ilgilendirmektedir. Kolondan kaynaklandığı şüphelenilen gastrointestinal kanaması olan 383 hastalık DCBE artı esnek sigmoidoskopi kullanılan randomize bir çalışmada, kolonoskopinin DCBE artı sigmoidoskopiye göre 9 mm'den küçük daha fazla polip saptadığı ortaya konulmuştur. Kanserli veya > 9 mm polipli hastalara uygulanan metodlar arasında fark yoktur. Özetle, bu yöntem şu an kolonoskopi veya BT kolonografi yerine çok seçici durumlarda kullanılmaktadır.

2.1.5.5.2. Bilgisayarlı Tomografi (BT veya CT) Kolonografi (Sanal Kolonoskopi)

Son yıllarda, sanal kolonoskopi veya CT kolonografi (CT-Co) kullanımı hızla artmaktadır. Burada kolon kolonoskopiye hazırlanmış gibi anüs aracılığıyla hava ile genişletilir ve BT yardımıyla incelenir. Son çalışmalarda, CT-Co'nun büyük poliplerin saptanması için hassasiyeti %50 ila %91 arasında değişmektedir. Önemsiz bir riski olan CT-Co kolonu, hızlı ve tamamen görselleştirebilir. Sedasyona gerek yoktur ve hastanın kabulü fiber optik kolonoskopi veya baryumlu lavmandan daha iyidir. Teknik zorluklar ya da tıkayan bir lezyondan dolayı sağ kolon ve çekum fibro-optik kolonoskopi yapılan olgularda tamamen incelenemezse CT-Co görüntüleyebilir. Sonunda, kolon dışındaki karın yapıları ile ilgili ek bilgi de sağlayabilir. En önemli sınırlaması kolon iyice temiz olmalıdır ve sanal kolonoskopi ile polipektomi mümkün değildir. Polip boyutu da önemlidir, çünkü CT-Co'nun 10 mm'den küçük lezyonları tespit etmek duyarlılığı sınırlıdır. Bu yöntemle tespit edilemeyen düz adenomlar endişelendiren diğer bir durumdur (48).

2.1.5.6. Dışkı DNA ve RNA Taraması

Hergün normal yetişkin kolonik epitel hücrelerinin (kolonositler) sayısının yaklaşık altıda biri ve üçte biri arasında hücre kolon kriptlerinin alttaki üçte ikisinden dökülür. Yaklaşık olarak günlük her biri 3-4 gün ömre sahip 10^{10} hücrenin dökülmesine karşılık gelir. Kansere bağlı spesifik DNA veya RNA açısından dışkıyı tarama caziptir. Bununla birlikte, teknik karmaşıklık ve KK'ya özgü moleküler belirteçlerin eksikliği, sağlam ve ticari olarak temin edilebilen fekal DNA tarama kiti geliştirilmesine engel olmaktadır. KK, birkaç moleküler hastalığın ortak bir fenotipidir. KK'nın moleküler genetiğinin anlaşılması dışkı DNA veya RNA analizi için gereklidir (49). KK'nın büyük çoğunluğu kromozomal instabiliteden (CIN), aşamalı olarak Adenomatöz polipozis coli (APC) geni, p53 tümör süpresör geni ve K-ras onkogenini etkileyen mutasyonlardan kaynaklanır. İkinci en yaygın yol (CRC'nin %6 -%25'i) DNA uyuşmazlığı onarımında yer alan genlerin kaybıyla seyrederek ve mikrosatellit instabilitesi (MSI) ile kendini gösterir. KK'ya yol açan diğer moleküler yol; CIMP tarafından karakterize edilen birkaç farklı moleküler yolağı içeren CpG adaları promotör hipermetilasyonu (CIMP)'dur (50). KK bozuk apoptoz ile ilişkili DNA markırları kullanılarak da saptanabilir. Dışkıya dayalı DNA testi kullanan bazı çalışmalar, kanser için %62-91 ve ileri adenomlarda %27-82 arasında bir duyarlılık ve kolonoskopide normal

bulguları olan kişilerde %93-96 özgüllük bildirmiştir (51). Bununla birlikte, bu çalışmalar ilerlemiş semptomatik lezyonlu hastalarda yürütülmüştür. Fekal DNA'yı FOBT ile karşılaştıran geniş çaplı bir çalışmada 5486 hasta tarandı. Dışkı DNA paneli, 31 de 16 FOBT ise 31 de 4 invaziv kanser tespit etti (%51,6'ya karşı %12,9, $P = 0.003$). DNA paneli, 71 invaziv kanserden 29'unu ve yüksek dereceli displazili adenomları tespit etti; FOBT ise 71de 10'u tespit etti (%40,8'e karşılık %14,1, $P < 0.001$). Kolonoskopide negatif bulguları olanlarda özgüllük, dışkı DNA paneli için %94,4 ve FOBT için %95,2 idi (52). Bir başka moleküler tarama stratejisi fekal RNA'yı taramak ve RT-PCR'ı kullanarak kansere spesifik moleküler markırları çoğaltmaktır. Ahmed vd. ticari olarak temin edilebilen kitleri kullanarak dışkıdaki insan kolonositlerinden sağlam bozulmamış toplam RNA'nın çıkarılmasını sağlayan bir yöntemi açıklamışlardır. RNA'nın yeterince ters transkribe edildiğini ve yüksek kalitede cDNA'nın üretildiğini gösterdiler. Bunu, kolon kanserine spesifik gen primerleri (guanilil siklaz C ve PYPAF5 genleri) kullanılan PCR takip etti (53).

2.1.5.7. KK Tespiti İçin Serum (Kan) Testi

Şu anda, KK teşhisi için piyasada mevcut olan FDA onaylı kan testi bulunmamaktadır. Literatür araştırması, ağırlıklı olarak kütle spektrometri analizi ile tanımlanan proteinleri içeren yeni markırlar, CEA ve karbonhidrat antijenleri de dahil olmak üzere KK için toplamda 70 farklı kan markırı değerlendiren 93 çalışmayı tanımladı. Çoğunlukla protein markırları kullanılmakla birlikte son yıllarda genetik ve epigenetik (mRNA, DNA, mikroRNA) belirteçlerine olan ilgi artmaktadır. Genel olarak, çeşitli belirteçler için geniş bir duyarlılık ve özgünlük yelpazesi bildirilmiştir. Farklı araştırmalardaki sonuçların doğrudan karşılaştırılması, kullanılan çeşitli popülasyonlar ve aynı işaretleyici için farklı katof noktaları kullanımı nedeniyle karmaşıktır. Ayrıca, belirteçlerin çoğunluğu tek bir çalışmada değerlendirilmiştir. Buna ek olarak, birçok çalışma küçük örneklem boyutuna sahiptir. Yalnızca çok az sayıdaki çalışmada genel örneklem büyüklüğü 300 denek üzerindedir. Bir diğer endişe, serum toplama, işleme ve depolama yöntemlerindeki potansiyel farklılıklar ve çeşitli biyolojik belirteçlerin stabilitesindeki belirsizlikler göz önüne alındığında, sonuçların karşılaştırılabilirliğiyle ilişkilidir. Diğer endişeler, bu çalışmaların çoğunda adenomatöz polip bulunan hastaların bulunmaması ve çoğu çalışmadaki kontrol hastalarının, adenom veya karsinom varlığını dışlayan zorunlu kolonoskopi yaptırmamış olmalarıdır.

Mevcut kanıt aşamasında, iyi tanımlanmış, geniş çaplı bir tarama popülasyonunda standartlaştırılmış örnek toplanması, işlenmesi, depolanmasına özen gösterilen, prospektif olarak planlanmış ve sistematik olarak değerlendirilmiş kan ve dışkı testleri gerekmektedir (41).

2.2. Kolon Kanseri Oluşumu

2.2.1. Karsinogenezin Klasik Modeli: Çok Vuruşlu Hipotez

Kanser, klasik olarak başlama, büyüme ve ilerlemeyi içeren üç aşamalı bir süreçle üretilir. Basit bir mutasyon bir kanser geliştirmek için yeterli değildir ve dolayısıyla çoklu vuruş hipotezi kanserin bir hücrenin DNA'sına birikmiş mutasyonların bir sonucu olduğuna işaret eder. Bu hipotez ilk olarak Nordling tarafından ve daha sonra Knudson tarafından önerilmiştir (54).

Başlama, kanserojen bir başlatıcı DNA'ya zarar verdikten sonra malign bir hücrenin oluşumunu içerir. Kanserojen başlatıcılar UV ışığı, iyonizasyon radyasyonu, termal bozunum veya kimyasal kaynakları içerir. Genotoksik başlatıcılar hücresel DNA'yı beş temel DNA hasarı vasıtasıyla mutasyona uğratırlar;

- (i) Bazların (örneğin, 8-okso-7,8-dihidroguanin (8-okzoG)) oksidasyonu ve DNA sarmal kesintilerinin oluşumu (genellikle reaktif oksijen türleri tarafından üretilen),
- (ii) Bazların alkilasyonu (özellikle metilasyon, örneğin 1-metiladenin veya 7-metilguanin),
- (iii) Bazların hidrolizi (örneğin, deaminasyon, depurinasyon ve depirimidinasyon),
- (iv) Büyük eklenti oluşumu (örneğin Aristolactam I-dA veya benzo [a] piren diol epoksi-dG eklentisi),
- (v) DNA replikasyonundaki hatalar nedeniyle bazların uyuşmazlığı. DNA hasarının onarılmaması durumunda promotör bir hücrenin klonal genleşmesine neden olur ve promosyon fazında mutasyona uğramış genler içeren bir hücre kümesi oluşturulur.

Bir tümör başladıktan sonra, mutasyonlar, genetik istikrarsızlık veya epigenetik değişiklikler, tümörün genişlemesine (klonal evrim modeli) katkıda bulunan yeni klonlara yol açabilir. Üç tip genin kanser üretmek üzere değiştirilebileceği belirtilmelidir.

(1) Protoonkogenler. Bunlar normal bir proteinin yapısını ve fonksiyonunu değiştiren ve bir onkoprotein üreten bir mutasyona bağlı olarak onkogen haline gelebilen normal

genlerdir. Normal protein ile karşılaştırıldığında, onkoproteinler, protein aktivitesinde bir artışa, düzenlemede bir kayba veya artmış bir konsantrasyona (protein ekspresyonunda, mRNA stabilitesinde artışa veya kromozom anomalisine bağlı olarak) neden olabilir. Proto-onkogenlere RAS, WNT, MYC, ERK ve TRK örnektir. Hücre içinde bulunan proto-onkogenleri ve virüslerle birleşmiş proto-onkogenleri ayırt etmek için onkogenler, c-onkogenler (veya hücrel onkogenler) ve v-onkogenler (veya viral onkogenler) olarak adlandırılırlar (17).

(2) Tümör baskılayıcı genler. Bu genler hücreyi kanserden korur. Bununla birlikte, bir tümör süpresör gen mutasyon geçirdiğinde, hücre kansere ilerleyebilir. Çok vuruş hipotezi, başka mutasyonların kansere ilerlemesi için gözlemlenmesi gerektiğini gösterse de, bazı vakalarda tek bir allelin mutasyonu artmış kanserojen duyarlılığına neden olabilir. Tümör süpresör genlerine örnek olarak APC, TP53, SMAD4, SMAD2 ve DCC verilebilir.

(3) DNA Tamir Genleri. İnsanlarda DNA onarım mekanizmalarında 130'dan fazla genin rol aldığı düşünülmektedir. DNA tamir mekanizmaları tek iplikli DNA hasarı (baz eksizyon tamiri (BER), nükleotid eksizyon tamiri (NER), uyuşmazlık onarımı (MMR)) ve çift iplikçikli DNA hasarı (nonhomologous end joining (NHEJ), mikrohomojoloji aracılıklı son birleştirici (MMEJ)) ve homolog rekombinasyon (HR)) onarımını içerir (55). DNA onarımı kusurları tümör baskılayıcıların inaktivasyonu veya onkogenlerin aktivasyonu ile kansere neden olabilir. Ana DNA onarıcı genler MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, BLM ve PMS2'dir. Çok vuruş hipotezi, aynı hücre içindeki birkaç ardışık mutasyonun, muhtemelen insan kanserlerinde yaklaşık yedi olmasının, bir kanser geliştirmek için gerekli olacağını önermektedir. Açıkçası, yedi mutasyonun kansere neden olacağı kabul edilemez. Sadece hücrel bölünmeler ile çevredeki hücrel kayıp arasındaki oranı arttıran mutasyonların bu etkiye sahip olması beklenebilir.

KK'nın gelişimi, ilk defa Fearon ve Vogelstein tarafından yapılan kilometre taşı bir araştırmada tanımlanmış ve tipik olarak ardışık birkaç adımı izlemektedir (5). Normal epitelyal ya da kök hücrelerde kanser başlatan mutasyonlar rastgele ve düşük oranlarda oluşmasına rağmen, Wnt ya da β -katenin içindeki aktive edici mutasyonları içeren hücreler en çok tümör oluşturmaktadır. 15 eksonu olan ve 300 kDa moleküler ağırlığa sahip olan büyük bir proteini kodlayan APC'deki mutasyonlar tipik olarak tümör oluşturuşu yolaktaki erken olaylardır. APC, sitoplazmada β -katenini ayırarak inhibe eden bir proteindir. Wnt-bağımlı sinyalizasyon, APC'nin proteolitik bozunması, β -katenin aktivasyonu ve çekirdeğe

translokasyonu ile sonuçlanır. Bu nedenle, APC bir tümör süpresör kodları; dönüşümün gerçekleşmesi için her iki allel de kesintiye uğramak zorundadır. Ailesel adenomatöz polipozisi olan bireyler bir APC alelinde bir mutasyon taşır; 2. allel, yaşamın ilk 30 yılında heterozigotluk kaybıyla tipik olarak etkisiz hale getirilir, bu da kolondaki çoklu ve agresif tümörlerin oluşumuyla sonuçlanır. APC mutasyonları, preneoplastik hücrelerin anormal kript odağı ve mikroadenom ve adenom gelişimine geçişi için gereklidir. APC'nin inaktivasyonu, premalign hücrelerin migrasyonunu ve diferansiyasyonunu ve bunun ardından kript kenarında dökülmesini durdurur. Böylece, bağırsak lümenine dökülen APC mutasyonları olan hücreler, sonraki malin dönüşüm için gereken ikinci ve üçüncü mutasyonları elde etmek için yeterli zamana sahip olurlar. Bu nedenle APC inaktivasyonu (veya β -katenin aktivasyonu) adenomların oluşumu için gereklidir - son çalışmalar APC inaktivasyonunun, epitel hücreler yerine bağırsak kök hücrelerinde gerçekleşmesi gerektiğini göstermiştir (56). Bir çalışma, adenoma gelişimi için APC'nin kaybı ve CtBP1'in aktivasyonuna ihtiyaç duyulduğunu, bununla birlikte daha sonraki KRAS aktivasyonu ve β -katenin nükleer lokalizasyonunun KK'yı teşvik ettiğini ileri sürmektedir (57). APC gibi çok büyük bir gen, mutasyonlar tarafından kolaylıkla inaktive edilebilmesine rağmen, bunlar β -katenin aktivasyonuna yol açan tek mutasyonlar değildir. Glikojen sentaz kinaz-b, β -katenin ve bu yolağın diğer bileşenleri içindeki mutasyonlar, kolon tümörlerinin % 10'unda bulunur (58). İlginç olarak, *Helicobacter pylori* kaynaklı mide tümörlerinde, tümör nekroz faktörü (TNF)-a ile proinflatuar sinyalizasyon, APC mutasyonları olmadan bile β -katenin nükleer birikimini indükleyebilir. Benzer şekilde, EP2 reseptörünün akut ve kronik inflamasyon sırasında üretilen prostaglandin E2 (PGE2) ile aktivasyonu, β -katenin nükleer birikimini ve transkripsiyonel aktivitesini de artırır. Diğer inflammatuar sinyal yolları β -katenin aktivasyonunu kontrol eden protein kinazlar olan glikojen sentaz kinaz-b ve kazein kinazlar 1 ve 2 noktasında birleşir (21). İlginç olarak geleneksel olarak yetiştirilen *Helicobacter* ile enfekte interlökin (IL)-10 eksik fareler spontan inflamasyon ve kolon tümörleri geliştirir ancak tümör hücreleri APC veya p53 mutasyonları içermezler, bu da APC inaktivasyonundan bağımsız β -katenin sinyalizasyonunun aktivasyonunda inflamasyon için olası bir rolü işaret eder. Bir fare kolit ilişkili kanser modelinde, β -katenin geninin ekzon 3'ündeki mutasyonlar sıklıkla tespit edilir ve bu da β -katenin nükleer lokalizasyonu ile sonuçlanır. Bu nedenle, kolorektal tümörözenezin anahtar olaylarından biri olan β -katenin aktivasyonunda birkaç farklı mekanizma vardır. Erken evre adenomlarının karsinom in situ ve invaziv metastatik karsinomaya ilerlemesi için bazı ek yolların denetimi kaldırılmalıdır. Bu ilerleme, TGF-b reseptörü (R) II (ve bu sinyal yolağının diğer bileşenleri), aktivin reseptörleri, p53,

proapoptotik protein Bax ve benzeri tümör süpresörlerin inaktivasyonunun yanı sıra onkogenlerden K-ras ve B-Raf'ın aktivasyonunu içerir. Adenomdan karsinoma dönüşüm prostaglandin biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim olan siklooksijenaz 2'nin (COX2) ekspresyonunun artışı da gerektirir. DNA bütünlüğü kontrol genlerindeki "Gatekeeper" mutasyonları da bu (veya daha erken) noktada ortaya çıkmakta ve kolorektal tümörlerin %15'inde mikrosatellit istikrarsızlığı ve/veya geç evre kolorektal tümörlerin %80'inde kromozom instabilitesi ile sonuçlanmaktadır (59). Genetik instabilite, kolorektal tümörlerde saptanan mutasyonların büyük varyasyonu ile sonuçlanır ve gelişme, çoğalma, ilerleme, konukçu kontrolünden kaçma ve hızla tedaviye direnç geliştirme kapasitelerinden sorumludur.

2.2.2. Genomik Aberasyonların KK Sonuçlarına Etkisi

Yeni genomik teknikler, kolorektal kanserde geniş bir genomik sapmanın belirlenmesine izin verdi. Bu nedenle, mutasyonlar ana genomik değişiklik olmasına rağmen, birkaç kromozomal değişiklik ve translokasyon sıklıkla KK'da bulunabilir. Bu sapmaların hepsi önemli yolları (WNT, MAPK / PI3K, TGF- β) etkiler ve hücre içinde işlev görür (TP53 ve hücre döngüsü düzenlemesi) (60).

WNT yolu, kök hücre farklılaşmasında ve hücre sel büyümede önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle bu yol üzerindeki değişiklikler tümör gelişimini tetikleyebilir. CRC'deki WNT yol değişiklikleri ayrıca zayıflamış sıkı kavşaklarla ilişkilidir ve bu da hücre sel yapışmanın azalmasına ve dolayısıyla göç ve metastazı desteklemesine neden olur (61). KK'da WNT yolağı ile ilişkili ana genomik sapma APC mutasyonlarıdır, ancak birçok başka değişiklik de bu yolu hedef alabilir. Dahası, WNT yolundaki genomik değişiklikler özgün değildir ve APC'de mutasyona sahip tümörler de diğer ortak değişiklikleri gösterebilir. En yaygın mutasyona uğramış gen olmasına rağmen, APC, KK vakaları arasındaki yüksek mutasyon sıklığı ve bu gen içerisinde bulunan geniş mutasyonları nedeniyle KK için garantili bir prognostik belirteç değildir (62). WNT yolunda da yer alan β -katenin, genellikle KK kanserlerinde aşırı eksprese edildiği için prognoz için genellikle yararlı değildir. Bununla birlikte, WNT yolağının aktivasyonu tarafından tetiklenen c-MYC'nin aşırı ekspresyonu metastaz belirteç ve iyi sağ kalımla ilişkili prognostik faktör olarak düşünülür (63). MAPK ve PI3K yolları hem hücre çoğalması hem de hayatta kalma ile ilgilidir. Bu yolları etkileyen

değişiklikler bu nedenle tümör hücreleri üzerinde proliferatif avantajlar sağlamaktadır. KRAS, BRAF ve PIK3CA (PI3K) mutasyonları KK'da en sık görülen tiplerdir. KRAS ekzon 2 kodon 13'teki mutasyonlar zayıf prognoz azalmış sağkalım ile birlikte, ekzon 2 kodon 12'deki mutasyonlar daha ileri tümörler ve metastaz ile ilişkilidir (64). Buna ek olarak, BRAF mutasyonları da, özellikle mikrosatellit istikrarsızlığı olan tümörlerde düşük sağkalım oranları ile ilişkili kötü prognoza sahiptir (65). Birçok kanser tipinde en yaygın BRAF mutasyonu olan BRAF V600E, metastatik kanserde kötü prognostik bir faktör olmasına rağmen, kişiselleştirilmiş tıpta umut vadeden bir hedeftir ve spesifik BRAF V600E inhibitörlerinin diğer MAPK/PI3K yol inhibitörleri ile kombinasyonu metastatik KK'nın tedavisinde daha etkili olduğu gösterilmiştir (66).

Buna karşılık, KRAS ve diğer daha az yaygın BRAF mutasyonları terapi direnciyle ilişkilidir, bu nedenle monoterapi başarısızlığı kötü prognoza neden olur (67). Mutasyonlu KRAS veya BRAF'a sahip olan tümörlerde MAPK ve PI3K yol inhibitörleri ile yeni kombinasyonlar gereklidir. PIK3CA mutasyonları kolorektal kanserde de ortak bir özellik olmasına rağmen, PIK3CA ve KK arasındaki ilişki KRAS veya BRAF ile ilgili olanlar kadar iyi kurulmamıştır. Bununla birlikte, PIK3CA mutasyonları, KRAS mutasyonları eşliğinde kötü prognoz ile ilişkilidir (68). Benzer şekilde, PIK3CA'nın ekzon 9 ve 20'sinde kombine mutasyonlar olan tümörler, bu mutasyonların sadece birini barındıran tümörlere göre daha kötü sonuçlara sahiptir. Buna ek olarak, primer tümörlerde PI3K yolunu aşağı düzenleyen PTEN'in kaybı, artmış ölüm riski ve metastazda sağkalımın kötü olması ile anlamlı derecede ilişkilidir (69). TGF-b yolu, sırayla büyüme, farklılaşma veya apoptoz gibi temel hücre süreçlerinde rol oynar. Bununla birlikte, TGF-b ve onun yolundaki sporadik mutasyonlar kolorektal kanserde özellikle yaygın değildir, dolayısıyla prognostik belirteçler olarak önemli değildirler.

Bununla birlikte, TGF-b'yi içeren kromozomal değişiklikler, KK'daki CIN yolağına güçlü bir biçimde bağlıdır. 18q kaybı, kolorektal kanserde TGF-b yolağı ile ilişkili ana genomik sapmalardan biridir (70). Kromozom 18q, SMAD2 ve SMAD4 olarak bilinen iki önemli tümör baskılayıcı geni kodlar; kaybı, apoptozdan kaçınma ve hücre döngüsünün düzenini değiştirme yeteneğine yol açar. Mevcut çalışmalar kötü prognoz/daha kısa sağkalım oranları ile 18q kaybı arasında zayıf bir korelasyon olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, 18q kaybının yararlı bir prognostik belirteç olarak kabul edilebilmesi için, daha kapsamlı kohortları içeren daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulabilir. TP53 en önemli tümör süpresör genlerinden biridir ve ana hücre döngüsü kontrol noktasındadır, bu nedenle kaybı,

aşırı proliferasyona izin vererek tümör ilerlemesine neden olabilir. P53'ü kodlayan 17q-TP53 kaybı, klasik adenomdan karsinom ilerlemesinde rol oynadığı için KK'da sık görülen bir olaydır. Dahası, TP53 kaybı ile daha kötü sağkalım oranları arasında bir ilişki bulunmasına rağmen, TP53 kullanılabilir bir prognostik belirteç olarak görülmemektedir (71).

Ek olarak, tümörün genel genomik konteksi KK'da klinik açıdan önemlidir. Dukes C KK'nın analizi, ikiden fazla sapmayı içeren tümörlü hastaların, iki veya daha az aberasyon içeren tümörlü hastalara kıyasla daha iyi bir sağkalıma sahip olduğunu bulmuşken; genetik analiz, spesifik kromozomal sapmalar ile sağ kalım arasında hiçbir ilişki bulamamıştır. Diğer çalışmalar, artmış genetik instabilitenin veya artmış kromozomal sapmaların, olumlu bir sonuç ile ilişkili olduğunu göstermiştir (72). Aşırı miktarda genomik istikrarsızlığın hücre ölümünün çeşitli mekanizmalarını harekete geçirebileceği öne sürülse de, altta yatan mekanizmalar halen belirsizdir.

Sonuç olarak, somatik DNA sapmalarının moleküler karakterizasyonu, modern ve kişiselleştirilmiş bir tıbbın en önemli üslerinden birini oluşturan, bireysel hastaların prognoz tahmini ve terapi seçimini iyileştirmek için yararlı bir stratejidir.

2.2.3. KK'da ncRNA'nın Rolü

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar), genomun kodlamayan bölgelerinden kopyalanan RNA molekülleridir, bu nedenle açık okuma çerçevesine sahip değildirler ve proteinlere dönüştürülmezler. Son birkaç yılda birkaç farklı tipte ncRNA belirlenmiş ve birkaç hücre fonksiyonuyla ilişkilendirilmiştir. Örneğin, rRNA'lar ve tRNA'lar mRNA translasyonuna katılır, snoRNA'lar (küçük nukleolar RNA'lar) rRNA modifikasyonlarında bulunur, snRNA'lar (küçük nükleer RNA'lar) splicingi yönetir ve hem miRNA'lar (mikro RNA) hem de siRNA'lar (küçük müdahale eden RNA) gen ekspresyonunu düzenler (73). Bu bağlamda, miRNA'lar, gen ekspresyonu düzenlemesindeki önemlerinden ötürü, kanserle ilgili en çok çalışılan epigenetik elementlerden biri olmuştur. Bu miRNA'lar çeşitli mRNA'ların 3'UTR bölgelerine bağlanır, böylece parçalanmalarını indükler veya translasyonunu bastırır, dolayısıyla KK ile farklı miRNA'ların ekspresyonları ilişkilidir.

NcRNA'lardaki en yeni bulgulardan biri, çekirdekte ve sitoplazmada gen ekspresyonunu modüle eden genomun birçok loküsünde eksprese olan lncRNA'lardır.

Çekirdekte, DNMT3A gibi kromatin modifikasyon proteinlerini aktive ederek ya da bastırarak epigenetik belirteçleri değiştirebilirken, sitoplazmada bir miRNA tuzağı, translasyon düzenleyicileri ya da splicing düzenleyicileri gibi davranabilirler (74). Sonuç olarak, lncRNA'lar, kanserle yakından ilişkili hücrel farklılaşma ve proliferasyon süreçlerinde kritik bir rol oynamaktadır. Son birkaç yıldır yüksek verimli genom dizileme araçlarının geliştirilmesi sayesinde, yeni lncRNA'lar genel olarak kanserle ve özellikle KK ile ilişkilendirildi. Fizyolojik koşullar altında bu lncRNA'lar, proto-onkogenler veya tümör baskılayıcı genler gibi davranarak gen ekspresyonunu, epigenetik imprints veya alternatif eklemeyi düzenler (75). LncRNA'lar proto-onkogenler olarak hareket ettiğinde, bunların aşırı ekspresyonu, MYC veya WNT sinyal yolunda yer alan genler gibi, tümör ilerlemesinde kritik bir role sahip genlerin yüksek ekspresyonuna yol açar (76). Benzer şekilde, tümör süpresörleri olarak davrandığında, lncRNA'lar normal koşullar altında p53'e bağımlı genlerin ekspresyonunu düzenler.

Bu şekilde, bu lncRNA'ların ifadesi azaldığında, kontrol altındaki genlerin ifadesi değişir ve hücreler apoptozise direnç geliştirir, böylece çoğalmalarını artırırlar. Dahası, lncRNA değişiklikleri hastalar arasında sabit kaldığı için, KK'nın tanısı ve prognozu için potansiyel bir biyobelirteç oluşturabilirler.

ncRNA'ların rolü yapısal değişiklikler ve transkripsiyonel düzenlemelere ek olarak çoklu kalıtsal genetik ve epigenetik değişikliklerle modifiye edilebilir; bu faktörlerin hepsi, disregülasyonuna katkıda bulunur ve kanser etiyolojisi ve patofizyolojisinde rol oynar. ncRNA'ların disregülasyonunun çeşitli kansere bağlı sinyal yollarını değiştirdiğinin iyi olduğu bilinmektedir; bununla birlikte, karmaşık yapısal özelliklerinin yanı sıra spesifik zamansal ve mekansal ifade kalıpları nedeniyle; KK'daki rollerini daha iyi anlamak için daha yapısal, işlevsel ve mekanik karakterizasyonlar yapılmalıdır. Ayrıca, artan sayıda çalışma ncRNA'ların dışkı, serum, plazma ve dokulardaki KK için potansiyel tanı ve prognostik biyolojik belirteç olarak işlev görebildiğini bildirmiştir. Kolonoskopi ve dışkıda gizli kan testi gibi KK için en sık kullanılan tarama yöntemleri, invazivliği, düşük spesifitesi ve hassasiyeti ve yüksek maliyetiyle sınırlanmaktadır. Bu nedenle ncRNA'lar, dokuya özgü imza ve tümördeki özel ifade şekilleri sayesinde, erken KK tespiti ve prognoz tahmini için doğru ve invaziv olmayan biyolojik belirteçlerin gelişimi için büyük bir vaat olarak ortaya çıkmıştır. Örneğin, KK hastalarından dışkı numunelerindeki belirli 12 miRNA (miR-7, -17, -20a, -21, -92a, -96, -106a, -134, -183, -196a, -199a-3p ve -214 gibi) sağlıklı kontrollerden daha yüksek ifade seviyeleri gösterdi, buna karşın sekiz miRNA (miR-9, -29b, -127-5p, -138, -143, -146a,

-222 ve -938) daha düşük ifade seviyeleri gösterdi(77). Dolaşımdaki miRNA'lar, KK taraması ve prognostik değerlendirme için önemli biyobelirteçler oluşturabilir. Kan bazlı miRNA'lardaki değişiklikler KK hastalarında da saptanmıştır ve KK tanısı için dışkıdaki miRNA'lardan daha duyarlı, ancak daha az spesifik görünmektedir. Bununla birlikte, çeşitli çalışmalar, belirli ncRNA ve klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişkiyi göstermiş olmakla birlikte, kısıtlamaların birçoğu kliniğin kullanımını engellemektedir. Birincisi, dolaşımdaki ncRNA kopyalarının seviyeleri ve bunların transkripsiyon sonrası modifikasyonları değişkendir, hatta hastalığın farklı evreleri boyunca tespit edilmesi güçtür. İkincisi, dolaşımdaki ncRNA'ların miktarının belirlenmesi için endojen bir kontrolde basit bir standart tahlil ya da fikir birliği bulunmamaktadır. Üçüncü olarak, elde edilen sonuçların çoğunun kopyalanmadığı ve ayrıca, ncRNA'ya dayalı teşhislerin Asya'da Kafkasya'lılara göre daha doğru olduğu görülmektedir (78). Gerçek sonuçlar, birden çok merkezde ve farklı popülasyonlarda daha büyük çaplı yapılan birçok çalışmada doğrulanmalıdır. Son olarak, izole edilmiş ve nicelenmiş dolaşımdaki ncRNA'ların köklerini belirlemek zordur ve dolayısıyla bu ncRNA'ların tümör dokularındaki hücrelerden salınıp salgılanmadığını veya hematosit kontaminasyonunun bir sonucu olarak tespit edilip edilmediğini belirlemek zordur.

Biyolojik belirteç olarak potansiyel kullanımlarının yanısıra, ncRNA'ların genel olarak gen ekspresyonunu ve özellikle de kanser hücresi transformasyonunda rol alan gen ağlarını düzenleyebilme kapasiteleri onları KK'ya karşı cazip bir terapi haline getirir. Bununla birlikte, klinikte kullanımları için güvenilir teslim yöntemleri olmaması, hücrelerde ncRNA verilmesi için sınırlı etkili vektör, optimal dozaj rejimlerinin olmaması ve yan etkinin belirlenmesi gibi birkaç zorluk aşılmalıdır. Sonuç olarak, ncRNA, KK için potansiyel bir tedavi oluşturmadan önce, genom düzenleme için yeni etkili ve kararlı stratejilerin yanı sıra daha verimli ve daha az toksik gen terapisi verme sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

2.2.4. Kolon Kanserinde Modern Yönler

Kanser araştırmalarının son on yılında, normal hücrelerin giderek neoplastik duruma gelmesi sırasında altı biyolojik özellik kazandığı gözlenmiştir. Aslında, tümörler sadece çoğalan hücrelerden oluşan adacık şeklindeki kitleler değildir ve genellikle embriyonik hücrelerle kıyaslanırlar. Birbirleriyle etkileşime giren çoklu hücre tiplerinin kompleks dokuları olarak görülürler. KK için hücreler, normal kolonik epitelin bir adenomatöz ara

ürüne ve bir adenokarsinomaya dönüşümü ile başlayan, "adenom-karsinom dizisi" olarak adlandırılan düzenli bir olay dizisi geliştirir. Neoplastik duruma geliş genomik bir istikrarsızlık gerektirir. Bir tümör tarafından edinilen altı biyolojik yetenek, proliferatif sinyal vermenin sürdürülmesi, büyümeyi baskılayıcılardan kaçınma, istilanın ve metastazın aktive edilmesi, replikatif ölümsüzlüğün sağlanması, anjiyogenezin indüklenmesi ve hücre ölümüne direnilmesini içerir (79). Bu yeteneklerden bazıları, sinyalleşme süreçleriyle doğrudan ilişkili olan nodlardan veya kontrol noktalarında meydana gelen değişikliklerden dolayı elde edilmektedir. Bu nedenle, kanseri önlemek için bu sinyalizasyon süreçlerini incelemek çok önemlidir. Normal dokular, hücre döngüsüne giriş ve hücre döngüsü boyunca ilerleme kaydeden büyüme teşvik eden sinyallerin üretilmesi ve serbest bırakılması yoluyla proliferasyon yeteneğini kontrol eder. Hücre döngüsü, hücre büyümesiyle ve iki hücreye bölünmeyle sonuçlanan olayların düzenli bir kümesidir. Bölünmeyen hücreler (G0 veya dinlenme fazı) hücre döngüsü içinde sayılmaz. Dolayısıyla, hücre döngüsü G1-S-G2-M aşamalarını içerir. G0, G1 ve G2 aşamaları, "Gap 0", "Gap 1" ve "Gap 2" aşamalarını kapsar; burada hücrede görünür herhangi bir değişiklik gözlemlenmez. S evresi "sentez" ibaresidir ve DNA replikasyonu meydana geldiğinde bu aşamadır. G1, S ve G2 beraber interfaz olarak bilinir. M evresi "mitoz" anlamına gelir ve bu aşamada nükleer kromozomlar ayrılır ve sitoplazmik bölünme (sitokinezis) oluşur. Mitoz ayrıca 4 faza ayrılır: profaz, metafaz, anafaz ve telofaz. Sitokinezis, sitoplazmanın iki hücreye ayrıldığı doğrudan mitozu takip eden bir olaydır. Hücre döngüsü, siklinlerin ve siklin bağımlı kinazların (CDK'ler) beraber çalışmasıyla düzenlenir. Üç kontrol noktası hücre döngüsünü kontrol eder ve hücre proliferasyonuna izin verir. G fazının sonu ve S fazı öncesinde yer alan G1 (kısıtlama) kontrol noktası, hücrenin bölünmesinin, bölmenin gecikmesinin ya da bir dinlenme durumuna (G0) girip girmeyeceğinin karar verildiği aşamadır. G fazının sonunda bulunan G2 kontrol noktası M fazının başlatılmasını tetikler. Son olarak, mitozun metafaz aşamasında metafaz kontrol noktası (mitotik iğ kontrol noktası olarak da adlandırılır) oluşur. Hücre döngüsü kontrol noktalarında bir kusur, DNA hasarı veya bozulmuş bir mutasyon genomik istikrarsızlığa neden olur. CRC'nin moleküler kökeni nispeten iyi tanımlanmış ve CRC progresyonunda genomik istikrarsızlığın altta yatan üç ayrı ve belirgin yolları olan kromozom instabilitesi (CIN), mikrosatellit istikrarsızlığı (MSI) ve CpG adası metilator fenotipi (CIMP) gibi genetik mutasyonların birikimi ile kuvvetli bir şekilde ilişkilidir (80). İnsanda solid tümörlerin (CRC'nin %85'inde) çoğunda görülen bir fenotip olan CIN'in sonucu, kromozom sayısındaki (anöploidi) bir dengesizlik, subkromozomal genomik amplifikasyon ve yüksek heterozigotluk kaybı sıklığıdır (LOH). CIN-pozitif bir tümörü tanımlayan nicel bir kriter bilinmemektedir ve

CIN'i ölçmek için yapılan sitometri, karyotipleme, heterozigotluk kaybı analizi, floresan in-situ hibridizasyon ve genomik hibridizasyonu içeren yaklaşımlar, CIN-pozitif tümörler için CIN-yüksek ve CIN-düşük yeni alt kategorilerini önermektedir. MSI fenotipi (CRC'nin %15'i) nükleotid seviyesinde, çoğunlukla tekrarlayan mikrosatellit sekanslarında artan mutasyon oranı ve büyük kromozomal sapmaların olmaması ile karakterizedir. MSI'nın sonucu, DNA onarım sistemindeki bir kusur nedeniyle onarılamayan DNA mikrosatellitlerinin uzantılarındaki dengesizliktir. CIMP, CpG adalarının hipermetilasyonuna bağlı olarak bir gen susturma işleminden oluşur. Üç olayın tanımları tek olmadığından, bir tümör farklı yollar ve MSI kolorektal kanserlerinin %25 kadarı kromozomal anormallikler gösterebilir (17).

2.2.4.1. Kromozom İnstabilitesi (CIN)

Kromozom instabilitesi (CIN) KK'nın çoğunda (yaklaşık %85) bulunur. *Saccharomyces Cerevisiae*'de 100'den fazla gen CIN'e neden olsa da, insan tümörlerinde bu sayı sınırlıdır. CIN yolağının, büyük oranda, onkogenler ve tümör süpresör genlerindeki mutasyonel olaylar tarafından yönlendirildiği düşünülmektedir. CIN, hücrelerin sürekli olarak kromozomları veya kromozomların bir bölümünü kazandığı veya kaybettiği dinamik bir durumu açıklar (81). CIN tümörleri hem sayısal (nCIN) hem yapısal (sCIN) kromozom değişiklikleri içerir. Sayısal CIN (nCIN), tüm kromozomların kazanılması ya da kaybına bağlıdır ve bu nedenle $2n$ 'den farklı kromozom numarası olmasıdır. Bu nedenle, kromozom sayısının saptanmasına dayanan bazı yöntemler CIN bulmak için kullanılmıştır. Bununla birlikte, anormal kromozom sayısını ifade eden anöploidi CIN ile eş anlamlı değildir, ancak CIN anöploidinin ana nedenidir. Dolayısıyla, anöploidiyi esas alan CIN belirleme yöntemlerine dikkat edilmelidir. nCIN için moleküler mekanizmalar, mitotik kontrol noktasının zayıflamasını, anormal kardeş kromatid kohezyonunu, sentromer amplifikasyonunu ve kromozomların mitotik iplikçiğe yanlış bağlanmasını içerir (81).

Yapısal CIN (sCIN), yapısal anormal kromozomların oluşum hızındaki artışa denir. sCIN ile ilişkili anahtar bir özellik, kromozom kırıklarından sonra "reaktif" kromozomların oluşmasıdır. Bu "reaktif" kromozomlar, genomik yeniden düzenlemeleri artırabilecek kırılma-füzyon-köprüsü (BFB) döngüleriyle sonuçlanır (82). BFB siklusları sCIN ve tümör içi heterojenite ile ilişkilidir. sCIN için üç moleküler mekanizma tanımlanmıştır: telomer işlev bozukluğu, kırılma bölgeleri ve anormal DNA onarım yolları. Mitoz sırasında, çoğaltılan

kromatid çiftlerinin her iki kopyası, mikrotübül tabanlı mitotik iplikçikler içinde kinetokor'ları (merkezi sıkışmanın yerinde bulunan sentromere monte edilen büyük protein kompleksleri) aracılığıyla karşı kutuplara bağlanırlar. İki yönlüleştirme denilen bu süreç diploid özelliği korumak için gereklidir (83). Aslında, doğru bir iki yönlüleşme elde etmek için, doğru bir mitotik iğ kontrol noktası önemlidir. Mitotik kontrol noktası kompleksi (MCC), BubR1 (BUB1B geninin ürünü), Bub3, Mad2 ve Cdc20 tarafından oluşturulan bir protein kompleksinden oluşur (84). Anafaz teşvik eden kompleks/siklozom (APCC), proteazom tarafından hedeflenip yok edilmesi için çeşitli substratların (örn. Securin ve Siklin B) poliubikuitinasyon işlemini gerçekleştirir. Bu APCC kompleksi Cdc20 tarafından aktive edilir, ancak Cdc20 sıkıca MCC'ye bağlı olduğu için APCC aktif olmaz ve Securin ve Siklin B korunur. Securin, sentromerde kardeş kromatidleri bir arada tutan bağlayıcı molekülleri kesen, kaspaz-benzeri proteaz olan Separase'ın bir inhibitörüdür. Siklin B, büyük mitotik kinaz Cdk1'in (siklin bağımlı kinaz 1'in) aktivatörüdür ve Siklin B'nin tahrip edilmesi, Cdk1'i inaktive eder ve mitotik çıkışa neden olur. BubR1, MMC'nin bir parçasıdır, ancak substrat erişimini bloke ederek APCC'yi inhibe ettiği düşünülmektedir. Bub1, sırayla, fosforilasyon ve Cdc20 nin inaktivasyonu ile APC'nin inhibisyonuna katılır. Bub3, bağlanmamış kinetokora hem BubR1 hem de Bub1'i toplar (85). Bu kontrol noktası sinyalizasyonuna katılmak için başka birçok protein önerilmiştir. Bunlardan bir tanesi, yüksek ökaryotlarda kinetokor-mikrotübül etkileşimlerinin düzenlenmesinde önemli bir rolü olan bir protein kinazı olan Aurora B'dir. Bir başka protein olan retinoblastoma (RB) tümör süpresörü de CIN ile ilişkilendirilmiştir. RB tümör baskılayıcı, hücrelerin G0/G1'de hücre döngüsüne girme veya çıkma kabiliyetini kontrol ederek kanseri önlediği düşünülen hücresel bir yolağın düzenleyicisidir (86).

Son zamanlarda, RB, p107 ve p130 gibi aile üyeleri ve bunların ortakları olan E2F transkripsiyon faktör ailesinin, hücre döngüsünün G1/S geçişinin yanında mitoz geçişinde ve DNA replikasyonu sırasında önemli hücresel fonksiyonlara sahip olabileceğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır. CIN, karyotipleme, DNA içerikli flow sitometri (FCM), interfaz floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve bu preneoplastik lezyonlarda nümerik ve yapısal kromozom anormalliklerinin saptanmasına izin veren karşılaştırmalı genom hibridizasyonu (CGH) DNA kaybı ve kazancının saptanması da dahil olmak üzere çeşitli tekniklerle incelenmiştir (81). CRC çalışmaları, özellikle 7, 13 ve 20 numaralı kromozom kazançlarının, 18 numaralı kromozomun kayıplarının ve 1p'nin silinmesinin kanıtlarını getirdi. CIN moleküler mekanizmasının hücre döngüsü mitotik kontrol noktası gen mutasyonları, telomer

fonksiyon bozuklukları, mikrotübül dinamik instabilitesi, kinetokor yapısı ve fonksiyonu, kromozom yoğunlaşması ve kardeş-kromatid kohezyonu ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Genom bütünlüğünü ve CIN'i izlediği bildirilen genler arasında, TP53 inaktivasyonu, telomerlerin disfonksiyonuyla bağlantılı olarak, en önemli itici güçlerden biri olarak öne sürülmüştür. Bununla birlikte, TP53'ün inaktivasyonu, kolorektal adenomalarda nadirdir (87). Nadiren mutasyon geçiren mitotik genlerin araştırılmasına ek olarak, RB1, MYC, CCDN1 ve CCNE1 gibi diğer hücre döngüsü evrelerinde bulunan genlerin de, hücre döngüsü ilerlemesini ve mitotik kontrolü ayırarak CIN'e yol açtığı araştırılmıştır. KRAS ve APC mutasyonlarının da CIN'de rolü olduğu öne sürülmüştür (81).

2.2.4.2. Mikrosatellitlerin Kararsızlıkları (MSI)

MSI yolu CRC'de CIN kadar (yaklaşık %15) yaygın değildir, ancak DNA Tamir (MMR) sistemindeki bir kusurdan ötürü oluşan HNPCC veya Lynch sendromundan etkilenen ailelerin tespiti için son derece yararlı bir tarama aracıdır. MSI'ler, özellikle DNA replikasyonuna yatkın olan mikrosatellitlerdeki insersiyon ve silinme mutasyonlarıdır. Mikrosatellitler, genomda tek bir nükleotid (mononükleotid) veya iki veya daha fazla nükleotid (di, tri, tetra, pentanükleotid vb.) birimlerinin tekrarlandığı DNA dizilerinin uzantıları olarak tanımlanır. Yüzlerce kadarıyla tekrarlanan birimler aynı zamanda mikrosatellitler şeklinde sınıflandırılmıştır; bu da, mikrosatellitin uzunluğunun çok değişken olabileceğini göstermektedir (88). İnsan genomunda ya intergenik ya da kodlamayan bölgelerde (fonksiyonel önemi bilinmeyen) ve gen kodlama bölgelerinde (kodlayıcı mikrosatellitler, cMS) en az 500.000 mikrosatellit bulunmaktadır. Genellikle genlerin intronlarında bulunurlar, ancak promotörlerde, çevrilmemiş terminal bölgelerde ve kodlayıcı ekzonlarda çok sayıda mikrosatellit örneği vardır. CMS'deki ekleme veya silinmeler, erken sonlanmış ve dolayısıyla aktif olmayan proteinin üretilmesine neden olur. MSI ile CRC'de mutasyon hedefi olan kodlayıcı tekrarları içeren genlerin örnekleri: DNA onarımı (RAD50, MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, BLM, PMS2), apoptoz (APAF1, BAX, BCL10, Kaspaz-5), sinyal transdüksiyonu (TGF β RII, ACTRII, IGFIIR, WISP-3), hücre döngüsü (PTEN, RIZ) ve transkripsiyon faktörleri (TCF-4) (89). MSI için standart bir test, 1997'de Ulusal Kanseri Enstitüsü'nde (NCI) önerildi, ayrıca Bethesda paneli olarak da bilinir. Bu, iki mononükleotit tekrarından (BAT25, BAT26) ve üç dinükleotid tekrarından (D2S123, D5S346, D17S250) oluşan bir paneldir (90). Bu paneli kullanarak, istikrarsızlık, beş Bethesda panelinde

istikrarsızlık ile üst seviye MSI (MSI-H) ve beş Bethesda panelden yalnızca birinde istikrarsızlığa sahip düşük seviyeli MSI (MSI-L) olarak sınıflandırılabilir. Neredeyse tüm MSI-H tümörleri MMR hasarlıyken, MSI-L tümörlerin çoğunda MMR defekti yoktur. MSI için tanısıl MSI taramasında Afrika popülasyonunun yaklaşık yüzde 10'unda yanlış pozitiflere yol açabilecek polimorfizm nedeniyle tek başına BAT26 kullanılması tavsiye edilmez. Bu nedenle, Suraweera vd. mono-nükleotid tekrarlarını BAT25, BAT26, NR21, NR22 ve NR24'ten oluşan MSI taraması için yeni bir beş işaretleyici veya pentaplex panel önerdi (91). İki markırın (BAT26 ve NR24) aynı anda değerlendirilmesinin MSI'nın teşhisi için pentaplex paneli kadar etkili olduğu gösterilmesine rağmen Pentaplex testi ticari olarak mevcuttur ve laboratuvarlarda birkaç yıldır kullanılmaktadır. MSI-H fenotipi, sporadik CRC'nin yaklaşık %15'inde ve kalıtsal kansere predispozan Lynch sendromlu bireylerde gelişen tüm CRC'de gözlenir (92).

2.2.4.3. CpG Adası Metilatör Fenotipi (CIMP)

CIMP, CpG adalarının hipermetilasyonuna bağlı olarak bir gen susturma işleminden oluşur (93). CpG adaları, sıklıkla CG dinükleotidlerini yüksek miktarda içeren genlerin transkripsiyon başlangıç alanının proksimalinde bulunan nükleik asit bölgeleridir. Tümör hücrelerinde CIMP'nin moleküler belirleyicileri henüz açığa kavuşturulmamış olmakla birlikte, en iyi anlaşılan bileşen, artan bir tümör süpresör ve aday tümör baskılayıcı genlerin bir listesinin transkripsiyonel baskılanmasıdır. Bu bastırma, genellikle bu genlerin promotör bölgelerinde bulunan, CpG adaları adı verilen, sitozin ve guanin bakımından zengin bölgelerin bazı sitozin kalıntılarında nükleik asidin anormal metilasyonu ile ilişkilidir(94). Çoğu memeli geninde, bu CpG bölgeleri normal olarak metilasyondan arındırılmış durumda tutulur veya epigenetik mekanizma normal hücresel süreçlerde gen transkripsiyonunu baskılayabilir. Bununla birlikte, kanser hücrelerinde, çeşitli tümör baskılayıcı genlerdeki CpG adaları, sıklıkla yoğun metilasyona uğrar ve bu da transkripsiyon baskılamasına neden olur. Bu "susturma" mekanizması ile kanser hücresindeki tümör süpresör genlerin ekspresyonu azaltılabilir veya yok edilebilir. Özellikle hipermetillenmiş (gen susturulması ile sonuçlanan) veya hipometillenmiş (transkripsiyonun artmasıyla sonuçlanan) genlerin tanımlanması, tümörün başlatılması ve ilerlemesi için önemli olan yeni faktörlerin keşfedilmesine yol açabilir. Özellikle önem taşıyan şey genlerin tanımlanması, sessizleşmenin hücrelere sağkalım fayda sağlaması, neoplastik fenotipe katkıda bulunması ve ek genetik ve/veya epigenetik

etkilerin biriktirilmesine izin vererek tümör ilerlemesini kolaylaştırmasıdır. Genom metilasyon modelleri, risk değerlendirmesi, prognozun erken tespiti ve izlenmesi için ve tedaviye yanıt veya duyarlılığın göstergesi olarak tümör tipi biyolojik belirteç olarak geliştirilmektedir (95).

MikroRNA'ların kanserde onkogenler veya tümör baskılayan genler gibi davrandığı gösterilmiştir. İnsan kanserinde promotör CpG adası hipermetilasyonuna giren varsayılan büyüme-inhibe edici fonksiyonları olan mikro RNA'ların (miRNA'ların) sayısı hızla artıyor ve daha ayrıntılı biyolojik incelemeler gerekiyor. Onkogenik fonksiyonlu miR-155, DNA uyumsuzluğunun temel bileşenleri olan MLH1, MLH2 ve MSH6'nın spesifik ekspresyonlarının baskılanmasıyla gösterilmiştir ve nonpolipozisli kolorektal kanserin (HNPCC) patogeneğinde rol oynar. MiR-373'ün ayrıca, kolon kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde onkogenik etkinliğe sahip olduğu öne sürülmüştür. MiR-34 ailesi, birçok kanser türünde önemli tümör baskılayıcı olarak işlev gören başka bir gruptur. Bu ailedeki miRNA'ların tümör süpresör fonksiyonu, Bcl-2, siklin D1, siklin E2, CDK4, CDK6, c-MYC, E2F3, MET, MYCN, Notch ve SIRT1 dâhil olmak üzere apoptoz ve hücre döngüsü kontrol yollarındaki birden fazla hedefin ekspresyonunda azalma yoluyla da belirlenir (96, 97).

2.3. KK Oluşumu ve Kanser Kök Hücreleri (KKH) ile İlişkili Yolaklar

Wnt, Notch, Hedgehog, fibroblast growth factor, TGF- β , SHH, EGF ve BMP otokrin veya parakrin sinyal yolları ile KH'nin kontrolsüz çoğalmasını ve kanser oluşturmalarını sağlar (98, 99). Bu yollar hem normal hücrelerin hem de KH'nin kendilerini yenilemesini düzenler (100). Bu sinyal ağları doku homeostazisinden sorumludur. Özellikle onkogenik fenotiple çok yakından ilişkili olan Wnt yolağı hücre gelişimi ve kök hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynuyor (99). Normal bağırsak KH'nin önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilen Wnt yolağı, KKH'ın düzenleyicisi olarak da tespit edilmiştir (101, 102). Kolorektal kanserlerin %90'ı Wnt yolağını aktiflenmesinden sorumlu β -katenin ve APC mutasyonları içermektedir (102).

2.3.1. Wnt-β-Katenin Yolağı

Wnt isminin kökeni, en iyi karakterize edilen Wnt geni olan *Drosophila melanogaster*'deki kanatsızdan gelir. Wnt/β-katenin sinyal yolunun belirgin şekilde aktivasyonu, KK'nın çoğunun oluşumunda gerekli başlangıç olayıdır. Wnt/β-katenin sinyal yolağının hücre içi bileşenleri APC, CTNNB1 (β-katenin kodlama geni) ve Axin2 genlerinin mutasyonları, KK için önemli katkıda bulunan faktörlerdir (103). Adenomatöz polipozis koloninin (APC) fonksiyon kaybı, FAP ve %90 sporadik kolorektal kanserden sorumludur. Wnt'ler hücre çoğalması ve farklılaşmasının güçlü düzenleyicileridir ve kanonik sinyal yolu, gen transkripsiyonuna doğrudan katılan proteinleri içerir. Ana oyuncu, β-katenin olup, iki saatlik Wnt inkübasyonundan sonra biriken bir transkripsiyon faktörüdür. On dokuz Wnt geni memeli genomlarında mevcuttur ve işlevlerinin çeşitliliği, birkaç gelişimsel anormalliklere neden olan mutasyonlar ile örneklenmektedir. Wnt'ler bir sistein üzerinde palmitoillenmiş salgılanan proteinlerdir (104). Lipid, faaliyetlerinde önemlidir, zira palmitatın enzimatik bir şekilde uzaklaştırılması veya sisteinin yerinde yönlendirilmiş ve doğal bir mutasyonu, Wnt aktivitesinin kaybına yol açar. Sinyalizasyon, frizzled proteinler ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili proteinler 5 veya 6 (LRP5 veya LRP6) isimli iki reseptör molekülüne Wnt ligandının bağlanmasıyla başlatılır. Frizzled proteinler (Fzd reseptörleri), yedi transmembran parçası olan G-protein-çiftli reseptörlerin bir ailesidir. Tüm Frizzled proteinler, hücre dışı alanda 10 değişmeyen aralıklı sisteine (sistein açısından zengin alan, CRD olarak adlandırılır) sahip 120 amino asitten oluşan bir bölge paylaşırlar (104). CRD alanı, Wnt ligand bağlanması için gereklidir ve yeterlidir. Fzd reseptörlerinin on üyesi ondokuz Wnt ile kanonik ve/veya kanonik olmayan Wnt sinyallemesini etkinleştirmek için etkileşime girer. Fzd7 kolorektal kanser gelişiminde ve metastazda önemli rol oynamaktadır. Fzd7 proteini, mutant APC veya CTNNB1'i de içeren kolon kanseri dokuları ve çeşitli kolon kanseri hücre çizgilerinde bol miktarda eksprese edilir. Herbergs vd. 135 primer kolorektal kanserde Fzd7'nin mRNA düzeylerini gerçek zamanlı PCR ile incelemiş ve evre II, III veya IV tümörlerde tümör dışı dokulardan Fzd7 mRNA düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğunu ve daha yüksek Fzd7 ekspresyonu olan hastalarda genel sağkalımın daha kısa olduğunu bulmuşlardır (105). Fzd reseptörleri, Wnt proteinlerine, yalnızca kanonik β-katenin yolunu aktive etmek için düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilgili protein 5 veya 6 (LRP5 veya LRP6) varlığında tepki verebilir (106). Wnt yolağının ana noktası Wnt proteinleri reseptörlerine bağlanmadığında veya Wnt yokluğunda β-katenin APC (adenomatöz polipozis coli), adenomatöz polipozis coli tümör baskılayıcı (Axin2), glikojen sentaz kinaz-3β (GSK3β)

ve kazein kinaz 1 (CK1) içeren bir "yıkım kompleksi" oluşur. Bu "yıkım kompleksi" nin oluşumu β -katenin'in CK1 ve GSK3 β tarafından özellikle de serin-675'te fosforilasyonunu uyarır (107). Fosforile β -katenin, ubiquitin-proteazom sistemi ile β -katenin ubiquinasyon ve bozunumunu hızlandıran, E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir Fbox bileşenini olan β -TrCP (β -transdusin tekrarlarını içeren protein) tarafından fark edilir. Wnt'in üçlü kompleksi (Wnt-Fzd-LRP5/6) oluşturacak reseptörlere bağlanması, β -katenin'in sitoplazmada bozunmaya uğramasına neden olur (108). Dağınık bağdaştırıcı protein (Dsh) aktive edilir ve Dsh ile kompleks oluşturan Axin2'yi iyileştirir (109). Bu kompleksde Dsh aktive edilir ve GSK3 β inhibe edilir. Bu olaylar β -catenin fosforilasyonunu ve dolayısıyla bozulmayı azaltır.

Memeliler, Dsh-1, Dsh-2 ve Dsh-3 diye adlandırılan üç ayrılmış protein içerir. Sirtuin 1 (SIRT1), Dsh ve Wnt sinyalizasyonunu düzenleyen NAD⁺'ya bağımlı bir histon deasetilazdır (110). SIRT1, insan kolorektal kanserinde mikrosatelit istikrarsızlığı ve CpG adası metilatör fenotipi ile ilişkilidir (111). Wnt kanonikal yoluna rağmen, diğer birçok Wnt kanonikal olmayan yollar vardır, ancak en iyi incelenen iki yol, düzlemsel hücre kutuplaşması (PCP) (veya Wnt / JNK) ve Wnt / Kalsiyum yolağıdır (112). Kolon karsinom hücrelerinde tanımlanan ve kolon karsinom kinaz-4 olarak adlandırılan PTK7 (protein kinaz 7), standart olmayan PCP'de bir Wnt kateteri olarak analiz edilmiştir. Bu yol, mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) ailesine ait olan JNK (c-Jun N-terminal kinaz) ile ilgilidir.

WNT/beta-catenin yolağının KK oluşumunda kritik bir rol oynadığı kabul edilmiştir (113). KK'nın gelişimi, adenomdan karsinomaya sıralı bir ilerleyişi takip eder. Son yirmi yılda, genetik ve moleküler etkileşimlerin keşfedilmesinin artmasıyla kolorektal neoplazi için karsinogenez yolları daha da netleşmektedir. Adenomatöz Polipozis Coli (APC) ve Tümör Protein-53 (TP53) gen mutasyonları KK gelişimi için yaygın bir yoldur (114). Bu yolda KK, genetik değişikliklerin birikiminin bir sonucu olarak kolonik epitelden kaynaklanır. İlk genetik değişiklikler, hücrelerin kendi kendine büyüme sergilediği adenom oluşumuna neden olur. Karsinogenezin ilerleyen seyrinde, bağırsak epitel hücreleri, invazyon ve metastaz potansiyeline kavuşur. Bu genlerin her ikisini de içeren moleküler ve genetik yolları anlamak, gen terapisinin keşfedilmesini sağlayabilir.

2.3.2. Tirozin Kinaz Reseptörleri Yolağı

Pek çok polipeptit büyüme faktörü ve hormonunun reseptörleri tek bir transmembran alana ve içsel bir tirozin kinaz aktivitesine sahip proteinlerdir. Bu reseptörler, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve fibroblast büyüme faktörü reseptörünü (FGFR) içerir. Bir dimerik reseptör olan insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGFR) de başka bir tirozin kinaz reseptörüdür. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER), ErbB / HER reseptörleri olarak adlandırılan dört ilişkili protein ailesinin bir üyesidir (kuşlarda eritroid lösemi oluşturan kuş eritroblastozis virüsünün v-ErbB onkogenine benzerlikleri nedeniyle). İnsan EGFR'sini kodlayan insan *erbB2* geninin aşırı ekspresyonu (HER2 olarak da bilinir) kanserle ilişkili olduğundan ErbB2 / HER2'nin kanser ile bağlantısı da insanlarda gözlenir (115). Bir büyüme faktörü, tirozin kinaz reseptörünün hücre dışı alanına bağlandığında, komşu reseptörü (otofosforilasyon) birkaç tirozin kalıntısında fosforilleyen başka bir tirozin kinaz reseptörü ile dimerizasyona neden olur. Büyüme faktörü sinyal yolağının sitoplazmik proteinleri tipik olarak SRC proteini ile benzer alanlar içerir ("sarc" olarak telaffuz edilir, "sarkom" için kısaltmadır). Bu alanlara, fosforile tirozine bağlanan SH2 (SRC homoloji 2 alanı) ve poliprolin heliks sekonder yapıya sahip olan bir proteindeki bir bölgeye bağlanan SH3 (SCR homoloji 3 alanı) adı verilir. GRB2, SH2 ve SH3 alanlarını içeren ve bir GTP aktive edici protein (GAP) hücresinde GDP-GTP dönüşümünü sağlayan bir guanin değişim faktörü (GEF) ile reseptör arasında bir köprü oluşturabilen bir proteindir. SOS (son of sevenless) ana Ras GTPaz aktive edici proteindir (RasGAP). Böylece, SOS, Ras'ı harekete geçirir. İnsanlarda üç farklı Ras geni vardır: H-Ras, N-Ras ve K-Ras. Tüm insan tümörlerinin yaklaşık %30'unda mutasyona uğramış Ras onkojenleri eksprese eden hücreler bulunur. GTP'ye bağlı olduğunda Ras, mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadını tetikleyen bir serin / treonin protein kinaz ailesini uyarır. Bu basamaklar, başlangıç Ras-aktif kinaz RAF-1, mitojen-aktif protein kinaz kinaz kinazı (Mitogen-activated protein kinase kinase); MEK, ara bir mitojenle aktive protein kinaz kinaz; sitozol ve çekirdekte çoklu hedef proteinleri fosforile eden mitojenle aktive olan bir protein kinazı olan ERK'i içerir (116). Çekirdekte ERK, bir transkripsiyon faktörü olan Elk-1'i fosforile eder ve bu da birkaç geni aktive eder. Diğer mitojenle aktive protein kinaz (JNK, c-Jun Nterminal kinaz), çekirdekte başka bir transkripsiyon faktörü olan c-Jun'u fosforiller. RAF-MEK-ERK ve MAPKKK-MKK-JNK'ya rağmen Ras, PI3 K-PDK-AKT-mTOR kaskadını, TIAM1-Rac-Rho

kaskadını ve Ral-PLD'yi, TIAM-Rac-Rho'yu ve TBK1-NFκB kaskadlarını aktive edebilir (117).

PI3K-PDK-AKT-mTOR, kanserde aktive olan EGFR'nin aşağı doğru bir hedefidir. Fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K), PIP2'yi PIP3'e fosforile eder. Tümör süpresör geni PTEN (fosfat ve tensin homologu), PI3K sinyalinin hiperaktivasyonu ile AKT'nin aktivasyonunu inhibe etmek için PIP3'ü defosforile ederek PI3 K / AKT sinyal yolunu antagonize eder. Nihai ürün olan mTOR (rapamisin'in memelilerdeki hedefi), DNA hasarı üretir (118). Tirozin kinaz reseptörleri, büyüme faktörünün mevcudiyetinde yolağı tetikler, ancak mutasyona uğramış tirozin kinaz reseptör genleri, büyüme faktörünün yokluğunda tirozin kinaz aktivitesi ile kesilmiş reseptörleri ifade edebilen onkogenlere dönüşebilir. Aktivitenin sonlandırılması, reseptörün ve büyüme faktörünün endositozla hücre içine alınmasını, ardından onkoprotein için uygulanmayan lizozomlarda bir bozulmayı içerir. Birçok onkojen, reseptör olmayan protein kinazları ve GTP bağlayıcı proteinleri de içeren bu sinyal iletiminin birkaç üyesini kodlar (119). Reseptör olmayan protein kinazlar iki tiptir: tirozin kinazlar (örneğin ABL, LCK ve SRC) ve serin ve treonin kinazlar (örneğin AKT, RAF1, MOS ve PIM1). Sinyal transdüksiyonunda yer alan proteinler aktive edici mutasyonlar taşıyorsa onkogenik hale gelirler. Önemli örnekler: PI3K, AKT ve SGK.

2.3.3. TGF-β Yolağı

Transforming büyüme faktörü-β (TGF-β) intrinsik bir serin/treonin kinaz aktivitesine sahip bir reseptöre sahiptir. TβRI (bir glisin/serin zengin alanlı) ve bir TβRII (bağımsız olarak TGF-β'yı bağlayabilen) iki reseptör türü tanımlanmıştır. TGF-β, TβRII'ye bağlandığında, bir TβRI işe alınır ve glisin/serin açısından zengin alan, fosforile edilir. Fosforile TβRI, SMAD adlı bir gen regülatör proteini alır ve fosforile eder. Defosforile edilmiş durumda, SMAD katlanmış bir yapıdadır ve DNA'ya bağlanamaz. Ancak fosforillendiğinde oluşan form, diğer SMAD ile dimerik kompleksler oluşturarak çekirdeğe geçer ve birkaç gen transkripsiyonunu modüle etmek için diğer gen düzenleyici proteinlerle etkileşime neden olur(120).

Kemik Morfogenik Proteinler (BMP) bağırsak KH'nı farklılaşmasını etkileyen TGF-β ailesine ait çok fonksiyonlu büyüme faktörleridir. Wnt üzerinden etkisini göstermektedirler (121).

2.3.4. Apoptotik Yolaklar

Proliferatif sinyaller ve büyüme baskılayıcılarından kaçınma, kısaca yukarıda tarif edildiği gibi hücre döngüsü ile ilgili kanser yetenekleriyse, ölümsüzlüğü sağlama ve hücre ölümüne direnme de apoptoz ile ilgili yeteneklerdendir. Programlanmış bir hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, mitokondriyal zar potansiyelindeki değişiklikler, kaspazların aktivasyonu, DNA parçalanması, membran hasarı ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi birçok morfolojik değişiklik ile karakterizedir. Apoptoz, Bcl-2-benzeri (B-cell lymphoma 2-like) proteinleri olan Bak (Bcl-2 homolog antagonist katil) ve Bad (Bcl-2 benzeri antagonist katil) tarafından dış mitokondriyal membranlarda üretilen gözenekler yoluyla sitokrom c'nin ekstrüzyonuyla etkinleştirilebilir. İnsanlarda, (i) Bcl-2 ve Bcl-XL gibi antiapoptotik proteinler, (ii) Bax (Bcl-2 ilişkili x proteini) ve Bak gibi proapoptotik gözenek oluşturuç proteinler ve (iii) Bid, Bad, PUMA ve Noxa gibi pro-apoptotik kolaylaştırıcı proteinler olmak üzere yaklaşık 24 adet Bcl2 benzeri protein bulunur. Mitokondrinin dışında, sitokrom c apoptozu oluşturmak için Apaf1'e (apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) ve prokaspaz 9'a bağlanır. Transkripsiyon faktörü p53 DNA hasarı ile apoptozun önemli bir uyarıcısıdır. Bir E3 ligaz olan Mdm2, p53'e bağlanan ve proteazomlar tarafından poliübiquitinasyon ve bozunmayı arttıran, düşük p53 konsantrasyonunu koruyan bir ubikuitinaz yolağıdır. P53'ün protein kinazlar (ATM, ATR ve diğer DNA protein kinazları (DNA-PK'ler) gibi) tarafından fosforilasyonu Mdm2'nin bağlanmasını engeller ve p53'ün aktivitesini artırır (122). Myc ve E2F gibi bazı transkripsiyon faktörleri, Mdm2'ye bağlanan ve p53'ün bozunmasını önleyen Arf proteinin sentezini artırır.

2.3.5. Hedgehog Yolağı

Kolorektal kanserde Hh ve Wnt- β -catenin yolakları nadiren bir arada olsalar da, Hedgehog (Hh) yolağının harekete geçirilmesi de KK gelişiminde rol oynuyor gibi görünmektedir. Aslında, çeşitli çalışmalar Hh sinyal bileşenlerinin Wnt sinyalini olumsuz şekilde düzenlediğini göstermektedir (123). RT-PCR ile çeşitli kolon hücre kültürlerinde Hh yolağı (SHH, IHH, PTCH, SMO, GLI1, GLI2, GLI3, SUFU ve HHIP) ile ilgili birçok genin analizi bu yolağın kolonda bulunmadığını göstermektedir (124). Hedgehog (Hh) geni ilk olarak meyve sineği *Drosophila*'nın genetik analizi ile tanımlandı ve Desert Hedgehog (DHH), Hint Hedgehog (IHH) ve Sonic Hedgehog (SHH) olarak adlandırılan üç homolog Hh

geni omurgalılarda tespit edildi. Hh sinyali, gastrointestinal sistem gelişiminde doku morfogenez ve organ oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Hh yolağının bozulması çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir. Hh, Patched (PTCH1) 'e bağlanır, bu da içselleşme ve parçalanmaya neden olur. Hedgehog yokluğunda PTCH1 Smoothed (SMO) ile kompleks oluşturur. Hh-PTCH1'in içeri alınması SMO'yu serbest bırakır, bunun sonucunda glioma ile ilişkili onkogen (GLI) çinko parmak ailesi transkripsiyon faktörleri aktive olur (125).

2.3.6. Notch Yolağı

Bağırsak KH'nin düzenlenmesinde görevli diğer sinyal yolağı Notch'dur (126). Notch ise hücre farklılaşmasında ve kaderinde rol oynayan, doku homeostazisini sağlayan ve epitelyal-mezenkimal dönüşümde (EMT) yer alan önemli bir sinyal yolağını oluşturur (127). KK ve kolon KKH'de Notch-1 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (128, 129).

2.4. Kolon Polipleri

Polip, içi boş bir viskusun lümenine çıkıntı yapan herhangi bir kitle olarak tanımlanır. Bir kolorektal polip kolonun veya rektumun astarında oluşan bir poliptir (etli büyüme). Kolonoskopik görünümüne göre saplı (pedünküllü) ya da sapsız (sessile) olarak ikiye ayrılır. Histopatolojik olarak ise neoplastik (adenomatöz) ya da neoplastik olmayan (hiperplastik, hamartomatöz ve inflamatuvar) şeklinde sınıflanabilir (18).

Neoplastik polipler, kolorektal kanser gelişiminde bir aşamayı temsil eden habis bir potansiyele sahip oldukları için birinci derecede önemlidir. Bu nedenle, kolorektal kanser gelişimini kesip hastalığı ve ölümü önlemek için yeterince erken bir aşamada bu polipleri çıkarmayla ilgili prosedürleri tanımlamak önemlidir. Bir polipte invaziv karsinom ortaya çıktığı zaman, tedavinin yeterliliğinin sağlanması için dikkatli olunması gerekir. Çoğu neoplastik polip kansere dönüşmese de, kolorektal karsinomların çoğunun adenomatöz poliplerden geliştiği kabul edilmektedir; bu dönüşüme yol açan olaylar dizisine “adenomdan karsinoma dönüşüm” denir.

Birden fazla gastrointestinal polip gelişimini teşvik eden sistemik bir sürecin varlığı 'polipozis' olarak adlandırılır. Herediter gastro-intestinal polipozis sendromları tüm kolorektal

kanser vakalarının yaklaşık %1'ini oluşturur ve kolon dışı tümör spektrumu ile ilişkilidir. Bu sendromların erken teşhisi ve doğru sınıflandırılması, kanserin erken tespiti için bir gözetim programı başlatmak için önemlidir. Her biri kendine özel genetik temel, karakteristik polip dağılımı, klinik tablo ve malignite riskine sahip çeşitli polipozis sendromları tanımlanmıştır.

2.4.1. Hiperplastik Polip

Hiperplastik polipler, kolorektal poliplerin en yaygın türüdür. Bir zamanlar ayrı bir varlık olarak görülüyordu, ancak günümüzde diğer alt grupların, SSA'ların ve TSA'ların habis potansiyelini paylaşmayan serrated poliplerin bir alt grubu olduğuna inanılıyor (130). Bu poliplerin genellikle çapı 5 mm'den küçüktür, sapsız ve en sık olarak distal kolondan ve rektumda bulunur. Displazi olmaksızın hiperplazinin histolojik özelliklerini gösterirler; bu nedenle, kanser öncülleri olarak kabul edilmemektedirler. Ne yazık ki, hiperplastik polipler endoskopide adenomatöz poliplerden ayırt edilemez ve bu nedenle sıklıkla çıkarılırlar. Çapı 2 cm'den yüksek hiperplastik polipler, displazi ve malign dejenerasyon riski taşırlar.

Hiperplastik poliplerin çoğu distal kolon ve rektumda bulunur. Bunların malign potansiyeli yoktur, bu da normal dokudan daha olası bir kanser olma ihtimalinin bulunmadığı anlamına gelir. Hiperplastik poliplerin üç histolojik büyüme paterni vardır: mikro-veziküler, goblet hücresi ve müsin zayıf. Hiperplastik polipozis sendromu, Dünya Sağlık Örgütü tarafından aşağıdaki gibi tanımlanan nadir bir durumdur (18).

1. Sigmoid kolona yakın beş veya daha fazla hiperplastik polip, iki polip 10 mm'den daha büyük çapta veya
2. Hiperplastik polipozis sendromuna sahip birinci dereceden akrabası olan bir kişinin sigmoid kolona proksimal herhangi bir sayıda hiperplastik polipinin olması veya
3. Kolon ve rektum boyunca herhangi bir boyutta 30'dan fazla hiperplastik polip olması.

Habis potansiyel göstermediği düşünülse de, kolonun sağ tarafındaki hiperplastik poliplerin malin potansiyel taşıdığı gösterilmiştir. Bu, DNA uyuşmazlığı onarım yollarını etkileyen çoklu mutasyonlarla ortaya çıkar. Replikasyon sırasında böyle DNA mutasyonları tamir edilmez. Bu, sonunda kolonun sağ tarafında polipte malign dönüşüme neden olabilen mikrosatellit instabilitesine yol açar.

2.4.2. Hamartomatöz Polip

Hamartomatöz polipler 'çocukluk polipleri' olarak da bilinirler ve çoğunlukla bağ dokusundan (düz kasa, lamina propria ve inflamatuvar infiltratlar) oluşurlar ve hipertrofik bir epitel ile örtülürler. Makroskopik olarak, bunlar pedünküllü, kiraz kırmızısı, düz poliplerdir ve bazen pedünküllü adenomatöz poliplerden ayırt edilemezler. Hamartomlar sporadik olarak veya polipozis sendromunun bir parçası olarak görülebilir. Bir sporadik hamartomatöz polip genellikle yalnızdır ve erken yaşta ortaya çıkar; % 75'i on yaşından küçük çocuklarda (bundan dolayı 'juvenil' polip adı verilmektedir) ortaya çıkar. Sporadik hamartomatoz polipler genellikle herhangi bir kötü huylu potansiyele sahip değildir. Bununla birlikte, oldukça vaskülarize oldukları için, kanamalara neden olurlar. Intussusepsiyon ve obstrüksiyonla da ortaya çıkabilirler (131).

Bunlar, organlarda oluşan hatalı gelişmeler sonucunda ortaya çıkan tümör benzeri büyümelerdir. Normal olarak dokuların bir karışımından oluşurlar. Bunlar retansiyon kistleri, bol bağ dokusu ve eozinofillerin kronik hücrel infiltrasyonu içeren mukus dolu salgı bezi içerir. Ev sahibi dokunun normal hızında büyürler ve nadiren sıkıştırma gibi problemlere neden olurlar. Hamartomatöz bir lezyonun yaygın bir örneği çilek nevüsüdür. Hamartomatöz polipler genellikle şans eseri bulunur; Peutz-Jegher Sendromu veya Juvenil Polipozis Sendromu gibi sendromlarda ortaya çıkabilir (18).

2.4.3. İnflamatuvar Polip

İnflamatuvar polipler (psödopolip) en sık inflamatuvar bağırsak hastalığı olan (çoğunlukla ülseratif kolit) kişilerde görülür. Ayrıca bir bulaşıcı veya iskemik kolit olayından sonra da ortaya çıkabilirler. Bu lezyonlar gerçek polip değil, daha ziyade deforme olmuş mukozal anatomi ile inflamatuvar infiltrasyon birikimleridir. Bunlar kanser öncesi lezyonlar değildir, ancak kolonoskopik görünüme dayalı adenomatöz poliplerden ayırt edilemezler. Dolayısıyla, onlara biyopsi yapılması önerilir. Genel olarak, semptomatik olmadıkça rezeksiyon yapmak gerekli değildir. İnflamatuvar psödopoliplerin mikroskopik incelenmesi mukoza kaybı alanları ile çevrili, normal, rejenerasyon mukozası adalarını (polip) gösterir. Polipozis, özellikle şiddetli kolitli hastalarda geniş olabilir ve ailesel adenomatöz polipozisi

taklit edebilir. Bunlar, ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi iltihaplanma koşullarıyla ilişkili olan poliplerdir.

Hem benign hem de malin submukozal kolorektal lezyonlar, kolorektal polipler ile karıştırılabilir. Böyle iyi huylu lezyonlar, lipomlar, izole lenfoid nodüller, pnömatozis sistoit intestinalis, hemanjiyomlar, endometriyoz ve diğerlerini içerir. Yanlışlıkla polip olarak tanımlanabilen malign veya malign olmayan lezyonlar, karsinoid tümörler, gastrointestinal stromal tümörler (GIST), lenfomalar, metastazlar ve diğerleridir. Bu lezyonları teşhis etmek önemlidir ve tanı şüpheli vakalarda kolonoskopik biyopsinin lezyonu teşhis edememesi durumunda bilgisayarlı tomografi ile değerlendirmeye devam etmek mümkündür.

Bir rektal lezyon varsa, endorektal ultrasonografi (ERUS) ve ERUS kılavuzluğunda biyopsi ile değerlendirme kullanılabilir.

2.4.4. Neoplastik Polip

Bir neoplazi, hücreleri normal farklılaşmayı kaybetmiş olan bir dokudur. Bunlar iyi huylu veya kötü huylu büyüme olabilir. Habis büyümelerin birincil veya ikincil nedenleri olabilir.

2.4.5. Adenomlar

Neoplastik (adenomatöz) kolorektal polipler mukus salgılayan kolonik epitel hücrelerinden kaynaklanan benign tümörlerdir. Adenomatöz polipler, özellikle batı ülkelerinde yaygındır ve Birleşik Devletlerde 50 yaşın üzerindeki kişilerde tarama kolonoskopilerinin %20-40'ında görülür. Bir yeni seri, adenom oranlarının yaş ve cinsiyete bağlı olduğunu bildirmiştir. 50 yaşın altındaki insanlarda, kadınların %12'si ve erkeklerin %24'ünde tarama kolonoskopisinde adenom bulunmuştur.

80 yaşın üzerindeki kadın ve erkeklerde oranlar sırasıyla %27 ve %40'a yükselmiştir (132). Yeni bir nüfusa dayalı çalışma, tarama kolonoskopisi geçiren asemptomatik hastaların %34.3'ünde en az bir polip tespit edildiğini bulmuştur. Otopsi serisinde prevalans daha da yüksektir ve yaşla birlikte artar. Kolonik adenom bulunan hastaların üçte biri ila bir buçuğu eş

zamanlı kolonik bir lezyona sahiptir. Kolonik adenomların gelişimine katkıda bulunan faktörler çoklu ve belirsizdir; bununla birlikte, genetik yatkınlığın ve çevresel faktörlerin bu süreçte rol oynadığı kabul edilmektedir. Sigara içiminin kolon poliplerinin gelişiminde bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir; diğerleri obezite, kırmızı et alımının yüksekliği ve lif ve kalsiyum alımının düşüklüğüdür.

Tersine, steroid olmayan anti-enflamatuar ilaçlar (NSAID'ler) ve statinlerin kullanımı, koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Anatomik olarak adenomlar kolondaki herhangi bir yerde bulunabilir. Karsinomalara daha yatkın olan geniş adenomlar, karsinomlara benzer bir dağılımda bulunur ve sol kolonik baskınlığı vardır. Klinik olarak, çoğu polip semptomatik değildir ve tarama kolonoskopisinde bulunur. Daha büyük polipler kanayabilir veya kolon lümenini kısmen tıkayabilir; bu nedenle, karın ağrısı, şişme veya bağırsak alışkanlıklarındaki değişim gibi hematokezya (görünür veya okült) veya obstrüktif belirtiler soruşturmayı hızlandırabilir. Salgılı diyare ve hipokalemi (McKittrick-Wheelock sendromu), villöz adenomun nadir görülen klinik tabloları olabilir.

Adenomatöz polipler, histolojik görünümleri ile tübüler, villöz veya tübülövillöz adenomlar olarak sınıflandırılır. Tübüler bir adenom, dallanmış tübüler bezlerin histolojik görünümüne sahiptir. Bu, en yaygın histolojik alt tip olup, çıkarılan tüm poliplerin yaklaşık %65-80'ini oluşturmaktadır. Tübüler adenomlar çoğunlukla pedinküllüdür ve genellikle atipinin derecesi değişken olmakla birlikte, villöz adenomlardan daha az atipi barındırmaktadır. Villöz adenomların mikroskopide uzun, parmak benzeri projeksiyonları vardır. Neoplastik poliplerin sadece %5-10'u villöz adenomlardır. Tübüler adenomlarla karşılaştırıldığında, villöz adenomlar daha sık olarak saplıdır ve şiddetli atipik veya displazi olasılığı daha yüksektir. Tübülövillöz adenomlar, daha önce tartışılan hücresel modellerin her ikisine de sahiptirler. Poliplerin yaklaşık %10-25'i tübülövillöz poliptir. Bir polipte invaziv karsinom insidansı klasik olarak boyutuna ve histolojik türüne bağlı olarak düşünülür. Karsinomun ilgili riskleri 1 cm'den küçük tübüler adenomda %5'ten azdır ve geniş (> 2 cm) villöz adenomda %50'ye erişebilir(131).

Tübülövillöz adenomlar orta derecede risk altındadır (%22). Tanımı gereği, her türde adenom, bir derece anormal glandüler mimari ve hasar gören hücre içi yapılar sergileyen

displazi gösterir. Displazi derecesi çeşitlidir ve daha ağır olursa (yüksek dereceli) malignite riski artar. Aslında, 'yüksek dereceli displazi'(HGD) terimi in situ karsinoma ile eş anlamlıdır. Displazi derecesi genellikle villöz histoloji ve polip boyutu ile korelasyon gösterir.

2.4.5.1. Adenomdan Karsinoma Dönüşüm

Çoğu neoplastik polip kansere dönüşmese de, kolorektal karsinomların çoğunun adenomatöz poliplerden evrimleştiği kabul edilmektedir; bu dönüşüme yol açan olayların dizilimine adenom-karsinom dizisi denir.

Bir neoplastik sürecin oluşumu, üç kategoriye ayrılabilen çoklu kümülatif genetik değişiklikler gerektirir:

- (i) Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşmelerine neden olan mutasyonlar (bunlar, hücre içi sinyal iletiminde rol oynayan genlerin genişmesi ve aktivasyonu büyüme regülatör sinyallerinin anormal iletilmesine neden olur),
- (ii) Tümör süpresör genlerin aktivitesini azaltan mutasyonlar veya delesyonlar,
- (iii) DNA onarımı ile ilgili genlere zarar veren mutasyonlar.

Bu üç mekanizma, kontrolsüz hücre çoğalması, özerk büyüme ve dolayısıyla tümör oluşumuna katkıda bulunur. Neoplastik işlemin, ilk genetik mutasyonların hücre içi ekspresyonuyla birlikte başladığı ve genetik hasar birikmeye devam ettiği sürece neoplastik süreç daha ileri gittiği kabul edilmektedir. Bu süreçte kritik bir husus, neoplastik hücreler, bazal zar içine nüfuz etme ve metastaz yapabilme yeteneği kazandığında ortaya çıkar. Bu noktada bir adenomun bir karsinoma dönüşümü tanımlanmaktadır. Birçok genin, adenom karsinom dönüşümü yoluyla kolorektal kanser gelişiminde rol oynadığı kabul edilmiştir. Bu genlerin her birinin, de-aktivasyonunun (tümör süpresör geni) veya aktivasyonun (proto-onkogen) kritik olduğu belirli bir tümör oluşum aşamasına sahip olduğuna inanılmaktadır. Örneğin, p53 geninin protein ürünü, hasarlı hücrelerin mitotik döngüden geçmesini önlemede bir rolü vardır ve kaybının bir adenomun karsinoma dönüştürülmesine aracılık ettiğine inanılmaktadır. Bir tümör süpresör geninin aktivite kaybının, her iki alleli mutasyona veya silme işlemine tabi tuttuğunu belirtmek gerekir. Bu ilkenin bir göstergesi, kalıtılan sendromlardan birinde bulunabilir; burada bir tümör süpresör gen alelinde kalıtsal bir (germline) mutasyon, bireyin tümör oluşumuna duyarlı olmasına neden olur; sonra ikinci bir (somatik) mutasyon çevresel faktörlerden kaynaklanır ve diğer alel hasarına neden olur. Tümör oluşumu o zaman başlatılır. Bu tür bireylerin, erken yaşta tümörler gelişme eğilimi

vardır. Bu kalıtsal sendromlara bir örnek ailesel adenomatöz polipozis (FAP) olup APC tümör baskılayıcı gen alellerinden birinde bir mutasyonun kolorektal kansere duyarlılığa neden olduğu ailevi adenomatöz polipozisdir.

Adenomdan karsinoma dönüşüm tartışması epigenetik değişikliklerden (DNA metilasyon dahil) ve mikro çevre etkilerinden söz etmeden tamamlanmaz. Adenomun invaziv bir tümöre dönüşme hızı tam olarak bilinmiyor. Çoğu durumda, görünür bir polipin bir karsinom haline gelmesi 5-10 yıl sürdüğü tahmin edilmektedir.

Bağırsağın neoplastik polipleri genellikle iyi huyludur, dolayısıyla adenomlar olarak isimlendirilir. Adenom, tümör glandüler dokusudur ve henüz kanser özelliklerine sahip değildir. Kolonun yaygın adenomaları (kolorektal adenom), tübüler, tübülövilöz, villöz ve sesil serrated (SSA)'dir (18). İsimlerinden anlaşılacağı üzere, SSA ve geleneksel serrated adenomların (TSA'lar) tırtıklı bir görünümü vardır ve hiperplastik poliplerden mikroskopik olarak ayırt edilmesi zor olabilir. Bununla birlikte, bu ayırımı yapmak önemlidir, çünkü SSA ve TSA'lar kanser olma potansiyeline sahiptir, hiperplastik polipler kanser olma potansiyeline sahip değildir(18). Genellikle en büyük yüzey alanına sahip oldukları için, villöz yapı en yüksek malign potansiyel ile ilişkilidir. Bununla birlikte, villöz adenomlar, boyutları birbirine tamamen eşitse, tübüler veya tübülövilöz adenomlara göre kansere dönüşme olasılığı daha yüksek değildir.

Neoplastik poliplerin (NP) KK'ya dönüşme olasılığı olduğundan, erken evrede bu poliplerin tespit edilip çıkarılması KK oluşumunu durdurur. NP mukus salgılayan kolon epitel hücrelerinden köken alan iyi huylu kitlelerdir. NP oluşumu yaş ve cinsiyet ile ilişkilidir(131, 132). Elli yaşın altındaki kolonoskopi taramalarında bayanların %12'sinde erkeklerin %24'ünde adenom saptanmış; seksen yaşın üzerinde ise oranların sırasıyla %27 ve %40'a yükseldiği gözlenmiştir (132). Adenomların gelişimi birçok etkene bağlı ve belirsiz olmasına rağmen, hem genetik hem çevresel faktörlerin rol oynadığı kabul edilmiştir. Sigara içme, obezite, aşırı kırmızı et tüketimi, fiberli gıdaların ve kalsiyumun az tüketilmesi diğer risk faktörleri arasındadır (133-135). Anatomik olarak adenomlar kolonun her yerinde bulunabilir. Karsinoma gelişimine daha yatkın olan büyük adenomlar ağırlıklı olarak sol kolon yerleşimlidirler. Poliplerin çoğu bulgu vermezler ve kolonoskopi taramalarında farkedilirler ama büyük polipler kanayabilir ve kolonu tıkayabilirler.

NP'nin tanısında dışkıda gizli kanama testi (FOBT), dışkı immünokimyasal test, altın standart olan kolonoskopi, kolonoskopik spektroskopi, dar bant görüntüleme, tomografi, MR, kapsül endoskopi, dışkı DNA ve antijen testi kullanılabilir (46, 136-142).

2.5. Kök Hücreler

Kök hücreler (KH) üç gruba ayrılabilir: embriyonik, germinal ve progenitör somatik KH (143). Germinal KH yumurta ve sperm üretiminden sorumludur. Somatik KH hematopoetik, gastrointestinal, mezenkimal, nöral, karaciğer gibi birçok dokuda bulunurlar. KH normal dokuların aksine bölünme sonrasında kendini yenileyebilme kapasitelerini kaybetmezler. Kendilerini yenileme kapasiteleri sınırlı olmasına rağmen normal dokunun yenilenmesinde ve herhangi bir hasar durumunda dokunun tamir edilmesinde çok önemli rolleri vardır (143, 144). Embriyonik kök hücreler(KH) belirli zamanlarda farklı organ ve dokuları oluşturmak için bölünebilir ve farklılaşabilirler. Yetişkin dokudaki KH tamamen kararlı bir durumdadırlar, çevresel uyarı ve etkilerle dokuyu ve organı yenileyebilirler. KKH ise kontrol programlarının ötesinde farklılaşma ve çoğalma özellikleri gösterirler; hayvan deneklerine transplante edildiklerinde kanser dokusu oluşturabilirler(145).

2.5.1. Kanser Kök Hücreleri (KKH) veya Tümör Başlatıcı Hücreler (TIC)

Tümörler farklı yapı ve fonksiyona sahip hücrelerin karışımından oluşan heterojen bir yapıya sahiptirler. Bu heterojen yapının kökeninde ise kanser kök hücrelerinin(KKH) yattığı düşünülmektedir (146, 147). KKH birçok kanserde tümörün başlangıcından, tekrar ortaya çıkmasından, tedavi direncinden, farklılaşmadan, invazyon ve metastazdan sorumlu tutulan kendi kendini yenileyebilme özelliği taşıyan hücrelerdir (148-150). Kanser dokusunda çok küçük miktarda olmalarına rağmen kanser tedavisindeki başarısızlığın en önemli sebeplerinden biri olarak görülmektedirler (150). Bazı çalışmalara göre KKH'ın kemoterapiye direncinde ABC Transporter'in fazla eksprese olması, DNA onarım mekanizmalarının artması ve IL-4 ekspresyonuyla apoptoza direnç gelişmesi sorumlu tutulmaktadır (147, 151, 152). Dolayısıyla kanseri tamamen yok edebilmek için tedavide mutlaka hedefler arasında yer almalılar. İlk önce hematopoetik KKH keşfedildi daha sonra birçok çeşitli kanser türünde KKH'ın varlığı gösterildi (149, 153).

Kendi kendini yenileyebilme özelliğine sahip KKH, tümörü oluşturan farklı hücre hatlarının oluşumundan sorumludur (154). Akut myeloid lösemi ile ilgili eski dönemlerde yapılan çalışmalar kök hücrelere benzer özellikteki kanser hücrelerine dikkat çekmiştir (155). KKH DNA metilasyon çalışmaları KKH'nin normal kök hücrelere değil de embriyonik kök hücrelere benzediğini ortaya çıkarmıştır (156). Benzer gen ekspresyon profiline sahiptirler. Normal, kök hücre veya kanser hücrelerinden köken alabilen KKH ayrıca indüklenmiş pluripotent kök hücrelere (iPSC) de benzemektedirler. Bu bağlamda aslında yeniden programlanmış kanser hücreleri olarak görülebilirler. IPSC ilişkili faktörler KKH için çok önemlidir.

KKH'nin nasıl oluştukları, nereden köken aldıkları hala tartışmalı bir konu. Birinci teori KKH'nin yapı ve fonksiyon olarak normal KH'e benzemesi üzerine kurulduğundan; normal KH'nin çeşitli mutasyonlar ve epigenetik programlama ile KKH'e dönüştüğü düşünülmektedir. İkinci teoride kanser oluşumunu başlatan hücrelerin farklılaşması ve kök hücre özellikleri kazanması yer almakta. Üçüncü teori ise normal hücrelerin yeniden programlama ve dönüşümle malin özellikler kazanması ve daha sonra da kök hücre özellikleri kazanması üzerine kurulmuştur (146).

KKH, kanser tedavi direncinde en önemli faktörlerden biridir(157) Lösemi kök hücrelerinde yapılan bir araştırma, bazı kanser kök hücrelerinin durgun duruma girebileceği konseptini desteklemektedir (158).

Kök hücre benzeri özelliklere sahip, kolon kanserini başlatan hücreler (CCIC) olarak geçen KK hücreleri, yüksek tümörijenik potansiyele sahiptir. CCIC, hücreler heterojeniteyi artırmak için farklılaşabilmesine rağmen, bir tümör içindeki CCIC'nin farklı alt popülasyonları içermesi çok net değildir. Birbirlerini üretmek için asimetrik bölünmeye uğrayabilen, CCIC esnekliğini vurgulayan hızlı ve yavaş döngülü CCIC'nin varlığından bahsetmek gerekir. LGR5 ve CD133 gibi işaretleyicileri ifade eden hızlı döngülü CCIC çoğalmaları için MYC'e bağlıken, BCI1 ve hTERT gibi işaretleyicileri ifade eden yavaş döngülü CCIC MYC'den bağımsızdır. NOTCH sinyal yolağı asimetrik hücre kaderini teşvik eder, bu iki popülasyon arasındaki dengeyi düzenler (159).

2.6. Kök Hücre İlişkili Faktörler (KİF)

2.6.1. OKSMN (OCT4, KLF4, SOX2, MYC ve NANOG)

Embriyonik KH'lara özgü pluripotens faktörleri olan OCT4, SOX2, NANOG ve KLF4'ün KKH'lerde arttığı gözlenmiştir. İndüklenmiş pluripotent kök hücre (iPSC) veya Yamanaka faktörleri olarak da isimlendirilirler. Embriyonik kök hücrelerde tespit edilmiş olan bu faktörler ilk olarak Yamanaka vd.(2006) daha sonra Wernig vd.(2007) tarafından yetişkin hücrelerin pluripotent hücrelere dönüştürülmesinde kullanılmıştır(160, 161).

Yüksek ekspresyonlarının hem insan hem fare somatic hücrelerinde pluripotensiyi uyarması, embriyonik kök hücrelerindeki pluripotensiyi için gerekli gelişimsel sinyal yollarını düzenlediğini göstermektedir (160, 162).

2.6.2. OCT4 (POU5F1)

OCT-3, OCT-3/4, OTF3 veya NF-A3 olarak da bilinen bir transkripsiyon faktörü olan OCT4, POU5F1 geni (insan kromozomu 6'da bulunur) tarafından kodlanır ve POU (Pit, Oct, Unc) DNA bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir. Bu proteinler, hedef genlerin ekspresyonunu, promotörü veya enhansör bölgeleri içindeki oktamer motifi ATGCAAAT'a bağlanarak düzenler. Ekspresyonu kök hücrelerin pluripotent özellikleri ile ilişkilendirilen OCT4, memeli embriyogenezinin erken safhalarını kontrol eden önemli bir faktördür. 25 yıl önce keşfedilen ilk ana gendi ve fare ve primat embriyonik kök hücrelerinin bu özellikleri için kesinlikle ihtiyaç duyuluyordu. Aynı zamanda somatik hücre yeniden programlaması için gerekli olduğu gösterilen bu transkripsiyon faktörü, ifade seviyesine bağlı olarak çeşitli fonksiyonları gösterir ve bir "rheostat" geni olarak alıntılanmıştır. OCT4 proteini birçok farklı ortakla kompleks haldedir ve etkinliği ince post-translasyonel modifikasyonlara bağlıdır(163). OCT4, aynı zamanda, kemoterapi tümör direncinin rekürrens kökeninde yer alan kanser kök hücrelerinin farklı türlerinde tekrar ortaya çıkmaktadır.

OCT4, ES hücrelerinin ve germ hücrelerinin kendi kendini yenileme ve pluripotans özellikleri için zorunlu olan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Bazı somatik kanserlerde OCT4'ü ifade eden nadir hücreler tespit edilmiştir (164). Yamada vd.(2010) bağırsaktaki OCT4 ifadesinin, ES hücrelerinde olduğu gibi hücrelerel farklılaşmayı inhibe ederek displaziye neden olduğunu vurgulamışlardır (165).

Yasuda vd. (2011) ülseratif kolit ilişkili kanserlerde sporadic KK'a göre CD133, OCT4 ve NANOG ekspresyonlarının azaldığını göstermişlerdir(166). Schoenhals vd. (2009) makalelerinde KK'da normal dokuya göre SOX2 ve MYC ekspresyonlarının arttığını, OCT4 ve KLF4 ekspresyonlarının ise artmadığını belirtmişlerdir (167). Xu vd. (2009) mikroRNA-145'in OCT4, SOX2 ve KLF4'ü düzenlediğini ve insan embriyonik kök hücrelerdeki pluripotansı azalttığını bildirmişlerdir (168). Tay vd. (2008)'e göre NANOG, OCT4 ve SOX2 kodlayıcı bölgelerine yönelik mikroRNA'lar, embriyonik kök hücre farklılaşmasını modüle eder (169). Singovski vd. (2015) kolon kanserinde metataz çalışmışlar OCT4, SOX2, KLF4 +/- cMYC ile reprogramlanmış kanserin metastatik özelliğinin arttığını, NANOG ekspresyonunun da arttığını ama LGR5'in azaldığını göstermişlerdir(170). Shi vd. (2012)'e göre indüklenmiş pluripotent kök hücre ile ilgili genler kolorektal kanser hücrelerinin biyolojik davranışlarını ve 5-fluorourasil duyarlılığını etkiler (171). Myazaki vd.(2014) KK hücrelerini mir-302a-d, 369-3p ve 5p ve mir-200c ile enfekte ederek bunları tekrar programlamışlardır. Bu sırada OKSN artışı ve MYC azalması tespit etmişlerdir (172). Oshima vd.(2014) KK hücrelerini tanımlanmış faktörlerle(OKS) uyararak KKH elde etmeyi başarmışlardır (173). Amini vd. (2014) OCT4, SOX2, NANOG ekspresyonlarının KK de arttığını göstermişlerdir (174). Dai vd. (2013) kolorektal kanserde OCT4'ün baskılanmasını hücre göçünü, invazyonu, ke metastazlarını azalttığını belirtmişlerdir (175).

2.6.3. SOX2

SOX2, SOX gen ailesine ait bir transkripsiyon faktörünü kodlayan ve yüksek oranda spesifik DNA bağlanmasına izin veren yüksek mobilite grubu (HMG) alanını içeren bir gendir. Sonuç olarak SOX2, gen transkripsiyonunun bir aktivatörü veya baskılayıcısı olarak işlev görür. SOX2, gerekli bir embriyonik kök hücre geni ve ayrıca indüklenen hücrelerden yeniden programlama için gerekli bir faktör olarak tanımlanmıştır. SOX2 araştırması sadece yakın zamandaki embriyogenezis ve gelişmeden SOX2'nin hastalığındaki işlevi üzerine odaklanmıştır. Özellikle, kanser patogeneğinde SOX2'nin rolü ilgi alanı haline gelmiştir. Çalışmalar, SOX2'nin çeşitli kanser türlerinde çoğaltıldığını ve karmaşık hücre sinyalizasyonunda ve protein-protein etkileşimlerinde kanser hücresi fizyolojisini etkilediğini göstermiştir. Bu alandaki son incelemeler, memeli fizyolojisi, gelişimi ve patolojisinde SOX2'yi vurgulamıştır. Bazı kanser türlerinde prognostik belirteç, metastaz göstergesi, biyolojik belirteç veya potansiyel terapötik hedef olarak SOX2 vurgulanmıştır (176). Çeşitli

gelişimsel kök hücre genleri gibi, bazı insan kanserlerinde SOX2 anormal şekilde eksprese edilir ve çoğaltılır. Dahası, işlevsel çalışmalar, hücre çoğalması, apoptoz, kendini yenileme ve istila gibi birçok biyolojik süreci düzenlediğini göstermiştir. Birçok kanserde onkogenik olmakla birlikte, SOX2 aktivitesi, bazı durumlarda tümör baskılayıcı olarak davranabildiği gastrik kanserde tartışmalıdır. Gastrik kanser biyolojisinde SOX2'nin yer aldığı hakkında bildiklerimize dikkat ederek, kanser biyolojisindeki rolünü tartışacağız (177). SOX2, yalnızca embriyonik, yeniden programlama ve gelişim ile ilgili gerekli bir gen olduğunun yanında; onkoloji alanında da izlerini bırakmaya başladı. SOX2, EGFR sinyal yolağı aracılığıyla hücre çoğalması, hücre apoptoz ve metastaz gibi birçok kanserle ilişkili süreçte karmaşık bir şekilde yer alır. Dahası, mevcut ve sürmekte olan SOX2 KKH araştırması, erken gelişimsel genlerin araştırılmasının önemini vurgulamıştır çünkü KKH'ların kendi kendine yeniden çoğalmasından sorumlu olabilirler. Klinik olarak, SOX2 ekspresyonunun hastanın sağkalımı ve prognozunda etkili olduğu göstermiştir. Kanserdeki SOX2 fonksiyonu, klinikte ve dışında çeşitli kanser türlerinde vurgulanmıştır ve SOX2'nin onkogenik seyrini araştırmak, gelecekteki prognoz, kanser hastalarının hayatta kalması ve muhtemel terapötik müdahaleler için önemlidir.

SOX2, transkripsiyon faktörlerinden SRY ile ilgili HMG-kutusu (SOX) ailesinin bir üyesini kodlayan tek ekzonlu bir gendir. MiRNA-134 ve miRNA-145'ün, ESC'deki kodlama bölgesini hedefleyerek SOX2 ekspresyonunu baskıladığı bildirildi. Otsubo vd. (2011) MicroRNA-126'nın, SOX2 ekspresyonunu önleyerek gastrik karsinogenezise katkıda bulunduğunu belirttiler (178). Kuzmichev vd.(2012) Oct4'ün Cd133 hücrelerini artırdığını LGR5'i etkilemediğini SOX2 nin ise ikisini de uyardığını göstermişlerdir(179). Neumann vd. (2011)'e göre SOX2'nin artmış ekspresyonu, uzak metastazlar ve lenf nodu metastazlarıyla ilişkilidir (180). Fang vd. (2010) KKH'da SOX2 geninin ChIP-seq ve fonksiyonel analizi ve kanserde fazla eksprese olduğu göstermişlerdir (181).

2.6.4. KLF4

SP1 / KLF transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesi olan Kruppel-benzeri faktör 4 (KLF4), karboksil sınırında, hedef DNA ile etkileşimi için çok önemli olan üç adet son derece korunumlu C2H2 tipi çinko parmak motifi ile karakterize edilir. KLF4'ün çoğalma, farklılaşma ve apoptoz kontrolü içine katılımı, KLF4'ün tümörigenezdeki kritik rolü olduğunu gösterir. KLF4, vücudu oluşturan tüm hücre tiplerine yol açabilen pluripotent hücrelere

somatik hücrelerin yeniden programlanmasında önemli bir düzenleyicidir. Çoklu in vitro ve in vivo çalışmalar, çeşitli kanser türlerinde epitelial mezenkimal geçişte (EMT) KLF4'ün inhibe edici rolünü ve EMT sırasında KLF4 ekspresyonunun kaybedilmesinin tümör anjiyogenezi, metastaz ve agresiflik ile ilişkili olduğunu göstermiştir(182).

Kruppel benzeri faktör 4 (KLF4), insanlarda çok çeşitli dokularda eksprese edilen bir transkripsiyon faktörüdür ve normal doku homeostazının gelişimi, farklılaşması ve korunması da dahil olmak üzere birçok farklı fizyolojik süreç için önemlidir (183). KLF4, hedef gene bağlı olarak transkripsiyonu etkinleştiren veya baskılayan bir transkripsiyon faktörüdür. KLF4, ilgili kanser türüne bağlı olarak onkojen veya tümör baskılayıcı olarak işlev görebilir (183). KLF4, ayırt edilen epitelde anti-proliferatif bir faktör olup gastrointestinal kanserlerde tümör baskılayıcı olarak görev yapar (184). KLF4, β -katenin aktivitesini inhibe ederek KK karsinogenezisinde önemli bir yol olan Wnt sinyalizasyonunu inhibe eder (185). KLF4, hücre proliferasyonunun önemli bir düzenleyicisidir ve gastrointestinal sistemin epitel hücrelerinde maksimum seviyede eksprese edilir. KLF4 geninin genetik ve epigenetik değişikliklerle inaktivasyonu kolorektal kanserlerde bildirilmiştir. Choi vd. KLF4 ekspresyonunun kaybının kolorektal kanser için erken bir olay olarak tümör gelişiminde rol oynayabileceğini göstermişlerdir (186).

Shie vd. (2000) KLF4'ün kolon adenomlarında ve kanserinde ekspresyonunun azaldığından bahsetmiştir(187). Choi vd.(2006) da KLF4'ün KK'da azaldığını belirtmişlerdir(186). KK'da miRNA-206 KLF4'ü hedeflemekte ve miR-206'nın zorlu ekspresyonu hücre proliferasyon kinetiğini önemli ölçüde arttırmaktadır (188). KLF4 ekspresyonu kolon kanserinde önemli ölçüde azaltılmıştır (189). Hu vd.(2011) KLF4 ekspresyonunun normal-adenom-kansere gidildikçe arttığını belirtmişlerdir, sadece 7 adet tipi belirtilmemiş adenoma kullanmışlardır (190). KLF4, KK kök hücre zenginleştirilmiş sferoid hücrelerinde onkojen olarak davranır (191). KLF4 ve beta-katenin, normal bağırsak homeostazisini ve tümörün baskılanmasını düzenler (185). KLF4, APC mutasyonu varlığında bağırsak adenomlarının gelişiminin desteklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (192).

2.6.5. MYC

MYC ile ilgili araştırmalar, kanserin genetik temelini bilinmediği bir dönemde başlamıştı. V-gag-myc'in insan homologu keşfedildiğinden beri dört yüzyıl geçti. Çok düzenlenmiş ve çok fonksiyonlu MYC proteininin çalışılmasından elde edilen dersler, hücre

biyolojisi, hücre döngüsü, apoptoz, gelişim, sinyal iletimi, transkripsiyonel ve post-transkripsiyon düzenleyici mekanizmalar, kodlamayan RNA'lar, kök hücre biyolojisi ve kanserin moleküler temelleri gibi geniş bir alanı tarayan araştırmacılar için önemli olduğunu kanıtladı. MYC'in onkojenik aktivasyonu başlangıçta şaşırtıcıydı. O sıralarda tespit edilen, HRAS gibi başka onkojenler, kodlayıcı dizideki mutasyonlarla aktive edilen normal hücresel genlerin versiyonlarıydı. MYC1'de bu mutasyonlar belirgin biçimde yoktu. Bunun yerine, onkojenik aktivasyonun üç yeni mekanizması tanımlandı: eklemeli mutagenез, kromozomal translokasyon ve gen amplifikasyonu (193). Geçtiğimiz on yıl içinde önemli bir gelişme, MYC düzenlenmesinin MYC lokusundaki brüt genetik değişikliklerle sınırlı olmadığı gerçeğidir. MYC, doğrudan veya dolaylı olarak ifade etkinliğini hedefleyen çeşitli mekanizmaların herhangi biri tarafından düzenlenebilir. MYC düzenlenmesinin insan kanseri insidansı üzerindeki etkisinin önceden düşünülenenden daha yüksek olduğunu ve MYC loküsünün translokasyonları ve amplifikasyonlarıyla sınırlı olmadığını ileri sürüldü. MYC'nin regülasyonunu ve onkojenik potansiyelini anlama araştırmalarının ilk on yılı boyunca kaydedilen muazzam gelişmelere rağmen, bu nükleer fosfoprotein fonksiyonu bilinmiyordu. MYC ekspresyonu, hücrenin büyümesiyle ilişkilendirildi ve aşırı ekspresyon, doku kültür hücrelerinin hızla proliferasyonu için serum üzerine azalmış bir bağımlılık kazandırdı. İki popüler model ortaya çıkmıştır: MYC'in doğrudan DNA replikasyonunu düzenlediği veya MYC'in gen transkripsiyonunun düzenleyicisi olarak işlediği. MYC'in replikasyonda önemli bir role sahip olduğuna dair raporlara rağmen, bu ilk sonuçları yeniden üretmek zor olduğundan heyecan yerine hayal kırıklığı geldi. İlginç bir şekilde, son yayınlar DNA replikasyonunda MYC'in rolünün anlaşılmasına ciddi bir ilgi uyandırdı (193). Bununla birlikte, 1980'lerin sonlarında çoğalma üzerine daha ileri çalışmalar, MYC'in gen transkripsiyonunun düzenleyicisi olarak işlev görebileceğine dair güçlü kanıtlarla hızla gölgelendi.

Özelleştirilmiş tanı ve tedavi seviyesinde hasta bakımını iyileştirmek için MYC'i kullanmak zorunludur. Şu anda MYC deregülasyonunun çoklu mekanizmalarından bağımsız olarak onkojenik MYC aktivitesine dayanarak bir transkripsiyon faktörü olarak puanlamak için tanı aracı geliştiren teknolojiye sahibiz. Elbette, birincil insan tümörlerinde MYC ile ilişkili genetik izlerin son zamanlarda tanınması heyecan verici bir gelişmedir, ancak daha fazla test ve doğrulama gereklidir. Deregüle MYC'i barındıran insan kanserlerinin büyük kısmı, onu hedefli tedavi için çekici bir aday yapmaktadır. MYC araştırması sıklıkla, gen düzenlemesi ve işlevi hakkındaki anlayışımızı ilerletmede öncülük ederken, MYC'i kansere karşı mücadelede hedeflemenin gerisinde kaldık. MYC yapısının daha iyi anlaşılması, tedavi

tasarımına yönelik çabaları kuvvetle destekleyecektir. Bir takım anti-MYC terapötik stratejileri halen araştırılmaktadır. Etkili bir MYC tedavi gelişmesi, kanser tedavisinde önemli bir gelişmeyi işaret edebilir. MYC, birçok sinyal iletim yolunun akış güzergâhı olup, birden çok hücre içi ve dışı hücre sinyalini bütünleştiren merkezi bir işlev görür. MYC bu talimatları daha sonra, bir bilgisayarın merkezi işlem birimi gibi işler ve yorumlar. Böyle bir ağ yöneticisi olan MYC, solucanlarda ve mayalarda belirgin değildir ve yüksek organizmalarda önemlidir. Bu merkezi işlem birimi fonksiyonunu moleküler seviyede, ekspresyon, kararlılık, kofaktör bağlanması dahil olmak üzere farklı sayıdaki değişiklikler yoluyla MYC aktivitesini değiştiren post-translasyonel modifikasyonların düzenlenmesi olarak öngörüyoruz. MYC, etkili olmak için genomdaki pek çok siteye bağlanabilir ve sinyal yoluyla dikte edilen genetik programı düzenleyebilir. MYC fonksiyonu genellikle doz bağımlı olduğundan, hücre başına MYC moleküllerinin sayısı da etkilidir. Açıkçası, tüm işaretleme hücrenin tip ve dönüşüm durumuna göre belirlenir. MYC düzenleme ve işlevi ile ilgili olduğu gibi, sinyal bütünleşmesini ve sonuçlarını anlamak, dikkat edilmesi gereken bir meydan okuma olmaya devam etmektedir. Bu görevin içine gömülmüş birçok geribildirim ve ileri bildirim mevcuttur.

MYC, bir gen aktivasyon işlevine sahiptir ve bu bulgu, MYC'nin birden fazla koaktivatör kompleksini düzenleme kabiliyeti ile tutarlı bir bulgudur (194). MYC ekspresyonunun onkogenik deregülasyonu, normal gelişim sırasında tümör fenotipine sahip hücreler üretir. Yüksek MYC seviyeleri, hücre farklılaşmasını bloke edebilir ve işlenmiş ve farklılaşmış hücrelerin kendi kendini yenilemelerini geliştirebilir (195).

Tümör progresyonu sırasında MYC, gelişimsel plastisiteyi koruyan kanser başlatan hücrelerin oluşumunu teşvik eder. Eğer apoptoz Bcl-2'nin birlikte ekspresyonu ile engellenirse, hematopoetik kök hücrelerde MYC'in ekspresyonu, pre-B hücre lenfomalarının hızlı bir şekilde oluşumuna yol açar. Bu lenfomalardan elde edilen hücreler, in vitro ortamda B-lenfositlere ya da makrofajlara dönüştürülebilir (196).

OKS'nin hücreleri tekrar programlamada çok önemli olduğu ama MYC'in sadece OKS'yi desteklediği ve gereksiz olduğu bildirilmiştir. (197, 198).

2.6.6. NANOG

NANOG, kendi kendini yenileme ve pluripotensin transkripsiyonel düzenlenmesinde kanonik fonksiyonlara sahip embriyonik kök hücrelerde (ESC'ler) ilk keşfedilen farklı bir homeoboks alan proteindir. SOX2 ve OCT4 ile birlikte NANOG, ESC'lerin özelliklerini korumada önemli bir rol oynamaktadır. Bir transkripsiyonel ağ oluşturarak, üç anahtar faktör genel olarak birlikte çalışır ve bir bütün pluripotent ilgili genlerin sentezlenmesini kontrol eder ve ESC'lerin çoğalmasını sağlar. NANOG, ESCler ve EG (embriyonik germ) ve EC (embriyonal karsinom) hücreleri gibi pluripotent hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir ve ekspresyonu farklılaşmaya bağlı olarak düzenlenir (199). NANOG proteinin aşırı ekspresyonu, sadece ekstrinsik faktör olan lösemi inhibitör faktörü (LIF) yokluğunda fare ESC'lerin pluripotensi özelliğini muhafaza etmekle kalmaz, aynı zamanda besleyici içermeyen koşullarda insan ESC büyümesini de artırır. Dahası, ektopik NANOG ifadesi yeniden programlamayı hücre bölünme hızından bağımsız bir şekilde artırabilir. Buna karşılık, NANOG'un aşağı düzenlenmesi hem fare hem de insan ESC farklılaşmasına neden olur. Bu nedenle NANOG protein seviyesi pluripotent hücrelerin kaderini belirler.

Normal somatik hücrelerde susturulmuş olmakla birlikte, beyin, göğüs, serviks, kolon, gastrik, baş ve boyun, karaciğer, akciğer, böbrek, ağız boşluğu, yumurtalık, pankreas, prostat ve diğer organların kanseri gibi kanser türlerinin çoğunda anormal NANOG ekspresyonu bildirilmiştir. NANOG'un ekspresyon seviyeleri genellikle tedavi direnci ve kanserli hastaların kötü sağkalımı ile pozitif yönde ilişkilidir. Çeşitli çalışmalar, NANOG ekspresyonunun upregülasyonunun hem in vivo hem de in vitro olarak tümöre özdeşliği arttırdığını, buna karşın NANOG'un bastırılması veya ablasyonunun tümör başlatmayı inhibe ettiğini göstermiştir. Böylece, NANOG ifadesi, tümör progresyonu, terapötik direnç, relaps ve metastaz ile bağlantılıdır. Anahtar pluripotens transkripsiyon faktörlerinden biri olan NANOG, normal embriyonik kök hücrelerde kendi kendini yenileme ve pluripotensi korumada kritik bir rol oynamaktadır. Son yıllardaki veriler NANOG'un çeşitli kanserlerle ifade edildiğini ve bunun ifadesinin kanserli hastalarda sağkalımın kötü olduğunu gösteriyor. Birçok çalışma, NANOG'un kanser kök hücrelerinin belirgin özelliklerini geliştirdiğini ve dolayısıyla karsinogenezi teşvik etmek için bir onkogen olarak işlev görebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, NANOG ifadesi hücre kaderini yalnızca pluripotent hücrelerde değil aynı zamanda kanser hücrelerinde de belirler. Normal embriyonik kök hücrelerde NANOG'un düzenlenmesi makul derecede iyi anlaşılmış olsa da, kanser hücrelerinde NANOG'un düzenlenmesi sadece yeni ortaya çıkmıştır.

NANOG, ES hücrelerinin çoğulculuğunu korumak, farklılaşmalarını engellemek, embriyonik kök hücrelerin kendi kendini yenilemesini düzenlemek ve farklılaşma süreçlerini etkileme gibi görevlerde bulunur (200, 201).

NANOG ekspresyonu ayrıca ES hücrelerine ait spesifik mikroRNA'lar tarafından düzenlenir (özellikle miR-134) (169, 202). İnsan kolon kanserinde, NANOG ekspresyonunun yüksek seviyeleri ilerlemiş kanser evreleri ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Büyük olasılıkla kolon kanserinde NANOG ekspresyonunun fonksiyonel olarak önemi vardır, çünkü fazla eksprese olması kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırmaktadır (203).

2.6.7. CD133 (PROM1 veya PROMININ-1)

CD133 (aynı zamanda prominin-1 olarak da bilinir) bir hücre yüzeyi transmembran glikoproteinidir. CD133 KK'da son zamanlarda tümör başlatan kabiliyetleri tümör hücrelerini zenginleştirmek için kullanılmıştır ve dolayısıyla kolon kanseri kök hücrelerini işaretlemektedir. Bununla birlikte, bu molekülün tümör başlatma için fonksiyonel önemi olmadığı gösterilmiştir. CD133, kolon kanseri progresyonu ve metastazı için yüksek prognostik bir etkiye sahiptir, ancak kolon kanseri hücrelerinin malign fenotipine işlevsel katkıda bulunması pek olası değildir(204). CD133 şu anda kolon KKH'nin en önemli belirteçlerinden biri olarak görülüyor (205). Human prominin-1 (CD133) kolon KKH'i tespit edebilmeyi sağlayan güçlü işaretleyicilerden biridir(206, 207).

Shmelkov vd.(2008)' nin çalışması metastatik kolon kanseri lezyonlarından alınan CD133- alt grubunun yalnızca tümörler oluşturabileceğini değil, CD133 + alt grubundan daha hızlı oluşturabileceğini bulmuştur. Ek olarak, CD133'ün kök hücrelerle sınırlı olmadan normal kolonik epitelde her yerde eksprese edildiğini tespit ettiler (208). Önceki çalışmalar, CD133 ekspresyonunun beyin tümörlerine benzer şekilde insan kolon kanserlerinde tümör başlatan hücreleri zenginleştirmek için yararlı olduğunu gösterdi (209).

Bağırsakta, transit amplifiye edici öncüler (TAP) ve bağırsak kök hücreleri (ISC) olmak üzere iki çoğalan hücre popülasyonu vardır. Prominin1 (PROM1) her iki popülasyonu işaretlerken, LGR5 ISC'lerde ifade edilir (57).

Gelişmiş KK'da CD133 geninin demetilasyonu sıklıkla saptanır (210). Saigusa vd.(2009) CD133, OCT4 ve SOX2 ekspresyonlarının rektal kanserde kötü prognozla ilişkili

olduğunu iddia etmişlerdir(211). CD133 veya CD44 aşırı ekspresyonu KK rekürrensi ile ilişkili değildir ama kötü prognozla bağlantılıdır(212). Handra-luca vd.(2013) LGD adenomlarda HGD'ye göre CD133 ekspresyon artışı saptamışlardır (213). Mohammedi vd.(2013) CD133'ün hiperplastik polipe göre sesil serrate poliplerde daha fazla eksprese olduğunu göstermişlerdir(214). Sahlberg vd.(2014) CD133 eksprese eden hücrelerin radyasyona daha dirençli olduğunu belirtmişlerdir (215).

2.6.8. LGR5 (GPR49)

LGR5, glikoprotein hormonu reseptör süper ailesine ait 7 transmembran altbirimine sahip bir yetim G proteinidir. İskelet kası, plasenta, omurilik ve beyin dokularında eksprese edilir (216). Bağırsakta birkaç WNT hedef geni üzerinde yapılan çalışmalarda, lösin açısından zengin tekrar içeren G proteinine bağlı reseptör 5'in (LGR5) hem küçük hem de büyük bağırsak kriptlerinin tabanında sınırlı bir ifadeye sahip olduğu ve bağırsak farklılaşması özelliğine sahip kök hücreler için markır olarak nitelendirildiği keşfedilmiştir (217).

Komşu kesitlerde ortak immüno Floresans ve immünohistokimya kullanarak, LGR5 ve CD133'ün aynı adenom içinde iki ayrı, karşılıklı olarak seçkin neoplastik hücre popülasyonu tanımladığı bulundu (218). LGR5 kök hücrelerinden kaynaklanan fare kolonik adenomları LGR5 adenom hücrelerinin bir alt kümesini içermekte, bu da adenomlarda bir kök/progenitör hücre hiyerarşisinin muhafaza edildiğini düşündürmektedir (56).

Fan vd. (2010) normal kolon dokusundan kansere gidildikçe beta-kateninle orantılı olarak LGR5 ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir (219). Amsterdam vd. (2013) LGR5'in ekspresyonunun muhtemelen kötü diferansiye tümörlerin kök hücrelerine spesifik olduğunu, buna karşılık Nanog'un esas olarak yüksek derecede diferansiye tümörlerin kenarlarında eksprese edildiği sonucuna varmışlardır (220). Chai vd.(2013) LGR5 ekspresyonunun normal kolonda olmadığını, polipten kansere dönüşümde giderek arttığını belirtmişlerdir (221). Walker vd.(2011) LGR5 in tumörigenisiteyi engellediğini; bunun aksine Baker vd.(2015) LGR5'in adenomlarda ve KK'de fazla eksprese olduğunu ve hücrelerin invazyonunu ve agresifliğini artırdığını belirtmişlerdir (222, 223). Takahashi vd.(2011) kolorektal kanser gelişiminde LGR5'in fazla eksprese olduğunu ve LGR5 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (224). Asfaha vd.(2015) LGR5+ hücrelerin radyasyona duyarlı olduğunu, dirençte rol oynamadığını ve krt19+ hücrelerinin dirençten sorumlu olduğunu belirtmişlerdir (225).

2.6.9. REX1 (ZFP42 veya REXO1)

REX-1 geni, gelişimsel olarak düzenlenen bir asidik çinko parmak genidir. REX-1'de bir çinko parmak motifinin varlığı, REX-1 proteininin DNA'ya bağlandığını ve transkripsiyonu düzenlediğini düşündürmektedir. Rex-1 promoteri F9(teratocarcinoma) kök hücrelerinde REX-1 promoterinin aktivitesi için gerekli olan 2220 pozisyonunda bir oktamer motifi (ATTTGCAT) içerir ve retinoik asit'in indüklediği genin aşağı regülasyonuna katkıda bulunur. Oktamer motifi, DNA bağlayıcı proteinlerin POU (OCT-3/4) ailesinin oktamer transkripsiyon faktörü üyeleri için bağlayıcı bir alandır (226). REX1 (ZFP42 veya REXO1), pluripotensinin bilinen bir markeri olup genellikle farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde teratokarsinoma hücrelerinde bulunur. Bir pluripotent belirteç olmasının yanı sıra, regülasyonu da pluripotent durumun korunması için kritik önem taşır. Hücreler farklılaşmaya başladığında, REX1 şiddetli ve aniden aşağı regüle olur (227, 228). OCT-3/4 ve SOX2'nin her ikisi de REX-1'i transaktive edebilseler de, sadece SOX2, REX-1'in yukarı regülasyonunda NANOG ile birlikte çalışır (228).

Mongan vd. (2006) REX1'in normal epitel ve teratoma gibi bazı kanser hücrelerinde ekspresyonundan bahsetmişlerdir (229). Raman vd. (2006) normal dokuya göre insan kök hücre markeri REX-1'in (ZFP-42) azaltılmış ekspresyonundan, böbrek hücreli karsinomada OCT4 ekspresyonunun değişmediğinden bahsetmişlerdir (230). REX-1'in NANOG'un doğrudan bir hedefi olduğu ve bunun SOX2 ve OCT-3/4 tarafından artırıldığı bildirilmiştir (228). Kim vd.(2011) REX1'in glioblastomada yüksek seviyede eksprese olduğunu ve baskılanmasının kemoterapötik etkiyi artıracağını araştırmışlardır (231). Schuebel vd. (2007) ZFP42 geninin kolon kanseri ve hücre hatlarında normal hücrelere göre metillenip susturulduğunu göstermişlerdir (232).

2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

2.7.1. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) Tekniğinin Prensipleri

(a) SYBR Green I tekniği. SYBR Green I floresansı, çift sarmallı DNA'ya bağlandığında muazzam bir şekilde artar. Uzama aşamasında, PCR ürününe giderek daha fazla SYBR Green I bağlanacak ve böylece artmış bir floresanla sonuçlanacak. Sonuç olarak, her bir sonraki PCR döngüsü boyunca daha fazla floresan sinyali tespit edilecektir. (b) Hidroliz Prob tekniği. Hidroliz probu, prob sağlam olduğu sürece haberci florokromunun flüoresansını emen söndürücü florokrom ile bağlanır. Bununla birlikte, hedef dizinin çoğaltılmasının ardından hidroliz probu yerinden ayrılır ve daha sonra Taq polimeraz tarafından hidrolize edilir. Bu, muhabir ve söndürücü florokromun ayrılmasıyla sonuçlanır ve dolayısıyla muhabir florokromunun floresanı saptanabilir hale gelir. Ardışık PCR döngüsü boyunca bu floresan, serbest muhabir florokromlarının ilerici ve üstel birikimi nedeniyle daha da artacaktır. (c) Hibridizasyon Problemleri tekniği. Bu teknikte bir son 3' ucunda bir verici florokrom ile etiketlenir ve ikinci bir sonda bir akseptör florokrom ile etiketlenir. İki florokrom yakın bir yerde olduğunda (yani, 1-5 nükleotit), verici florokromun yaydığı ışık, alıcı florokromu uyaracak. Bu, daha sonra birleşme fazı ve PCR reaksiyonunun uzatma fazının ilk kısmı sırasında tespit edilebilen flüoresan emisyonuyla sonuçlanır. Her sonraki PCR döngüsünden sonra daha fazla hibridizasyon probu birleşerek daha yüksek floresans sinyalleri verir (233).

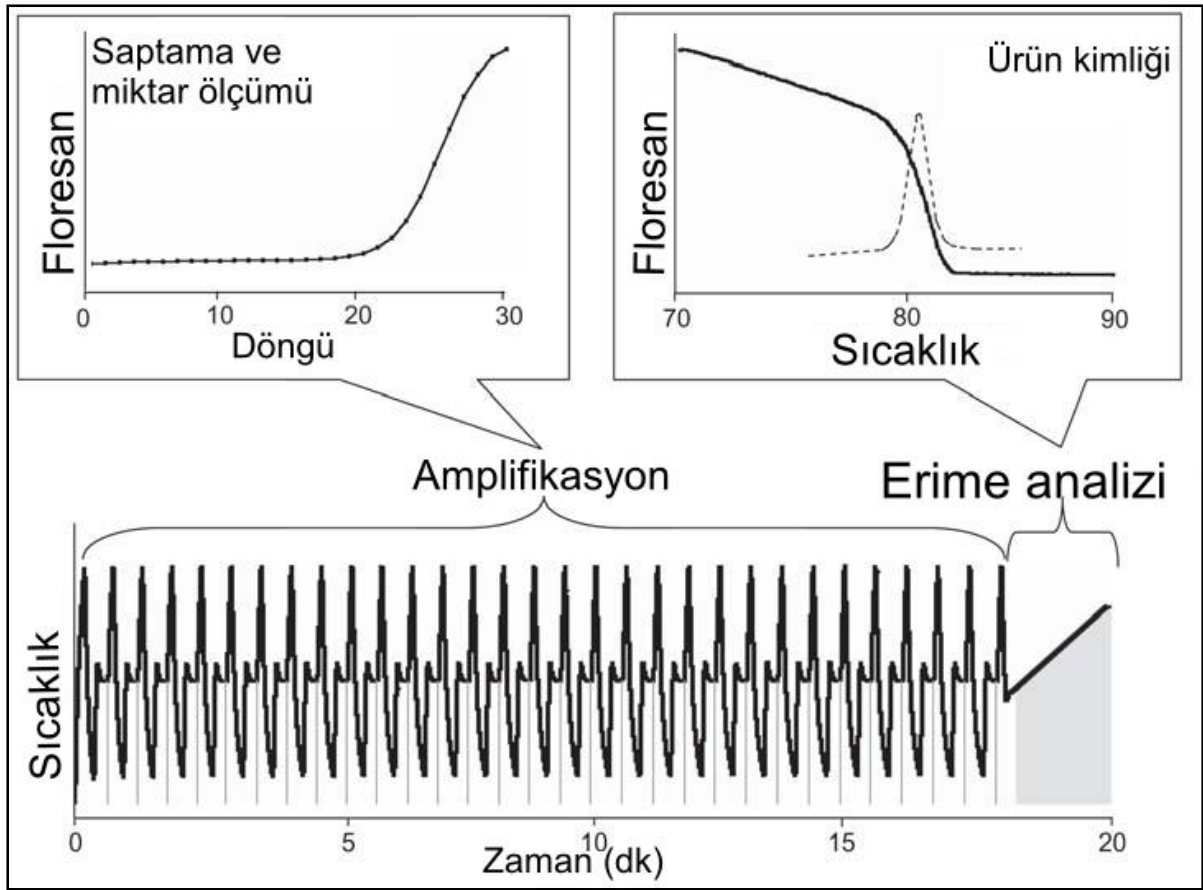
SYBR Green I (SG) moleküler biyolojide nükleik asit boyası olarak kullanılan bir asimetric siyanin boyadır. SYBR Green DNA'ya bağlanır. Elde edilen DNA-boya kompleksi, mavi ışığı ($\lambda_{max} = 497 \text{ nm}$) emer ve yeşil ışığı ($\lambda_{max} = 520 \text{ nm}$) yayar. Boya tercihan çift sarmallı DNA'ya bağlanır, ancak düşük performanslı olarak tek sarmallı DNA'ya da bağlanır. SYBR Green aynı zamanda DNA'dan daha düşük bir performansla RNA'yı da boyayabilir. Floresan boya SYBR Green I, çift sarmallı DNA moleküllerini bağlar ve belirli bir dalga boyunda floresan sinyal yayar. SYBR Green I'in uyarma ve emisyon maksimumu sırasıyla 494 nm ve 521 nm'de olup herhangi bir gerçek zamanlı döngü ile boya kullanılmasına izin verir. Tespit, gerçek zamanlı PCR'in uzama adımında gerçekleşir. Sinyal yoğunluğu, PCR ürününün birikimi nedeniyle artan döngü sayısı ile birlikte artar. SYBR Green'in kullanılması, hedefe özgü etiketli problemleri sentezlemenize gerek kalmadan birçok farklı hedefin analiz edilmesini sağlar. Bununla birlikte, spesifik olmayan PCR ürünleri ve primer dimerler de

floresan sinyaline katkıda bulunur. Bu nedenle, SYBR Green'i kullanırken yüksek PCR özgüllüğü gereklidir.

2.7.2. Erime Eğrisi Analizi (Melting)

İnterkalasyon boyaları kullanılırken erime/ayırışma eğrileri çalıştırılmalıdır. SYBR Green boya, primer dimerleri, kontamine olmuş DNA, yanlış birleşmiş primerlerden kaynaklanan PCR ürünü dahil olmak üzere her türlü çift sarmallı DNA'yı algılar. Bir ayırışma/erime eğrisi izleyerek, istenen ampikonun tespit edildiğinden emin oluruz (Şekil 1). PCR dupleks hibridizasyonunu sonrası erime analizi, sıcaklık değıştikçe dizi doğrulama ve genotiplendirme için basit bir yöntemdir. Erime analizi genellikle PCR işleminden hemen sonra aynı reaksiyon tüpünde gerçekleştirilir. Çift sarmallara veya floresanla etiketlenmiş oligonükleotit problemlere özgü DNA boyalarının floresanı, hem gerçek zamanlı kantifikasyon hem de erime analizi için izlenebilir (234). Erime eğrisi analizi asıl olarak gerçek zamanlı PCR ile bağlantılı olarak, artırılmış hedefin varsayımsal tanımlanması olarak kullanılmıştır. SYBR Green I boyası PCR reaksiyonunda amplifikasyonu engellemeyen konsantrasyonlarda bulunur. PCR sonrasında, birleşmiş ürünler sabit bir hızda (genellikle 0,1-0,3°C/s) eritilir ve filamentlerin ayrışması sırasında flüoresandaki azalma izlenir. Daha sonraki çalışmalar, ilk önce iki etiketli oligonükleotid, daha sonra bir ve son olarak doymuş DNA boyaları, etiketlenmemiş oligonükleotitler geliştirilerek uygun bir genotiplendirme yöntemi olarak prob erime analizini başlattı (235).

Alt panel, erime analizi için bir sıcaklık rampası izleyen tipik bir hızlı-döngü sıcaklık profilini göstermektedir. Floresan sinyal, amplifikasyon sırasında her devirde bir kez izlenir (noktalı çizgiler), spesifik hedef dizilerinin varlığı veya yokluğu hakkında bilgi sağlar ve hedefin miktarının belirlenmesine izin verir. Floresan sinyal erime aşamasında (gölgeli alan) sürekli olarak izlendiğinde, hedef tanımlamayı doğrulayan veya genotip oluşturan bilgiler sağlayabilir (Şekil 1).



Şekil 1: Amplifikasyon ve erime analizi sırasında gerçek zamanlı izleme

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Materyal Seçimi

Formalinle sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) doku örneği blokları, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından alındı. Histolojik tanı, polip tipi ve derecesi bir danışman patoloji uzmanı tarafından teyit edildi. Kanseri dokusunda klinik ve patolojik veriler, kolorektal kanser nedeniyle tedavi edilen hastaların geriye dönük olarak toplanan veri tabanından elde edilmiştir.

KK hastalarının sağlıklı kolon dokusu normal bir kontrol olarak kullanıldı. Çalışmada her biri parafinize, normal kolon dokusu, hiperplastik polipler, histopatolojik (HGD ve LGD) olarak evrenmiş tübüler, tübülovillöz ve villöz polipler ve kolon kanseri doku örnekleri kullanılmıştır (Tablo 1).

3.2. RNA İzolasyonu

İzolasyon için miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Germany) kullanıldı. Üreticinin protokolüne göre total RNA izole edildi. Protokol aşağıda belirtildiği gibidir:

1. 10 mikron kalınlığında yaklaşık 5 kesit ependorflara alındı.
2. Örnekler üzerine 1ml ksilen eklendi, iyice vortekslendi.
3. En yüksek hızda 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj için Micro Star 17R (VWR, Pennsylvania) kullanıldı.
4. Süpernetan dikkatlice pellete değmeden atıldı.
5. Pellet üzerine 1ml %96-100 lük etanol eklendi kısaca vortekslendi.
6. En yüksek hızda 2 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernetan dikkatlice pellete değmeden atıldı.
8. 56 santigrat derecede 3 dk inkübe edildi sonra soğuması için oda sıcaklığında bekletildi.
9. 240 mikrolitre Buffer PKD eklendi ve vortekslendi.

10. 1 dk 10.000 rpmde santrifüj edildi.
11. 10 mikrolitre Proteinaz K eklendi, pipetle hafifçe karıştırıldı.
12. 56 santigrat derecede daha sonra 80 santigrat derecede 15 dk inkübe edildi.
(İnkübasyon için T-shaker ve Dry Bath(EuroClone, İtalya) kullanıldı) (Şekil 2).

Tablo 1: Doku tiplerinin özellikleri

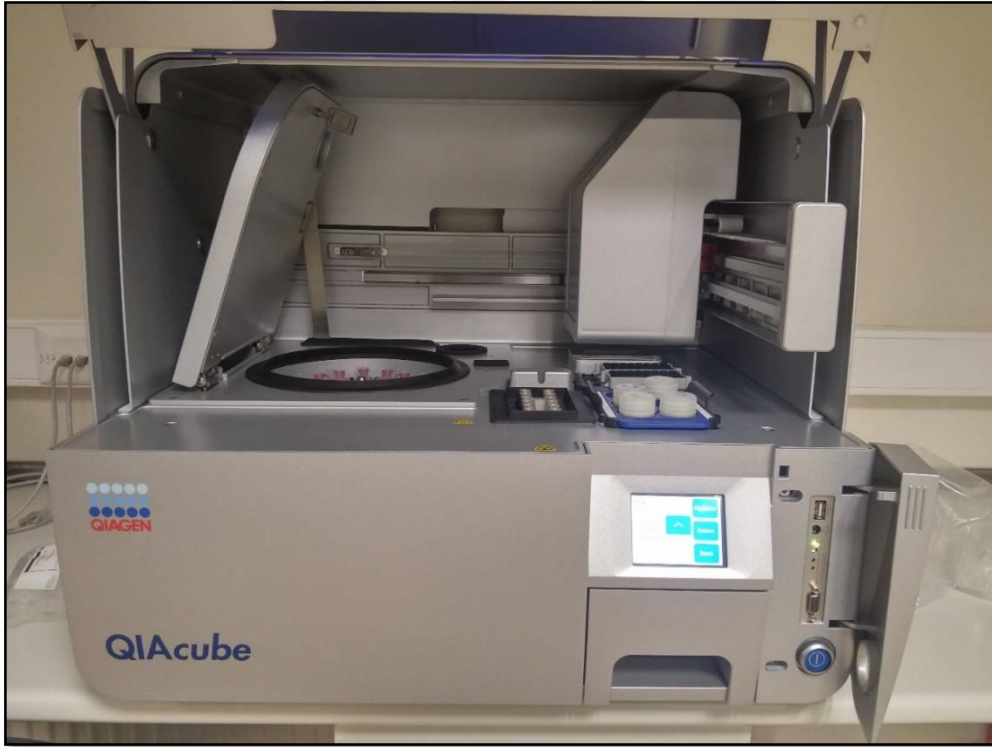
Doku Tipleri ve Gruplar		Sayı (n)
Kontrol	Normal	18
Grup 1	Hiperplastik	12
Grup 2	Tübüler-L	9
Grup 3	Tübüler-H	9
Grup 4	Tübülövilöz-L	10
Grup 5	Tübülövilöz-H	9
Grup 6	Villöz-L	9
Grup 7	Villöz-H	4
Grup 8	Kanser-G1	10
Grup 9	Kanser-G2	12
Grup 10	Kanser-G3	14
Toplam		116



Şekil 2: İnkübasyon için kullanılan T-shaker ve Dry Bath (EuroClone, İtalya)

13. Renksiz bölüm yeni 2ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
14. Buzda 3dk inkübe edildi.
15. 15dk 13.500 rpm de santrifüj edildi.
16. Pellet rahatsız edilmeden süpernetan yeni yeni 2 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
Burada dibe çöken maddeler doku parçaları ve çaprazlaşmış DNA'lar içerir.
17. Buradan itibaren QIAcube (Qiagen, Germany)(Şekil 3) cihazı veya manuel yöntem kullanılmış ve üreticinin protokolüne göre total RNA elde edilmiştir.
18. Total örneğin 10'da biri kadar DNase Booster Buffer(yaklaşık 25 mikrolitre) ve 10 mikrolitre DNase 1 stock solüsyon eklendi.
19. Tüp ters çevrilerek çalkalandı (vortekslenmez ve kısaca santrifüj edilerek tüpün kenarlarında kalmış olan solüsyonun kullanımı sağlanır).
20. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
21. 500 mikrolitre Buffer RBC eklendi ve karıştırıldı.
22. 1750 mikrolitre etanol (%100) eklendi pipetle karıştırıldı (vortekslenmez). Hemen sonraki aşamaya geçildi.
23. 2ml tüplere yerleştirilmiş RNeasy MinElute spin kolona örneğin 700 mikrolitresi aktarıldı.
24. 15sn 10.000 rpm de santrifüj yapıldı, üstte kalan kısım atıldı.
25. Bütün örnek kolondan geçene kadar bu işlem tekrarlandı.
26. RNeasy MinElute spin kolona 500 mikrolitre Buffer RPE eklendi, kapak kibarca kapatıldı. 15sn 10.000 rpm de santrifüj yapıldı, üstte kalan kısım atıldı.

27. 500 mikrolitre Buffer RPE spin kolonu yıkamak için eklendi, 2dk 10000rpm de santrifüj yapıldı, üstte kalan kısım atıldı.
 28. RNeasy MinElute spin kolon yeni 2 ml tüpe aktarıldı. Kapağı açıldı ve en yüksek hızda 5 dk santrifüj yapıldı.
 29. Birikimin olduğu tüp atıldı.
 30. RNeasy MinElute spin kolon yeni 1.5 ml tüpe aktarıldı. 30 mikrolitre RNaz'sız su membrana eklendi. Kapağı kapatılır ve en yüksek hızda 1 dk santrifüj yapıldı.
 31. QIAcube sonucunda 20 mikrolitre, manuel yöntemle 12 mikrolitre ürün elde edildi.
- *QIAcube (Şekil 3): Tüpler ve gerekli malzemeler üretcinin protokolüne göre QIAcube'e yerleştirildi. DNaz I inkübasyon karışımı hazırlanırken 377 µl (145 µl DNaz karışımı + 232 µl DNaz Booster Tamponu) kullanıldı.



Şekil 3: QIAcube (Qiagen, Germany)



Şekil 4: QIAxpert (Qiagen, Germany)

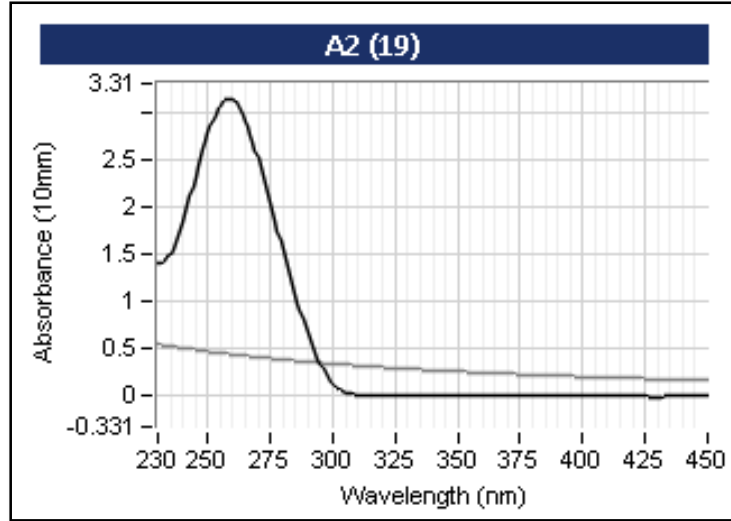
3.2.1. RNA Miktar ve Kalitesinin Ölçülmesi

1. RNA miktar ve kalitesi QIAxpert (Qiagen, Germany)(Şekil 4) ile ölçüldü (QIAxpert, DNA ve RNA ile numune safsızlıklarını ayırt etmek için numune içeriğini profilleyen bir mikroakışkan UV/VIS spektrofotometredir).
2. UV spektrofotometresi ile belirlenen konsantrasyon ve saflık: RNA konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometredeki absorbansı ölçerek belirlenmelidir. Nükleik asitlerin spektral özellikleri pH'ya büyük oranda bağlıdır. 1 cm'lik bir saptama yolunda 260 nm'de 1.0'ın absorbans okuması 40 µg/ml'lik bir RNA konsantrasyonuna tekabül eder.
3. A260: A230 oranı 1.7' den büyük, A260: A280 oranı ise 1.8 ila 2.0 olmalıdır.
4. A260 ile belirlenen konsantrasyon > 40 µg / ml olmalıdır.

Materyallerimize ait QIAxpert Rapor örneği tablo (Tablo 2) ve grafi (Şekil 5) aşağıdadır.

Tablo 2: 12-23 nolu örneklerimizi içeren QIAxpert Rapor örneği

Pozisyon	Örnek ismi	A260 Konsantrasyon (ng/ul)	Arka Plan (A260)	A260	A260/A280	A260/A230
A1	Boş_A1	0.0	0.00	0.00	-	-
B1	12	133.2	0.89	3.33	1.91	1.97
C1	13	92.2	0.28	2.31	1.85	1.57
D1	14	269.4	0.00	6.74	1.92	1.85
E1	15	252.3	0.24	6.31	1.84	1.41
F1	16	92.8	0.28	2.32	1.76	1.03
G1	17	80.5	0.21	2.01	1.87	1.52
H1	18	147.2	0.41	3.68	1.90	1.82
A2	19	125.4	0.44	3.13	2.03	2.22
B2	20	94.8	0.38	2.37	1.97	2.37
C2	21	175.3	0.48	4.38	2.00	2.25
D2	22	936.5	0.55	23.41	1.99	2.24
E2	23	101.9	0.37	2.55	2.01	2.36



Şekil 5: QIAxpert raporunda 19. örneğin grafik olarak gösterimi

3.3. cDNA Sentezi ve Preamplifikasyon

Yeterli miktar ve kalitede RNA içeren örneklerle RT2 PreAMP cDNA Synthesis Kit (Qiagen, Germany) ile preamplifikasyon basamağı yapıldı. OCT4, KLF4, SOX2, MYC, NANOG, REX1, CD133, LGR5 ve ACTB genleri için özel olarak PreAmp primerleri tasarlandı ve kullanıldı. FFPE dokulardan elde edilecek RNA miktarı ve saflığı değişken ve az olabileceğinden bu basamak eklendi. Üreticinin protokolüne göre basamaklar izlendi, RNA miktar ve kalitesi artırıldı.

3.3.1. cDNA Sentezi

1. Her bir RNA örneği için genomik DNA eleme karışımı, Tablo 3'e göre steril bir PCR tüpünde hazırlandı.
2. Genomik DNA eliminasyon karışımı 42 °C'de 5 dakika, sonrasında hemen buzda en az 1 dakika bekletildi.
3. Ters transkripsiyon karışımı Tablo 4'ye göre hazırlandı. Birden fazla reaksiyon için, Tablo 4'de gösterilen hacimlere göre ölçeklendirildi.
4. 10 µl genomik DNA eliminasyon karışımı içeren her tüpe 10 µl ters transkripsiyon karışımı eklendi. Pipetleme ile yukarıya ve aşağıya nazikçe karıştırıldı. Hava kabarcıklarını gidermek için kısaca santrifüjlendi ve tüm sıvının tüpün altında toplanması sağlandı.

5. Tam 30 dakika boyunca 42°C'de inkübe edildi. Ardından reaksiyonu 5 dakika boyunca 95°C'de inkübe ederek durduruldu. İnkübasyon için labcycler (SensoQuest, Germany) ve XP cycler (Bioer, China) kullanıldı (Şekil 6).
6. Reaksiyonlar buz üzerine yerleştirildi ve preamplifikasyon protokolüne geçildi.

Tablo 3: Genomik DNA eliminasyon miksi (Bir numune için)

Bileşen	FFPE örneğinden alınan RNA
RNA	100 ng–1 µg
Buffer GE	2 µl
RNaz içermeyen su	Değişken
Toplam hacim	10 µl

Tablo 4: Ters transkripsiyon karışımı

Bileşen	1 reaksiyon için hacim
5x Buffer BC3	4 µl
Kontrol P2	1 µl
cDNA Sentez enzim karışımı	1 µl
RNaz İnhibitör	1 µl
RNaz içermeyen su	3 µl
Toplam hacim	10 µl



Şekil 6: Labcyclers (SensoQuest, Germany), XP cyclers (Bioer, China) ve Rotor-Gen Q (Qiagen, Germany)

3.3.2. cDNA Hedef Örneklerinin Preamplifikasyonu

Prosedür aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

1. Oda sıcaklığında RT2 PreAMP PCR Mastermix ve RT2 PreAMP Pathway Primer Mix'i çözündürüldü.
2. Preamplifikasyon karışımını Tablo 5'e göre hazırlandı. Birden fazla reaksiyon için, Tablo 5'te gösterilen hacimler buna göre ölçeklendirildi.
3. 0.2 ml PCR tüpüne cDNA sentezi reaksiyonundan 5 µl pipetlendi. Ardından, 20 µl preamplifikasyon karışımı eklendi.
4. Pipetleme ile yukarıya ve aşağıya nazıkçe karıştırıldı. Hava kabarcıklarını gidermek için kısaca santrifüjlendi ve sıvı tüpün altında toplandı.
5. Gerçek zamanlı döngü programı Tablo 6'ya göre programlandı. Tüpler gerçek zamanlı PCR cihazına yerleştirildi ve program başlatıldı. PCR için Labcyclers (SensoQuest, Germany) kullanıldı.

Tablo 5: Preamplifikasyon karışımı hazırlama

Bileşim	1 örnek için miktar
RT2 PreAMP PCR Mastermix	12.5 µl
RT2 PreAMP Pathway Primer Karışımı	7.5 µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 6: cDNA'nın preamplifikasyonu için PCR koşulları

Döngüler	Süre	Sıcaklık
1	10 dk	95°C
12	15s	95°C
	2 dk	60°C
Bekleme		4°C

6. Süreç bittiğinde, tüpler gerçek zamanlı PCR cihazından alındı ve buz üzerinde bırakıldı.
7. Önceden eklenmiş her bir reaksiyona 2 ul'lik Yan Tepki Redüktörü eklendi. Pipetleme ile yukarıya ve aşağıya nazıkçe karıştırıldı. Hava kabarcıklarını gidermek için kısaca santrifüjlendi ve sıvı tüpün altında toplandı.
8. 37°C'de 15 dakika süreyle inkübe edildi, ardından 95°C'de 5 dakika süreyle ısı inaktivasyonu yapıldı.
9. Hemen 84 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve iyice karıştırıldı.
10. Gerçek zamanlı PCR öncesi buz üzerinde bekletildi (veya gece boyunca -20°C'de saklanabilir).

Tablo 5’de (2. madde) bahsedilen RT2 PreAMP Pathway Primer karışımı hazırlama: cDNA sentezini yapıldı. RT2 qPCR Primer Testi, Tablo 7’te açıklandığı üzere, ilgilenilen 9 gen için hazırlandı.

Tablo 7: RT2 qPCR Primer Assay karışımı hazırlama rehberi

Gen sayısı	RT ² qPCR Primer Assay (10 µM)	Su
1 gen	1 test x 40 µl = 40 µl	960 µl
2 gen	2 test x 40 µl herbiri = 80 µl	920 µl
3 gen	3 test x 40 µl herbiri = 120 µl	880 µl
4 gen	4 test x 40 µl herbiri = 160 µl	840 µl
5 gen	5 test x 40 µl herbiri = 200 µl	800 µl
6 gen	6 test x 40 µl herbiri = 240 µl	760 µl
7 gen	7 test x 40 µl herbiri = 280 µl	720 µl
8 gen	8 test x 40 µl each = 320 µl	680 µl
9 gen	9 test x 40 µl herbiri = 360 µl	640 µl
10 gen	10 test x 40 µl herbiri = 400 µl	600 µl

3.4. Gerçek Zamanlı PCR

RT2 qPCR Primer Assay (Qiagen, Germany) ve SYBR Green boyası kullanılarak ekspresyon çalışması gerçekleştirilmiştir. OCT4, KLF4, SOX2, MYC, NANOG, REX1, CD133, LGR5 ve ACTB genleri için özel olarak ileri ve geri primerler tasarlandı. Primerlerin yapısını ve işlevselliğini değerlendirmek için RNAfold ve Beacon Primer Designer (Premier Biosoft International) yazılımı kullanıldı. CDNA sentezi için 100 ng RNA kullanıldı.

Rotor-Gen Q (Qiagen, Germany) (Şekil 6) ile RT2 qPCR Primer Assay (Qiagen, Germany) için gerçek zamanlı PCR protokolü aşağıda belirtildiği gibi uygulanmıştır.

1. İçeriği tüplerin altına getirmek için RT² SYBR Green Mastermix, su ve cDNA sentez reaksiyonu kısaca (10-15s) santrifüjlendi. RT² SYBR Green Mastermix, yalnızca ısı aktivasyonundan sonra aktif olan HotStart DNA Taq Polimeraz içerdiğinden, reaksiyonlar oda sıcaklığında (15-25°C) hazırlandı.
2. PCR bileşenlerinin karışımı 5 ml'lik bir tp içinde Tablo 8'de anlatıldığı gibi hazırlandı.
3. PCR bileşenleri karışımı kısaca santrifüjlendi.
4. 20 µl PCR komponent karışımı, bireysel Rotor-Disk kuyularına boşaltıldı.
5. Gerçek zamanlı döngü programı Tablo 9'e göre programlanarak çalışma başlatıldı.

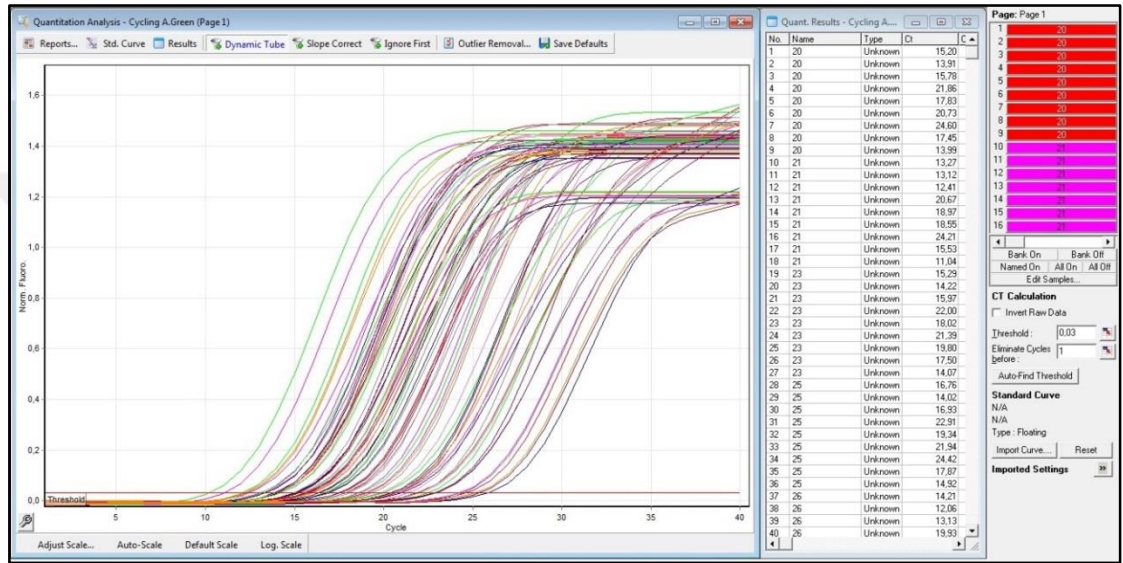
Tablo 8: Bir reaksiyon için PCR bileşen karışımı

Bileşen	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermix	12.5 µl
cDNA sentez reaksiyonu	5 µl
RT ² qPCR Primer Assay (10 µM stock)	1 µl
RNaz içermeyen su	6.5 µl
Toplam hacim	25 µl

Tablo 9: Döngü koşulları

Döngü	Süre	Sıcaklık
1	10 dk	95°C
40	15 s	95°C
	30 s	60°C

6. Gerçek zamanlı döngü yazılımı kullanılarak her kuyu için eşik döngüsü (CT) hesaplandı (Şekil 7).
7. Aynı analizlerde çalışan RT² qPCR Primer Testi ayarlarının aynı olduğundan emin olundu.
8. Tüm kuyular için CT değerleri, PCR Array Veri Analizi Şablonu Excel veya Web tabanlı yazılımla kullanılmak üzere boş bir Excel elektronik tablosuna aktarıldı.

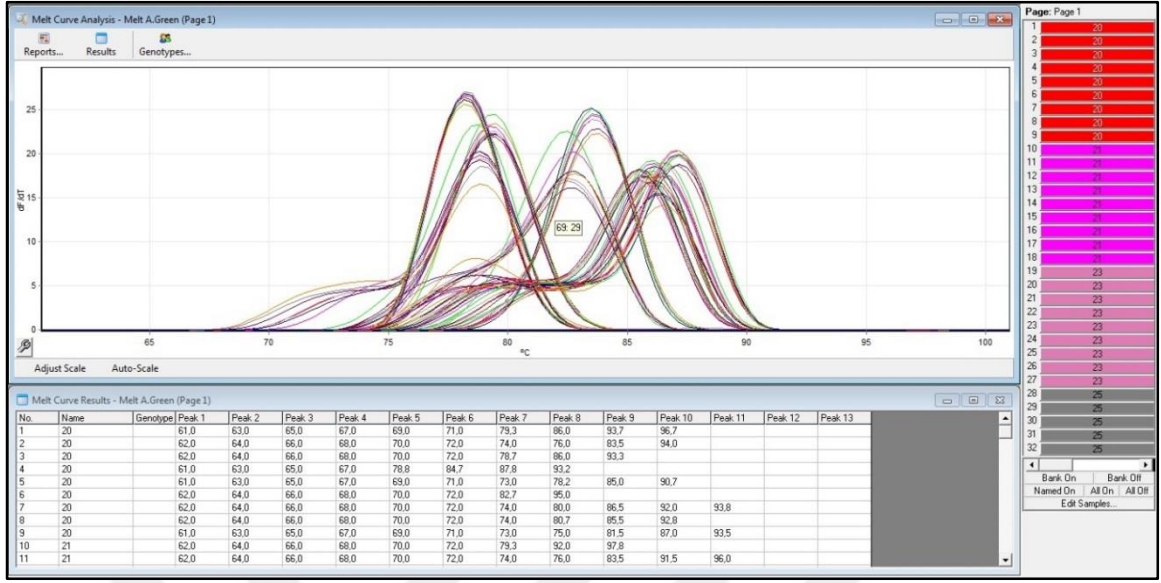


Şekil 7: 20, 21, 23, 25, 26, 27, 28, 29 nolu örneklerimize ait CT değerleri görülmektedir.

3.4.1. Erime Analizi (Melting)

PCR özgüllüğünü doğrulamak için ayrışma (erime) eğrisi analizi yapıldı. Bir erime eğrisi programında her kuyucuk için gerçek zamanlı döngü yazılımını kullanarak birinci türev ayrışma eğrisi oluşturuldu. Her bir gen için her tepkimede tek bir zirve görüldü.

Her bir genin amplikonunun kendine özgü bir erime sıcaklığı mevcuttur. Dokuz genimiz ve aynı sayıda pikimiz mevcuttur. Erime sıcaklıkları sırasıyla: OCT4:82.5°C, KLF4:86°C, SOX2:86.5°C, MYC:83.5°C, NANOG:78.8°C, REX185.5°C, CD133:79.3°C, LGR5:78.2°C, ACTB:87°C'dir. Burada 20, 21, 23, 25, 26, 27, 28, 29 nolu örneklerimizin 9 gen için erime sıcaklığı değerleri görülmektedir (Şekil 8).



Şekil 8: Seçilen genlerin erime sıcaklıkları

3.4.2. Veri Analizi

Veriler SPSS sürüm 20.0 istatistik programında değerlendirildi. Bağımsız iki grubu normal dağılım gösteren sayısal değişkenler açısından karşılaştırmak için Student *T* testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistik olarak aritmetik ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerler verildi, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Kontrol grubu haricinde 10 grup oluşturuldu: grup 1: hiperplastik polipler, grup 2: tübüler L, grup 3: tübüler H, grup 4: tübülovillöz L, grup 5: tübülovillöz H, grup 6: villöz L, grup 7: villöz H, grup 8: kanser G1, grup 9: kanser G2, grup 10: kanser G3 (Tablo 1). Her bir grup kontrol grubuyla karşılaştırıldı, kat değişimi 2 veya 2'nin üzeri anlamlı kabul edildi (Tablo 10'da belirtilmiştir).

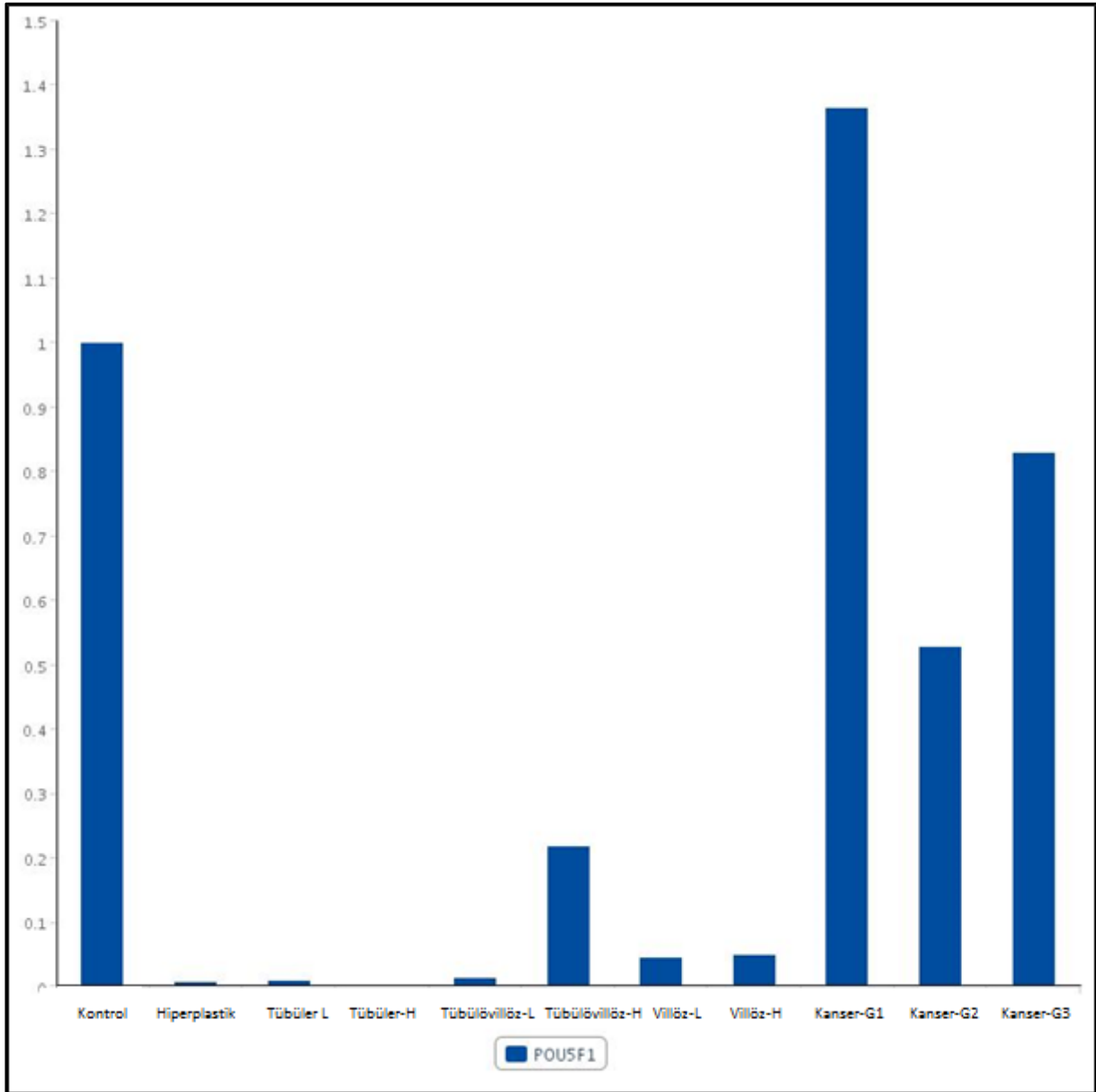
Normal dokularda muhtemelen intestinal kök hücrelerin varlığı sebebiyle KİF ekspresyonları mevcuttur, hatta poliplerin çoğuna göre ekspresyon seviyeleri yüksektir. Hiperplastik poliplerde (grup 1) kontrol gruba göre PROM1 (p: 0.01), POU5F1 (p: 0.02), LGR5 (p: 0.01) ve REX1 (p: 0.01) genlerinin ekspresyonlarında anlamlı düşüş görülmektedir. Tübüler LGD poliplerde (grup 2) kontrol gruba göre POU5F1 (p: 0.04) ve REX1 (p: 0.02) genlerinin ekspresyonlarında anlamlı düşüş saptanmıştır. Tübüler HGD poliplerde (grup 3) kontrol gruba göre POU5F1 (p: 0.03) ve PROM1 (p: 0.047) genlerinin ekspresyonlarında anlamlı düşüş görülmektedir. Benzer şekilde tübülovillöz LGD poliplerde (grup 4) kontrol gruba göre POU5F1 (p: 0.03) ve PROM1 (p: 0.046) genlerinin ekspresyonlarındaki anlamlı düşüş görülmektedir. Tübülovillöz HGD (grup 5) ve villöz LGD poliplerde (grup 6) kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı değişim saptanmamıştır. Villöz HGD poliplerde (grup 7) kontrol gruba göre LGR5 (p: 0.01) ve PROM1 (p: 0.005) genlerinin ekspresyonlarında anlamlı yükseliş görülmektedir. G1 evre tümör dokularında (grup 8) kontrol gruba göre LGR5 (p: 0.003) geninin ekspresyonunda anlamlı yükseliş saptanmıştır. G2 evre tümör dokularında (grup 9) kontrol gruba göre LGR5 (p: 0.0002) ve MYC (p: 0.002) genlerinin ekspresyonlarında anlamlı yükseliş görülmektedir. G3 evre tümör dokularında (grup 10) kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı değişim saptanmamıştır. Bazı gruplarda bazı genler iki ve üzeri kat değişimi göstermesine karşın, en yüksek ve en düşük delta CT değerleri arasındaki farkın büyük olması nedeniyle bu değişim istatistiksel olarak anlamsız gözükmemektedir (Tablo 10).

Tablo 10: Kontrol grubuna göre diğer grupların gen ekspresyon kat değişimlerinin karşılaştırılması (1.0'ın üzerindeki kat değişimleri ekspresyonun arttığını, 0.99'un altındaki kat değişimleri ise azaldığını belirtir.)

	PROM1	MYC	KLF4	NANOG	LGR5	POU5F1	SOX2	REX1	ACTB
Hiperplastik (Grup 1)									
Kat değişimi	0.07	0.03	4.53	0.00	0.06	0.01	0.00	0.03	1.00
p değeri	0.01	0.15	0.57	0.17	0.01	0.02	0.19	0.01	0.0000
Tübüler L (Grup 2)									
Kat değişimi	0.21	0.11	4.84	0.01	0.23	0.01	0.00	0.02	1.00
p değeri	0.0503	0.22	0.77	0.25	0.17	0.04	0.22	0.02	0.0000
Tübüler-H (Grup 3)									
Kat değişimi	0.08	0.08	2.96	0.02	0.82	0.00	0.00	0.09	1.00
p değeri	0.047	0.25	0.64	0.24	0.24	0.03	0.26	0.13	0.0000
Tübülövilöz-L (Grup 4)									
Kat değişimi	0.34	0.09	03.05	0.02	0.61	0.01	0.05	0.17	1.00
p değeri	0.046	0.21	0.36	0.22	0.15	0.03	0.24	0.77	0.0000
Tübülövilöz-H (Grup 5)									
Kat değişimi	0.19	1.02	0.81	0.57	3.32	0.22	0.34	0.15	1.00
p değeri	0.09	0.57	0.91	0.68	0.19	0.27	0.49	0.15	0.0000
Villöz-L (Grup 6)									
Kat değişimi	0.72	0.54	05.37	0.01	0.37	0.05	0.00	0.09	1.00
p değeri	0.48	0.59	0.23	0.26	0.41	0.08	0.26	0.06	0.0000
Villöz-H (Grup 7)									
Kat değişimi	6.88	1.23	7.48	0.06	11.14	0.05	0.10	0.05	1.00
p değeri	0.005	0.62	0.98	0.44	0.01	0.19	0.51	0.11	0.0000
Kanser-G1 (Grup 8)									
Kat değişimi	1.87	5.24	5.65	0.46	10.62	1.36	0.91	0.76	1.00
p değeri	0.13	0.15	0.08	0.33	0.003	0.36	0.87	0.52	0.0000
Kanser-G2 (Grup 9)									
Kat değişimi	0.77	9.49	3.89	0.59	11.46	0.53	2.03	0.85	1.00
p değeri	0.36	0.002	0.60	0.26	0.0002	0.10	0.81	0.73	0.0000
Kanser-G3 (Grup 10)									
Kat değişimi	1.27	6.88	9.28	0.46	4.12	0.83	3.23	0.50	1.00
p değeri	0.23	0.11	0.12	0.55	0.14	0.87	0.055	0.26	0.0000

4.1. OCT4

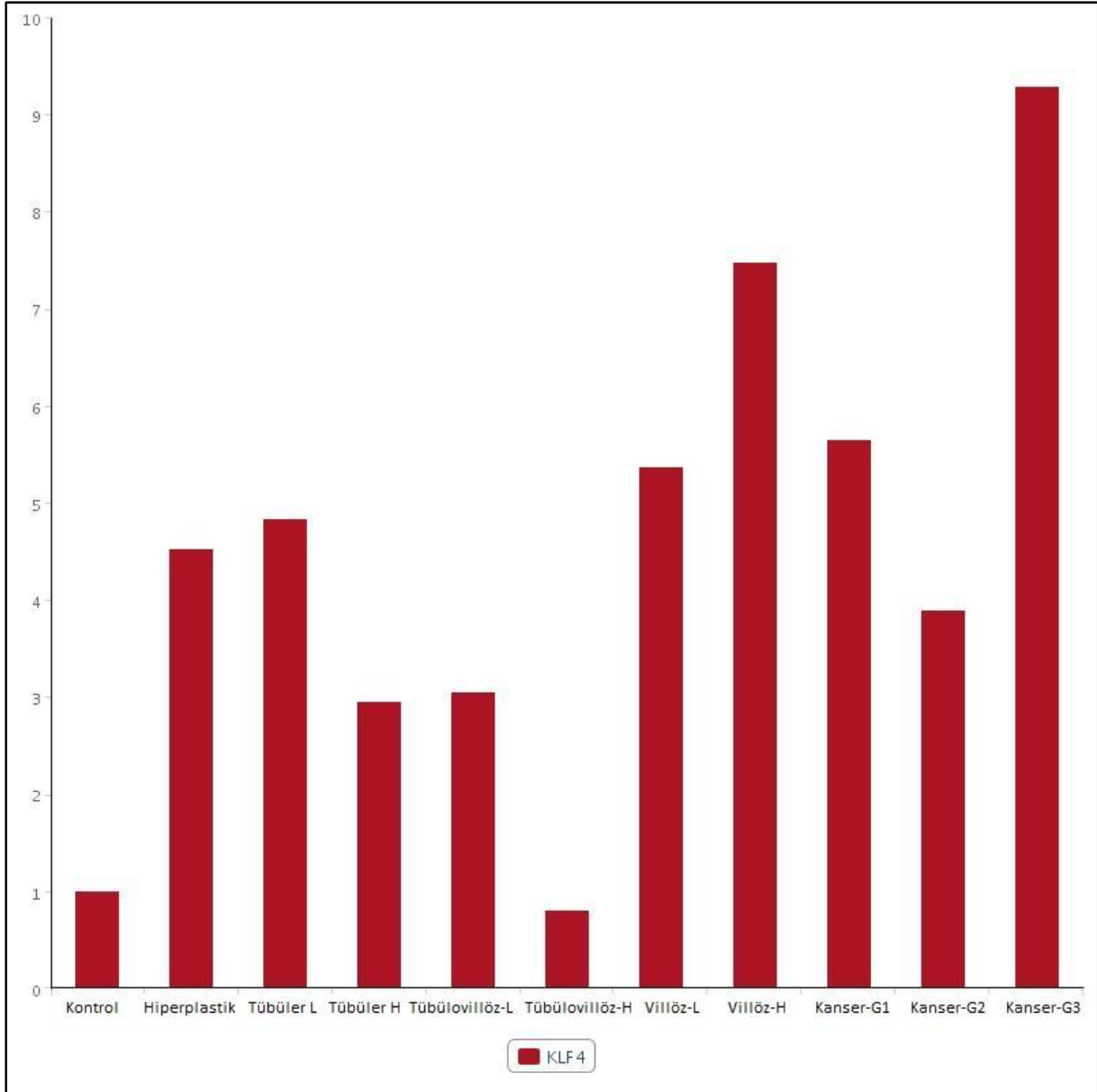
Normal grupta muhtemelen intestinal kök hücrelerle ilişkili olarak ekspresyonunu gördüğümüz POU5F1 poliplerinde düşük ekspresyonla seyretmesine rağmen kanser dokularında (grup 8, 9, 10) tekrar pik yapmaktadır. Villöz ve yüksek dereceli displazi özelliği sergileyen dokularda (grup 5, 6, 7) diğer poliplere göre ekspresyonunun artmaya başladığını görmekteyiz (Şekil 9).



Şekil 9: Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların POU5F1 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi

4.2. KLF4

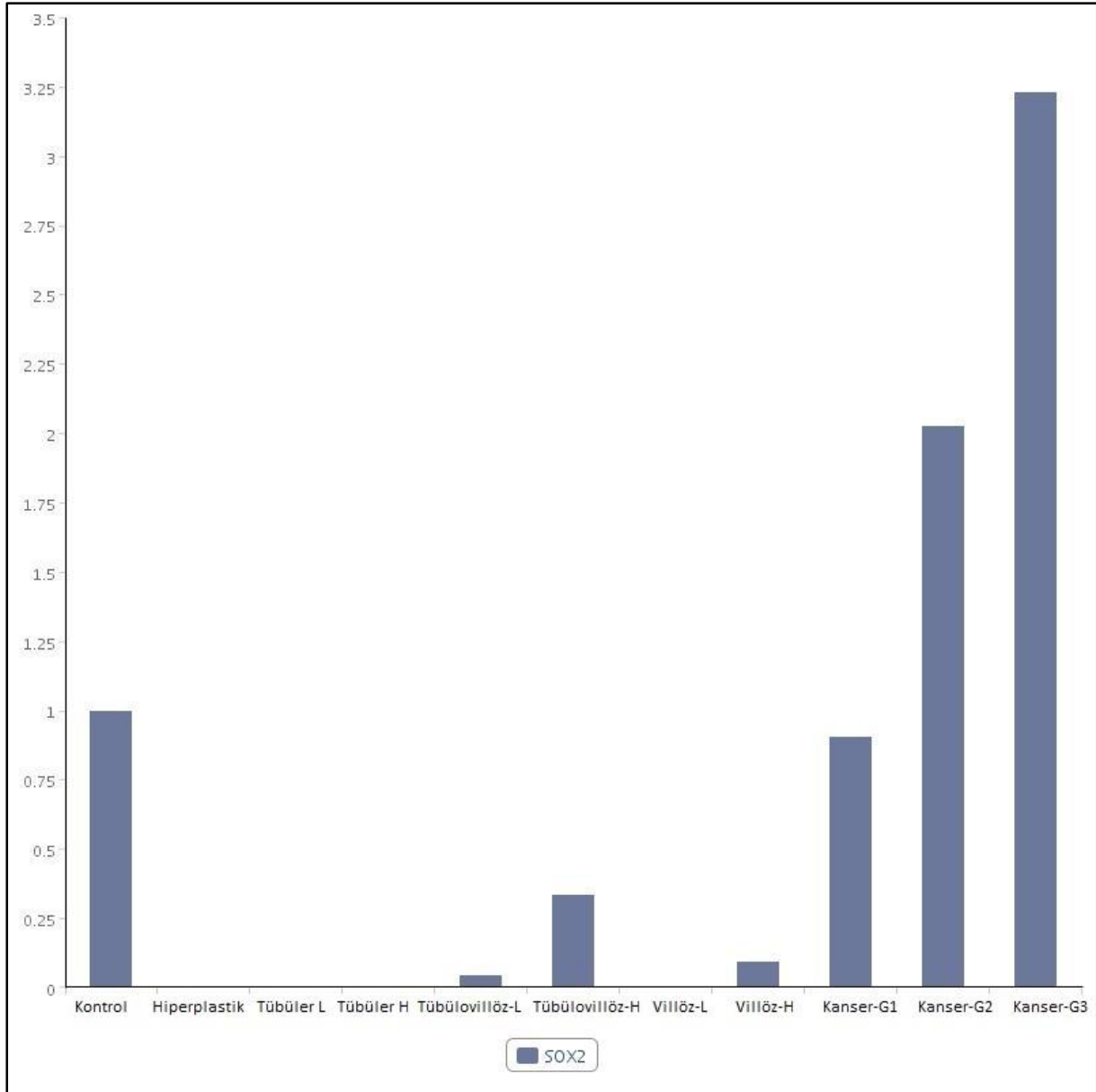
Normal, hiperplastik ve tübüler grupta muhtemelen intestinal kök hücrelerle ilişkili olarak ekspresyonunu gördüğümüz KLF4'ün kanser dokularında yüksek ekspresyonu dikkat çekmektedir. Villöz ve yüksek dereceli displazi özelliği sergileyen dokularda (grup 7) diğer poliplere göre ekspresyonunun artmaya başladığını görmekteyiz (Şekil 10).



Şekil 7: Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların KLF4 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi

4.3. SOX2

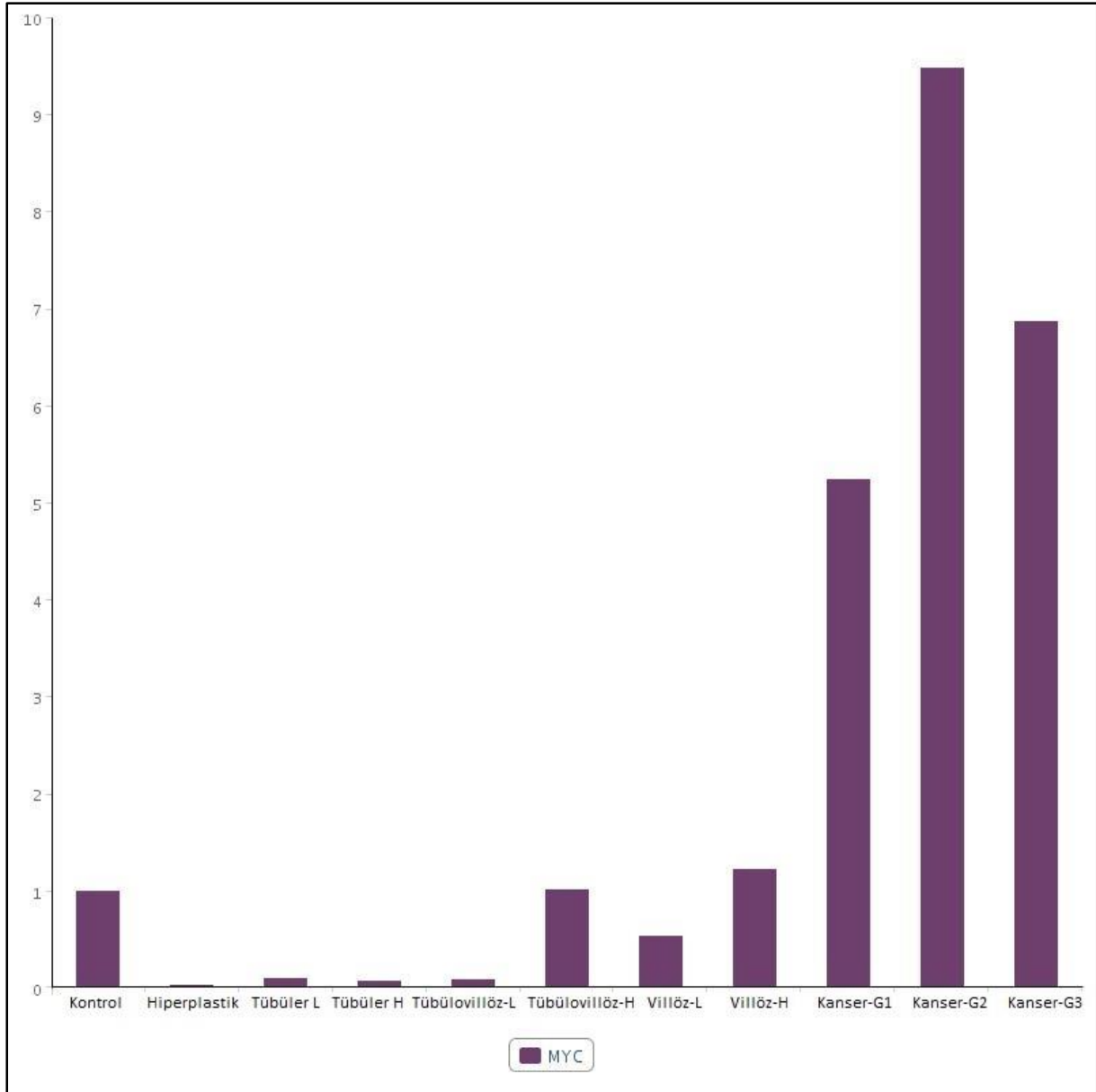
Hiperplastik ve tübüler poliplerde ekspresyonunu düşük seviyede gördüğümüz SOX2, displazi ve villöz özelliklerin kazanılmasıyla tekrar artmakta ve kanserli dokularda pik yapmaktadır (Şekil 11).



Şekil 11: Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların SOX2 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi

4.4. MYC

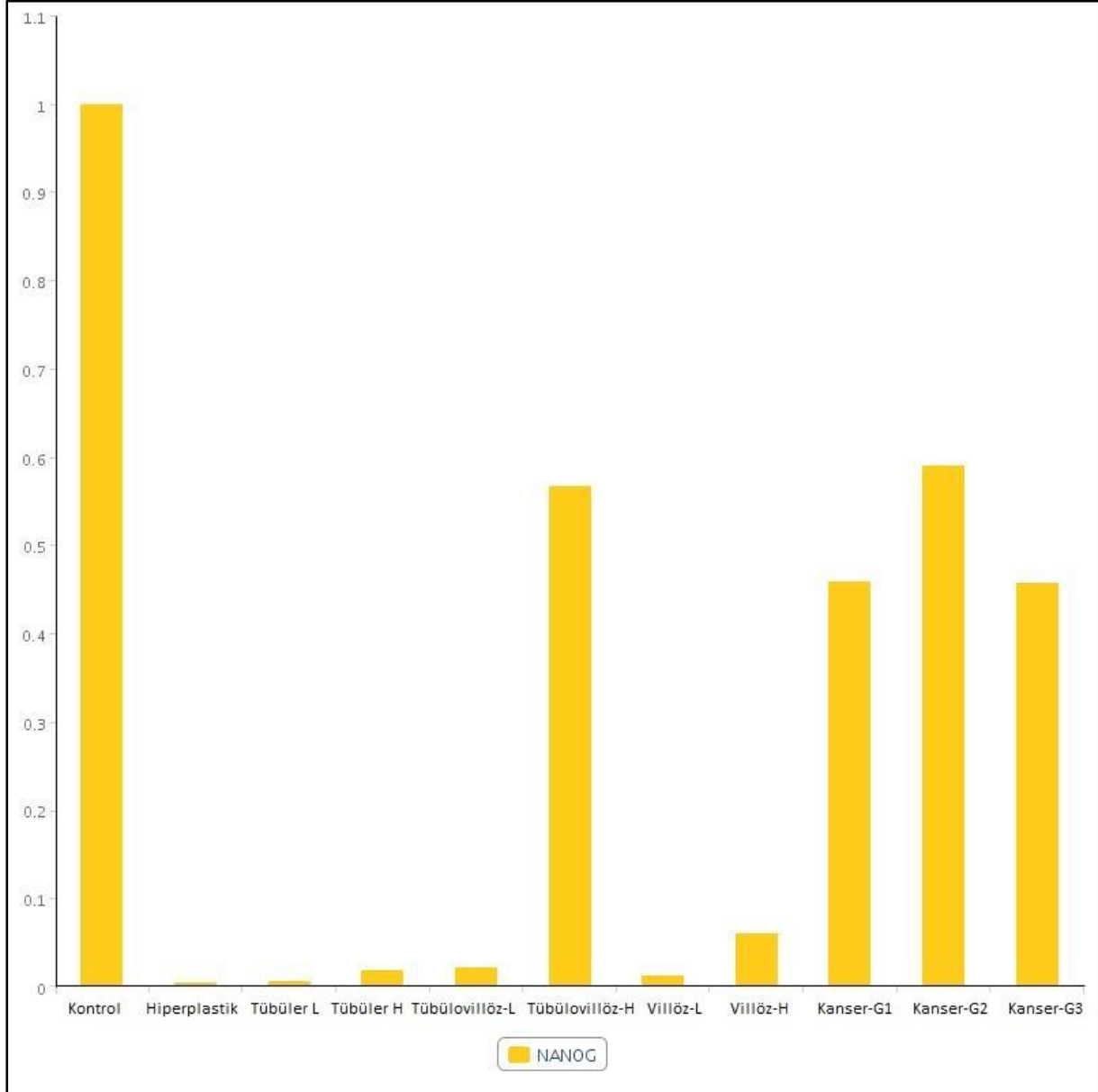
Hiperplastik ve tübüler poliplerde ekspresyonunu düşük seviyede gördüğümüz MYC, HGD ve villöz özelliklerin kazanılmasıyla (grup 5, 6, 7) tekrar artmakta ve kanserli dokularda (grup 8, 9, 10) pik yapmaktadır (Şekil 12).



Şekil 12: Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların MYC geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi

4.5. NANOG

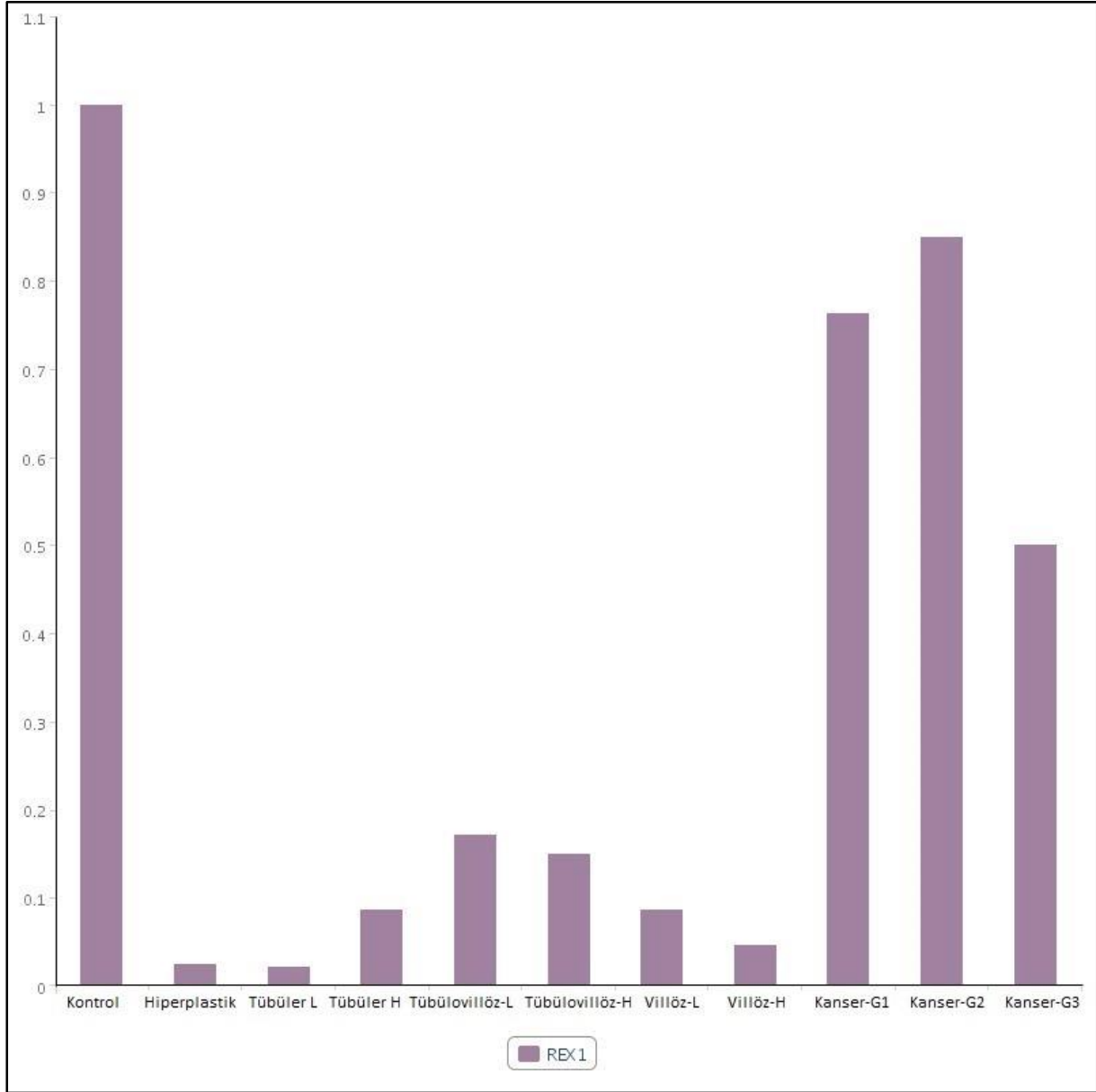
Dokularımızda NANOG ekspresyon seviyelerini normal dokularla kıyaslandığında düşük olarak görmekteyiz (Şekil 13). Kanser dokusunda baskınlığı tekrar artmaktadır.



Şekil 13: Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların NANOG geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi

4.6. REX1

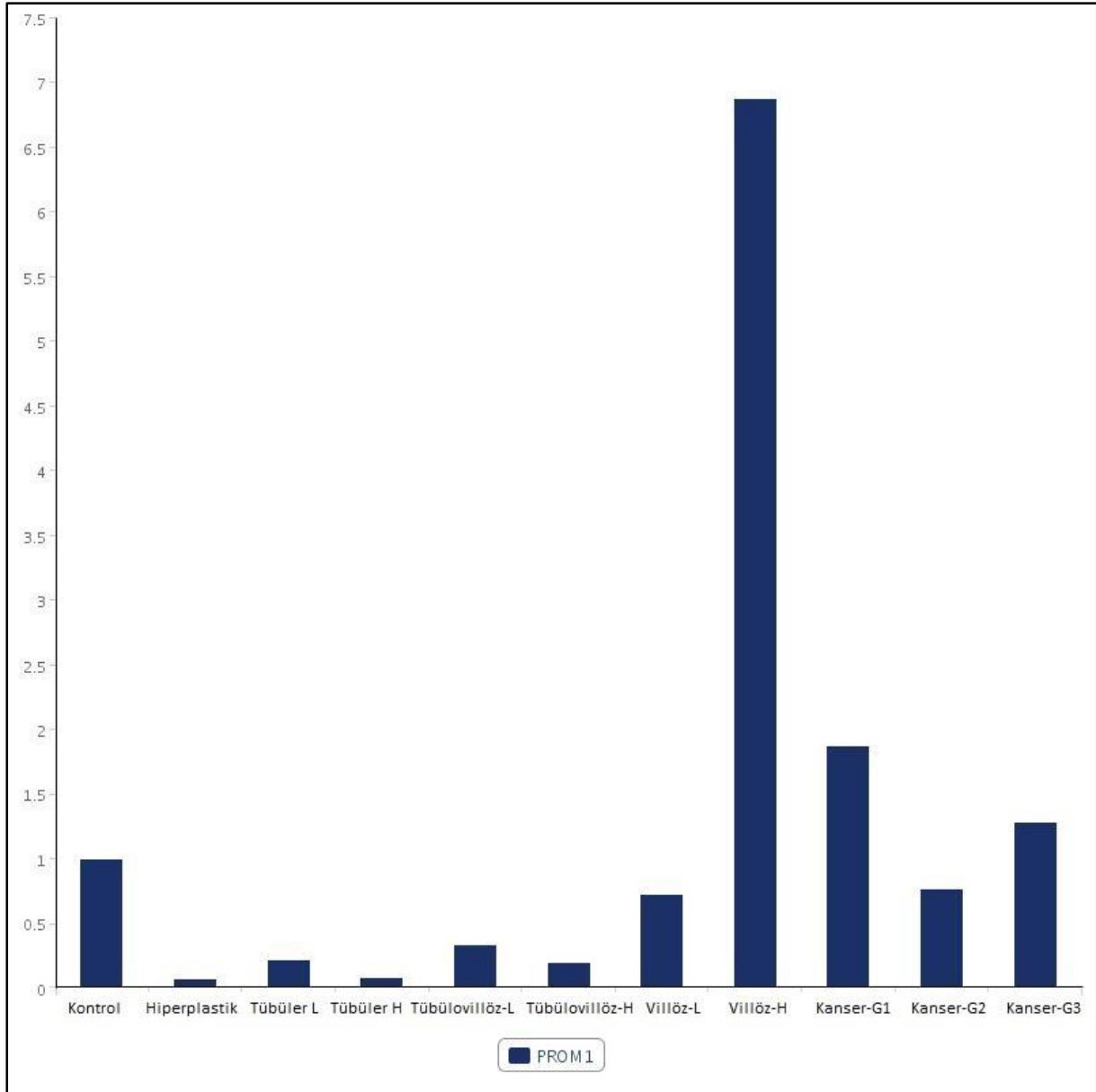
Dokularımızda REX1 ekspresyon seviyelerini normal dokularla kıyaslandığında düşük olarak görmekteyiz. Kanser dokusunda baskınlığı tekrar artmaktadır. (Şekil 14)



Şekil 14: Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların REX1 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi

4.7. CD133

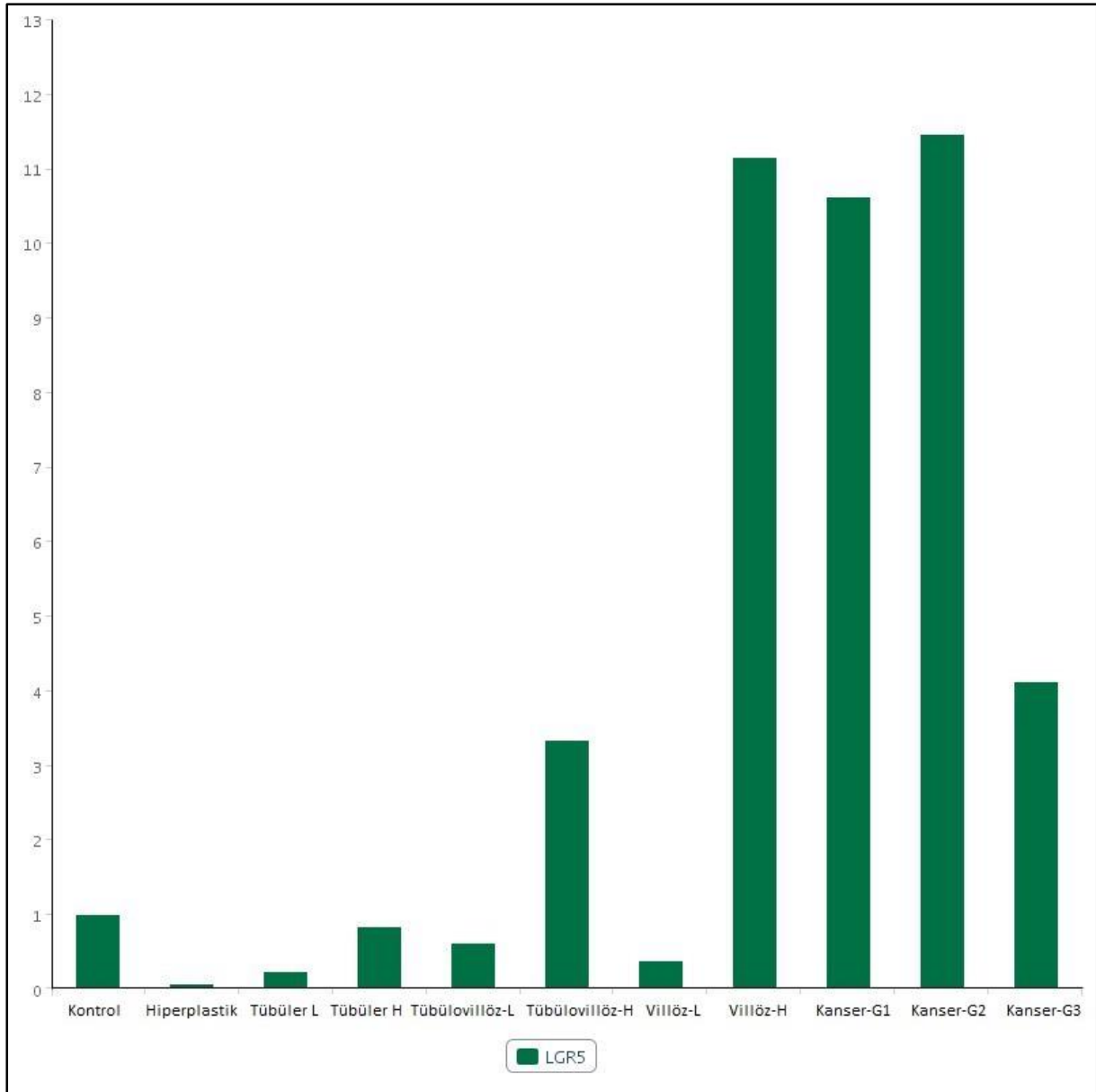
Hiperplastik, tübüler ve tübülovillöz poliplerde ekspresyonunu düşük seviyede gördüğümüz CD133, HGD ve villöz özelliklerin kazanılmasıyla (grup 7) tekrar artmakta ve kanserli dokularda (grup 8, 9, 10) baskınlığını göstermektedir (Şekil 15).



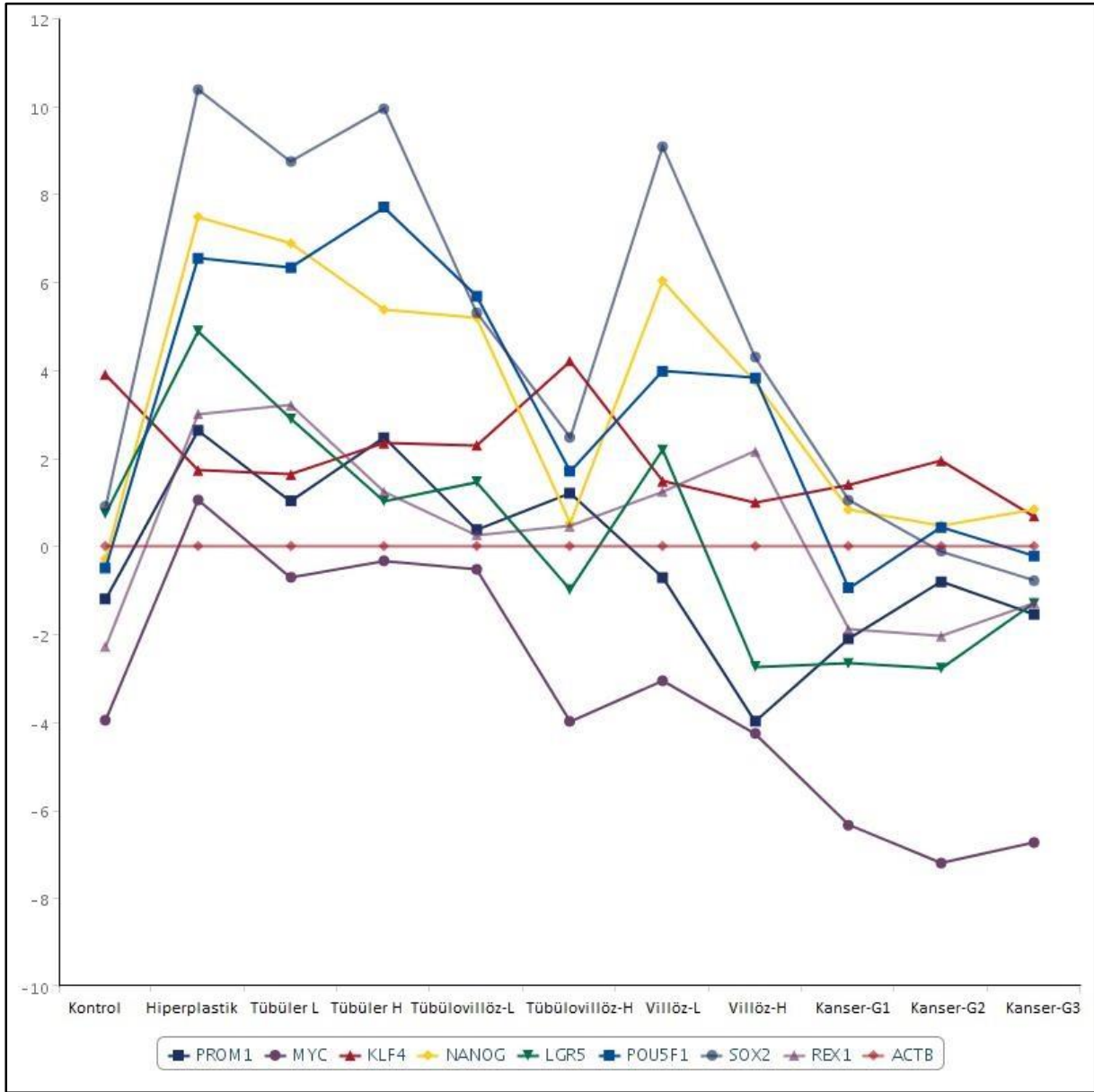
Şekil 15: Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların PROM1 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi

4.8. LGR5

Yüksek dereceli displazi gösteren poliplerde (grup 3-5-7) ve kanser dokularında (grup 8, 9, 10) ekspresyonu çok artmıştır. Normal dokudan kansere gidildikçe artan derecede ekspresyon paterni sergilemesi kansere yaklaşıldıkça LGR5 hücrelerinin ortamdaki baskınlığının arttığına iyi bir göstergedir (Şekil 16).

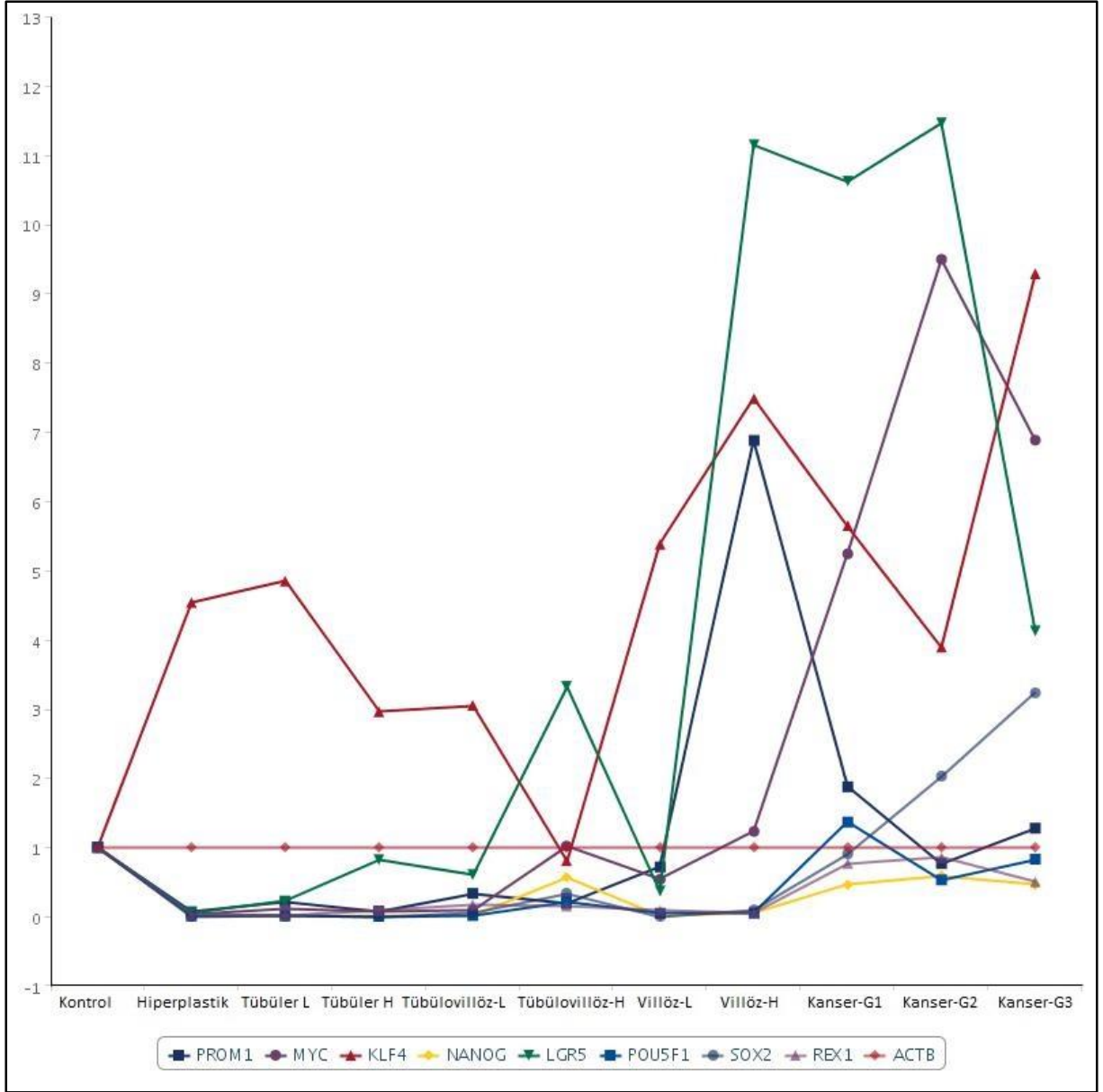


Şekil 16: Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların LGR5 geni ekspresyonlarının kolonlar şeklinde gösterimi



Şekil 17: Multigrup plot grafiği üzerinde ortalama delta CT değerlerine göre grupların gen ekspresyonlarının çizgisel şekilde gösterimi

Normal-polip dokulardan kansere doğru gidildikçe ortamda MYC, PROM1 ve LGR5 genlerini yüksek derecede eksprese eden hücrelerin varlığı artmaktadır (Şekil 17 ve 18). KLF4 ekspresyonu her ne kadar kanser dokularında baskın olsada adenomlarda yüksek ekspresyon paterni sergilediğinden dolayı istatistiksel olarak anlamlı çıkmamaktadır (Şekil 10 ve 18).



Şekil 18: Multigrup plot grafiği üzerinde kat değişimlerine göre grupların gen ekspresyonlarının çizgisel şekilde gösterimi

5. TARTIŞMA

Kolon kanseri (KK), dünyada en sık görülen üçüncü kanser olup kanser ölümlerinin en sık dördüncü sebebinin oluşturmaktadır. Batı ülkelerinde sık görülür ve insidansı yıldan yıla artmaktadır. KK gelişme riski yaş, kronik hastalık öyküsü ve yaşam tarzı gibi kişisel özellikler veya alışkanlıklar ile ilişkilidir. KK, onkogenleri, tümör süpresör genleri ve DNA onarım mekanizmalarıyla ilgili genleri hedef alan mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Mutasyonun kökenine bağlı olarak, kolorektal karsinomlar sporadik (%70), kalıtsal (%5) (Lynch Sendromu, FAP, MAP) ve ailevi (%25) (Ailevi olarak artmış riskle ilişkilendirilmiş ancak genetik ve kalıtım olarak durumu net olmayan durumlar) olarak sınıflandırılabilir (5). NP'nin çoğu kansere dönmese de, KK'nın çoğunlukla adenomatöz poliplerden kaynaklandığı kabul edilmiştir. Polipin invazif karsinoma dönüşmesi histopatolojik tipi ve boyutu ile ilişkilidir. Tübüler adenomlarda risk %5 iken villöz adenomlarda bu risk %50'ye çıkar. Tübülovillöz adenomlar ise %22 oranla ikisi arasında bulunmaktadır (131). Aslında bütün adenomlar belli derecelerde, anormal bez yapısı ve hücre içi yapısal hasarla kendini gösteren, displazi sergilerler. Displazinin derecesi de adenomun kansere dönüşümünü belirler. Yüksek dereceli displazilerin (HGD) kansere dönüşme riski düşük dereceli displazilere (LGD) göre daha fazladır. Poliplerin kansere dönüşümünde temel olarak üç genetik değişim ve mekanizma belirtilmiştir: proto-onkogenleri aktif onkogenlere dönüştüren, tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarını bozan ve DNA onarımından sorumlu genlerin hasarıyla ilişkili mutasyonlar (17, 236). Adenomun karsinoma dönüşümündeki önemli nokta neoplastik hücrelerin bazal membrana nüfuz etmeleri ve metastatik özellik kazanmalarındır (237). KK gelişiminden sorumlu tümör baskılayıcı genler APC, DCC ve p53 iken proto-onkogenler grubunda KRAS ve MYC bulunmaktadır. DNA onarımındaki bozukluktan sorumlu genler ise MLH1, MSH2 ve MSH6'dır (237). Bununla birlikte, adenomdan karsinoma dönüş sadece belli genlerdeki mutasyonlarla açıklanamaz.

Tümörler farklı yapı ve fonksiyona sahip hücrelerin karışımından oluşan heterojen bir yapıya sahiptirler. Bu heterojen yapının kökeninde ise kanser kök hücrelerinin (KKH) yattığı

düşünülmektedir (146, 147). KKH birçok kanserde tümörün başlangıcından, tekrar ortaya çıkmasından, tedavi direncinden, farklılaşmadan, invazyon ve metastazdan sorumlu tutulan kendi kendini yenileyebilme özelliği taşıyan hücrelerdir (148-150). Kanser dokusunda çok küçük miktarda olmalarına rağmen kanser tedavisindeki başarısızlığın en önemli sebeplerinden biri olarak görülmektedirler (150).

KKH DNA metilasyon çalışmaları, KKH'nın normal kök hücrelere değil de embriyonik kök hücrelere benzediğini ortaya çıkarmıştır (156). Benzer gen ekspresyon profiline sahiptirler. Normal hücre, kök hücre veya kanser hücrelerinden köken alabilen KKH ayrıca indüklenmiş pluripotent kök hücrelere (iPSC) de benzemektedirler. Bu bağlamda aslında yeniden programlanmış kanser hücreleri olarak görülebilirler. iPSC ilişkili faktörler KKH için çok önemlidir. Dolayısıyla çalışmamızda hem embriyonik kök hücreleriyle, indüklenmiş pluripotent kök hücreleriyle ve hem de KKH ile ilişkili olan transkripsiyon faktör genleri (OCT4, KLF4, SOX2, MYC, NANOG ve REX1) ve hücre yüzey belirteçleri (CD133, LGR5) seçilmiştir.

Karsinogenezisin stokastik modeli, kanserin bölünen bir somatik hücrede genetik mutasyon birikiminin bir sonucunu olarak kontrolsüz çoğalma yeteneği kazandığını ve hücre döngüsü bozukluklarına sahip olduğunu savunur. Karsinogenezin hiyerarşik modeli, kanserin kök hücrelerdeki mutasyonlardan kaynaklandığını ve bunun da kök hücre benzeri bir muadili, "kanseri kök hücresi" ortaya çıkardığını ileri sürer. Kanser kök hücreleri, heterojen bir tümör popülasyonu üretmek için kendiliğinden yenilenme ve farklılaşmaya uğrayabilir (238).

İlginç olarak, kök hücreler ve kanser hücreleri, özellikle kendi kendine yenilenme ve farklılaşma gibi bazı özellikleri paylaşmaktadır. Son zamanlarda birçok grup, ES hücrelerine özgü ekspresyon markırlarının birçok insan kanserinde ve fare kanseri modellerinde bulunduğunu ve bu paylaşılan özelliklerin kanser tedavisi için yeni yaklaşımlar getireceğini bildirmiştir. Homeodomain protein OCT4 (POU5F1), SRY kutusu içeren faktör SOX2 ve NANOG dâhil olmak üzere transkripsiyon faktörlerinden oluşan küçük bir kadro, ES hücre pluripotensinin kontrolünde anahtar düzenleyici faktörler (veya ES hücre çekirdeği faktörleri) olarak tanımlandı (239). Dikkat çekici bir şekilde, Yamanaka ve arkadaşları, dört transkripsiyon faktörü: OCT4, SOX2, KLF4 ve MYC'in eklenmesiyle, somatik hücrelerin ES hücre benzeri hücrelere (uyarılmış pluripotent stem (iPSC) hücreler) yeniden programlanabileceğini göstermişlerdir (162). Kök hücreler ve kanser hücreleri tarafından paylaşılan benzerliklerin, 'embriyonik' durumla alakalı paylaşılan gen ifadesi düzenlemesi

paternleri ile ilişkili olabileceği hipotezi ileri sürülmüştür. Dahası, somatik hücre yeniden programlamaya odaklanan son çalışmalar, kanser hücreleri ile iPS hücreleri arasındaki benzerliği vurgulamaktadır (240). Yeniden programlama işlemi sırasında pluripotensin edinilmesi, bazı kanserler için önerilen farklılaşma işlemi anımsatır (241). Kanser kök hücrelerinin kendi kendine yenilenebilme özelliklerini açıklamaya çalışırken, ES hücreye özgü ifade paternleri tanımlanmıştır (240).

Çalışmamız kök hücre benzeri özellikler taşıyan hücrelerin adenomdan kansere doğru gidildikçe artmakta olduğunu desteklemektedir (Şekil 17 ve 18).

Normal grupta muhtemelen intestinal kök hücrelerle ilişkili olarak ekspresyonunu yüksek gördüğümüz POU5F1 poliplerde çok fazla eksprese olmamasına rağmen kanser dokularında tekrar pik yapmaktadır. Villöz ve yüksek dereceli displazi özelliği sergileyen dokularda diğer poliplere göre ekspresyonunun artmaya başladığını görüyoruz ama istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş sergilememektedir (Şekil 9). Yamada vd. (2010) bağırsaktaki OCT4 ifadesinin, ES hücrelerinde olduğu gibi hücresel farklılaşmayı inhibe ederek displaziye neden olduğunu vurgulamışlardır (165). Schoenhals vd. (2009) makalelerinde KK'da normal dokuya göre SOX2 ve MYC ekspresyonlarının arttığını, OCT4 ve KLF4 ekspresyonlarının ise artmadığını belirtmişlerdir (167). Singovski vd.(2015) kolon kanserinde metataz çalışmışlar; OCT4, SOX2, KLF4 +/- cMYC ile reprogramlanmış kanserin metastatik özelliğinin arttığını, Nanog ekspresyonunun da arttığını ancak LGR5'in azaldığını göstermişlerdir (170). Amini vd. (2014) OCT4, SOX2, NANOG ekspresyonlarının KK de arttığını göstermişlerdir (174). Dai vd. (2013) kolorektal kanserde OCT4'ün baskılanmasının hücre göçünü, invazyonu, karaciğer metastazlarını azalttığını belirtmişlerdir (175). Bizim çalışmamıza göre normal dokuyla kıyaslandığında polip ve kanser dokularında OCT4 geninin değişmeyen ekspresyon seviyesi, bu genin tanı, tedavi ve prognoz açısından kullanılmaması gerektiğini desteklemektedir.

Normal, hiperplastik ve tübüler grupta muhtemelen intestinal kök hücrelerle ilişkili olarak ekspresyonunu yüksek gördüğümüz KLF4'ün kanser dokularında yüksek ekspresyonu dikkat çekmektedir. Villöz ve yüksek dereceli displazi özelliği sergileyen dokularda diğer poliplere göre ekspresyonunun artmaya başladığını gözlemledik (Şekil 10). KLF4, β -katenin aktivitesini inhibe ederek KK karsinogenezisinde önemli bir yol olan Wnt sinyalizasyonunu inhibe eder (185). KLF4, hücre proliferasyonunun önemli bir düzenleyicisidir ve gastrointestinal sistemin epitel hücrelerinde maksimum seviyede eksprese edilir. KLF4

geninin genetik ve epigenetik değişikliklerle inaktivasyonu kolorektal kanserlerde bildirilmiştir. Choi vd. KLF4 ekspresyonunun kaybının kolorektal kanser için erken bir olay olarak tümör gelişiminde rol oynayabileceğini göstermişlerdir (186). Shie vd. (2000) KLF4'ün kolon adenomlarında ve kanserinde ekspresyonunun azaldığından bahsetmiştir (187). Choi vd. (2006) KLF4'ün KK'da azaldığını belirtmişlerdir (186). Patel vd. (2010)'e göre KLF4 ekspresyonu kolon kanserinde önemli ölçüde azaltılmıştır (189). Zhang vd. (2006)'e göre KLF4 ve beta-katenin, normal bağırsak homeostazisini ve tümörün baskılanmasını düzenler (185). Çalışmamızda KLF4 ekspresyonunun azalmadığını tam tersine kansere doğru gidildikçe arttığı tespit edildi. Hu vd. (2011) de KLF4 ekspresyonunun normal-adenom-kansere gidildikçe arttığını belirtmişlerdir (190). Leng vd. (2013)'e göre KLF4, KK kök hücre zenginleştirilmiş sferoid hücrelerinde onkojen olarak davranır (191). Ghaleb vd. (2007)'e göre KLF4, APC mutasyonu varlığında bağırsak adenomlarının gelişiminin desteklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (192). Çalışmamızda Hu vd. (2011), Leng vd. (2013) ve Ghaleb vd. (2007)'nin ortaya koyduğu sonuçlar ile paralellik gösterecek şekilde KLF4 geninin ekspresyonunda artma tespit ettik.

SOX2, transkripsiyon faktörlerinden SRY ile ilgili HMG-kutusu (SOX) ailesinin bir üyesini kodlayan tek ekzonlu bir gendir. Hiperplastik ve tübüler poliplerde ekspresyonunu düşük seviyede gördüğümüz SOX2, displazi ve villöz özelliklerin kazanılmasıyla tekrar artmakta ve özellikle kanserin ilerleyen evrelerindeki dokularda artış göstermekle birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamsızdır (Şekil 11). Otsubo vd. (2011) microRNA-126'nın, SOX2 ekspresyonunu önleyerek gastrik karsinogeneze katkıda bulunduğunu belirttiler (178). Kuzmichev vd. (2012) OCT4'ün CD133 hücrelerini artırdığını LGR5'i etkilemediğini SOX2'nin ise ikisini de uyardığını göstermişlerdir (179). Çalışmamızda KLF'in ekspresyonlarının birbirleriyle ilişkili olduğunu görüyoruz. Neumann vd. (2011)'e göre SOX2'nin artmış ekspresyonu, uzak metastazlar ve lenf nodu metastazlarıyla ilişkilidir (180). Fang vd. (2010) KK'da SOX2 geninin ChIP-seq ve fonksiyonel analizini gerçekleştirmişler ve kanserde fazla eksprese olduğunu göstermişlerdir (181). İstatistiksel olarak anlamsız çıkmış olsa da diğer çalışmalarla uyumlu olarak bu genin kanser dokularında diğer dokulara göre ekspresyonunun yüksek seviyelerde seyretmesi, kanser oluşumunda rol oynayabileceğini göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada hiperplastik ve tübüler poliplerde ekspresyonunu düşük seviyede gördüğümüz MYC, HGD ve villöz özelliklerin kazanılmasıyla tekrar artmakta ve kanserli dokularda pik yapmaktadır (p: 0.002) (Şekil 12). Somatik hücrelerde yeniden

programlamayı kolaylaştırmak için kullanılan faktörlerden biri olan MYC, bilinen bir onkogendir. MYC, bir gen aktivasyon işlevine sahiptir ve bu bulgu, MYC'nin birden fazla koaktivatör kompleksini düzenleme kabiliyeti ile tutarlı bir bulgudur (194). MYC ekspresyonunun onkogenik deregülasyonu, normal gelişim sırasında tümör fenotipine sahip hücreler üretir. Yüksek MYC ekspresyon seviyeleri, hücre farklılaşmasını bloke edebilir ve işlenmiş ve farklılaşmış hücrelerin kendi kendini yenilemelerini geliştirebilir (195). Tümör progresyonu sırasında MYC, gelişimsel plastisiteyi koruyan kanser başlatan hücrelerin oluşumunu teşvik eder. Çalışmanın sonucunda görülen MYC ekspresyonundaki artış, hem kanserin hem de KKH'nın varlığını desteklemektedir.

Polip ve kanser dokularımızda normal dokularla kıyaslandığında NANOG ekspresyon seviyelerini düşük olarak tespit ettik (Şekil 13). Buna mukabil kanser dokusunda NANOG ekspresyonu tekrar artmaktadır. Normal dokularda intestinal kök hücrelerle ilişkili olarak ekspresyonu mevcutken, kanser dokularında KKH ile ilişkili bir şekilde ekspresyon artışı görünüyor olabilir. SOX2 ve OCT4 ile birlikte NANOG, ESC'lerin özelliklerini korumada önemli bir rol oynamaktadır. Bir transkripsiyonel ağ oluşturarak, üç anahtar faktör genel olarak birlikte çalışır ve bir bütün pluripotent ilgili genlerin sentezlenmesini kontrol ederek ESC'lerin çoğalmasını sağlar. İnsan kolon kanserinde, NANOG ekspresyonunun artan seviyeleri, ilerlemiş kanser evreleri ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Büyük olasılıkla kolon kanserinde NANOG ekspresyonunun fonksiyonel olarak önemi vardır. Çünkü NANOG geninin fazla eksprese olması kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırmaktadır (203). Çalışmamızda tüm dokularımızda kontrol grubuna göre NANOG ekspresyonunun düşük olduğunu görmekteyiz. Bu sonuçlar ışığında NANOG ekspresyon düzeylerini proliferasyon ve kötü prognoz ile ilişkilendirmek anlamlı olmayacaktır. Bulgularımız NANOG ekspresyon düzeylerinin azalmasının polip ve kanserle ilişkili olduğunu desteklemektedir ve literatürle uyuşmamaktadır.

REX1, pluripotensinin bilinen bir markeri olup genellikle farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde teratokarsinoma hücrelerinde bulunur. Bir pluripotent belirteç olmasının yanı sıra, regülasyonu pluripotent durumun korunması için kritik önem taşır. Hücreler farklılaşmaya başladığında, REX1 şiddetli ve aniden aşağı regüle olur (227, 228). Çalışmamızda, polip ve kanser dokularında REX1 ekspresyon seviyeleri normal dokularla kıyaslandığında düşük olarak görülmektedir. Fakat adenomdan kanser dokularına gidildikçe ekspresyonu tekrar artmaktadır. (Şekil 14) REX1 kök hücrelerin farklılaşmasıyla ortadan kaybolmaktadır. Burada NANOG gen ekspresyonundaki azalma benzeri bir durum söz

konusu olabilir. Kanser dokularının yüksek miktarda KH içermesi, tekrar REX1 ekspresyonlarının artmasını sağlar. OCT-3/4 ve SOX2'nin her ikisi REX-1'i transaktive edebilseler de, sadece SOX2, REX-1'in yüksek ekspresyonunda NANOG ile birlikte çalışır (228). Çalışmamızda bu genlerin ekspresyonlarının birbirleriyle bağlantılı olarak mevcut olduğunu veya arttığını gözlemlemekteyiz. Mongan vd. (2006) REX1'in normal epitel ve teratoma gibi bazı kanser hücrelerinde artmış ekspresyonundan bahsetmişlerdir (229). Raman vd. (2006) böbrek hücreli karsinomada normal dokuya göre insan kök hücre markeri REX-1'in (ZFP-42) azaltılmış ekspresyonundan, OCT4 ekspresyonunun değişmediğinden bahsetmişlerdir (230). REX-1 gen ürününün, NANOG geninin doğrudan bir hedefi olduğu ve bunun SOX2 ve OCT-3/4 tarafından artırıldığı bildirilmiştir (228). Kim vd. (2011) REX1'in glioblastomada yüksek seviyede eksprese olduğunu ve baskılanmasının kemoterapötik etkiyi artıracağını belirtmişlerdir (231). Schuebel vd. (2007) ZFP42 geninin kolon kanseri ve hücre hatlarında normal hücrelere göre metillenip susturulduğunu göstermişlerdir (232). Çalışmamız REX1 ekspresyonunun normal dokuya göre polip ve kanserli dokularda azaldığını göstermektedir.

Hiperplastik, tübüler ve tübülövilöz poliplerde ekspresyonunu düşük seviyede gördüğümüz CD133, HGD ve villöz özelliklerin kazanılmasıyla tekrar artmakta ve kanserli dokularda ekspresyonda artış göstermektedir (Şekil 15). Özellikle villöz HGD'li polipte (grup 7) CD133 geninin artan ekspresyonu, CD133'ü çokça eksprese eden hücrelerin varlığını kanıtlamaktaydı (p: 0.01). Shmelkov vd. (2008) CD133'ün kök hücrelerle sınırlı olmadan normal kolonik epitelde her yerde eksprese edildiğini rapor etmişlerdir (208). Önceki çalışmalar, CD133 ekspresyonunun beyin tümörlerine benzer şekilde insan kolon kanserlerinde tümör başlatan hücreleri zenginleştirmek için yararlı olduğunu gösterdi (209). Bağırsakta, transit amplifiye edici öncüler (TAP) ve bağırsak kök hücreleri (ISC) olmak üzere iki çoğalan hücre popülasyonu vardır. Prominin1 (PROM1) her iki popülasyonu işaretlerken, LGR5 ISC'lerde ifade edilir (57). Hibi vd. (2009) gelişmiş KK'da CD133 geninin demetilasyonunun sıklıkla saptanacağını vurguladılar (210). Saigusa vd. (2009) CD133, OCT4 ve SOX2 ekspresyonlarının rektal kanserde kötü prognozla ilişkili olduğunu iddia etmişlerdir (211). Galizia vd. (2012)'e göre CD133 veya CD44 aşırı ekspresyonu KK rekürrensi ile ilişkili değildir. Ama kötü prognozla bağlantılı olduğunu ifade etmektedirler (212). Handra-luca vd. (2013) LGD adenomlarda HGD'ye göre ekspresyon artışı saptamışlardır (213). Mohammedi vd. (2013) CD133'ün hiperplastik polipe göre sesil serrate poliplerde daha fazla eksprese olduğunu göstermişlerdir (214). Sahlberg vd. (2014) CD133

eksprese eden hücrelerin radyasyona daha dirençli olduğunu belirtmişlerdir (215). Biz de mevcut çalışmalarla tutarlı olarak CD133'ün özellikle villöz HGD ve kanser dokularında yüksek ekspresyonunu ve bunun kanser başlatan hücreler ve kötü prognozla ilişkili olabileceğini tespit ettik.

LGR5, kolon KKH'nın en önemli belirteçlerinden biridir (242). LGR5 özellikle yüksek dereceli displazi gösteren poliplerde (p: 0.01) (grup 3, 5, 7) ve kanser dokularında ekspresyonu giderek artmaktadır (p: 0.003 ve 0.0002). Normal dokudan kansere gidildikçe artan derecede ekspresyon paterni sergilemesi kansere yaklaşıldıkça LGR5 ifade eden hücrelerin ortamdaki baskınlığının arttığına iyi bir göstergedir (Şekil 16 ve 18). LGR5 geni ekspresyon artışının adenomlar içindeki dağılımı, erken neoplastik lezyonlarda bir kök hücre / progenitör hücre hiyerarşisinin korunduğunu gösterir (56). Fan vd. (2010) normal kolon dokusundan kansere gidildikçe beta-kateninle orantılı olarak LGR5 ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir (219). Amsterdam vd. (2013) LGR5'in ekspresyonunun muhtemelen kötü diferansiye tümörlerin kök hücrelerine spesifik olduğunu, buna karşılık NANOG'un esas olarak yüksek derecede diferansiye tümörlerin kenarlarında eksprese edildiği sonucuna varmışlardır (220). Chai vd. (2013) LGR5 ekspresyonunun normal kolonda olmadığını, polipten kansere dönüşümde giderek arttığını belirtmişlerdir (221). Walker vd. (2011) LGR5'in tümör oluşumunu engellediğini; bunun aksine Baker vd. (2015) LGR5'in adenomlarda ve KK'de fazla eksprese olduğunu ve hücrelerin invazyonunu ve agresifliğini artırdığını belirtmişlerdir (222, 223). Takahashi vd. (2011) kolorektal kanser gelişiminde LGR5'in fazla eksprese olduğunu ve LGR5 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (224). Asfaha vd. (2015) LGR5+ hücrelerin radyasyona duyarlı olduğunu, dirençte rol oynamadığını ve KRT19+ hücrelerinin dirençten sorumlu olduğunu belirtmişlerdir (225). LGR5'in HGD ve kanserli dokulardaki artmış ekspresyon seviyeleri kötü prognoz ile ilişkilidir.

KİF kanser oluşumundaki Wnt, BMP4 ve TGFb gibi en önemli yollarla ilişkilidir. Bu sinyal ağları doku homeostazisinden sorumludur. Özellikle onkogenik fenotiple çok yakından ilişkili olan Wnt yolağı hücre gelişimi ve kök hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (99). Normal bağırsak KH'nın önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilen Wnt yolağı, KKH'nın düzenleyicisi olarak da tespit edilmiştir (101, 102). Kolorektal kanserlerin %90'ı Wnt yolağını aktiflenmesinden sorumlu β -katenin ve APC mutasyonları içermektedir (102).

Kanser dokularındaki KİF ekspresyon artışları KKH varlığını desteklemektedir. Burada en çok dikkat çeken nokta villöz HGD poliplerinde LGR5, PROM1 ve KLF4 baskınlığının ayrıca MYC ekspresyon artışının gözlenmesidir. LGR5 ve CD133 en önemli kolon KKH belirteçleridir. LGR5'in intestinal sistemde tümör başlatan hücreleri gösterdiğine dair birçok çalışma bulunmaktadır (225, 243). Benzer şekilde CD133 ifade eden hücreler de kanser başlangıcından sorumlu tutulmuştur (244, 245). Çalışmamız kanser başlatan hücrelerin HGD polipler ile birlikte ortaya çıkmaya başladığını desteklemektedir. Burada KKH ve TIC'leri ayırmak gerekir. Kanser dokularında OKSMN beraberinde LGR5, REX1 ve PROM1 genlerinin birbirlerini destekler şekildeki ekspresyonları KKH varlığını kanıtlarken, HGD poliplerindeki LGR5 ve PROM1 ekspresyon paterni TIC varlığına işaret etmektedir. LGR5 ve PROM1 ekspresyonları tümör başlatacak hücrelerin varlığını, kök hücre ilişkili faktörlerin birlikte artmış ekspresyonları ise kanser kök hücrelerinin varlığını ve kötü prognozu göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar yeni nesil genetik tarama testlerinin temelini oluşturabilir. Halen, tümör numunelerinde sadece MSI ve KRAS mutasyonlarının belirlenmesi tanı ve tedavi yönetimi amaçlarıyla kullanılmaktadır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışma kanser kök hücre ilişkili faktörlerin özellikle HGD ve villöz özelliklerle birlikte ortaya çıktığını göstermektedir. Villöz ve özellikle HGD sergileyen poliplerin neden kansere dönüşme yatkınlıklarının fazla olduğunu desteklemektedir. LGR5, PROM1 ve MYC'in HGD ve kanserli dokulardaki artmış ekspresyon seviyeleri kötü prognozu desteklemektedir ve bunların tanı ve prognozu değerlendirmek için kullanılabileceğini göstermektedir. LGR5 ve PROM1 ekspresyonları tümör başlatan hücrelerin (TIC) varlığını desteklemektedir. HGD ve villöz özelliklerle birlikte TIC'in ortaya çıkması, bu tip poliplerde daha dikkatli olunması gerektiğini vurgulamaktadır. Kök hücre ilişkili faktörlerin birlikte artmış ekspresyonları ise kanser kök hücrelerinin (KKH) varlığını ve kötü prognozu göstermektedir.

Hiperplazi ve displazi ile ilişkilendirilen KLF4'ün, bu çalışmada da polip ve kanser evrelerinde ekspresyonunun yüksek seyretmesi kanser başlangıcıyla yakından ilişkili bir faktör olduğunu desteklemektedir. Ancak tümöre dönüşüm olasılığı düşük olan hiperplastik poliplerde yüksek ekspresyon seviyeleri sergilemesi genel olarak bu faktörün hiperplaziyle ilişkilendirilmesinin daha doğru olacağını göstermektedir.

Kanser dokularında seçilen genlerin birbirlerini destekler şeklindeki ekspresyon değişimleri dikkat çekmektedir. Bu durum kök hücre ilişkili faktörlerin ortak yollar kullandıklarını ve fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için birbirlerine ihtiyaç duydukları hipotezini destekler. Normal dokularda muhtemelen intestinal kök hücrelerle ilişkili olarak yüksek ekspresyon sergileyen KİF nedeniyle karşılaştırmaların bazıları istatistiksel olarak anlamsız çıksa da; adenomdan kansere gidildikçe artan ekspresyon paterni sergileyen KİF dikkat çekmektedir.

Adenomlarda normal dokuya kıyasla KLF4 ve HGD polipler ile artışı dikkat çeken LGR5 hariç bütün KİF'in düşük ekspresyonu, bu faktörlerin hiperplazi ve kanser başlangıcı ile ilişkilendirilmesini zorlaştırmaktadır. Hatta REX, OCT4 ve NANOG seçilen dokularda normal dokuya göre tamamen düşük ekspresyon özeliği göstermektedirler. Sadece kanser ve

adenomları kıyaslarsak KİF ekspresyon artışından bahsedebileceğiz. Kanser dokularında adenomlara göre OKSMN beraberinde LGR5, REX1 ve PROM1 genlerinin birlikte birbirlerini destekler şekilde artan ekspresyonları KKH'nın ortamdaki varlığını belirtmektedir.

Özellikle HGD ve villöz özelliklerin artmasıyla KKH'nın bir alt türü olan TIC'in arttığını söyleyebiliriz. TIC'in kanser öncesi evrede ve KKH'nın kanserle birlikte ortaya çıkması karsinogenezin hem hiyerarşik hem stokastik model teorilerini desteklemektedir. TIC'in başlatabileceği kanser dokusu (LGR5, PROM1 ve MYC'in artmış ekspresyon seviyeleri ile takip edilebilir), daha sonra kendi kanser kök hücrelerini üretebilir. Bu bağlamda villöz ve tübülövillöz HGD polipler KKH veya TIC açısından incelenebilir. Ayrıca LGR5, PROM1 ve MYC ekspresyon seviyeleri tanı ve prognozu değerlendirmede yardımcı olabilir. Bu faktörlerin yüksek ekspresyon seviyeleri KK hastalarının kan ve gayta örneklerinde de tespit edilebilir.

Çalışma KİF'in KK gelişimi üzerindeki rolleri üzerinde durmaktadır. Dokuya özgü KİF ekspresyonlarının tanımlanması, kolonik neoplazinin gelişimini ve ilerlemesini kontrol etmek için gen terapileri tasarlamaya yardımcı olacaktır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar yeni nesil genetik tarama testlerinin temelini oluşturabilir. Benzer şekilde yakın gelecekte yeni ve duyarlı spesifik biyolojik belirteçlerin geliştirilmesi ve uygulanması tanı stratejilerini geliştirecek ve böylece klinisyenlerin hastalığın en erken evrelerinde KK vakalarını bulmasına ve böylece binlerce hastanın prognozunun iyileşmesine imkân tanıyacaktır.

Tedavi bağlamında, kişiselleştirilmiş tıp, hızla vazgeçilmez bir araç haline geliyor. Bu nedenle, en uygun tedaviyi bulmak için her bir hastanın tümör özelliklerinin derinlemesine bir analizi yapılması gereklidir. KK'ya yönelik güncel araştırmaların geniş bir kısmı, konvansiyonel tedavilere göre daha az agresif ve daha etkili yeni tedavilerin geliştirilmesine odaklanmıştır. Bu alandaki bulgular ve bunların klinik uygulanması, gelecekte KK hastalarının genel hayatta kalma oranlarını ve yaşam kalitesini artıracaktır. Adenomdan karsinomaya kadar KK'nın sıralı bir şekilde ilerlemesi, hastalık ilerlemesinin doğal seyrini değiştirmek için fırsatların mevcut olduğunu vurgular. Pluripotent hücreler ve kanser hücreleri tarafından paylaşılan özelliklerin daha iyi anlaşılması potansiyel olarak klinik önem taşımaktadır. Gelecekte, ortak yollar anti-kanser ilaçları için varsayılan hedefler olabilir. Hem ES hücrelerinde hem de kanserde (veya kanser kök hücrelerinde) ve bunların düzenleyici ağlarla olan bağlantılarında ve sinyal yolları hakkında daha iyi bir anlayış gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Stewart B, Wild CP. World cancer report 2014. 2014.
2. Brody H. Colorectal cancer. *Nature*. 2015;521(7551):S1.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2005;55(2):74-108.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
5. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
6. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;348(10):919-32.
7. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(4):261-8.
8. Stoffel EM, Kastrinos F. Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2014;12(7):1059-68.
9. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2008;58(3):130-60.
10. Farraye FA, Odze RD, Eaden J, Itzkowitz SH. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2010;138(2):746-74, 74 e1-4; quiz e12-3.
11. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *The American journal of gastroenterology*. 2001;96(10):2992-3003.
12. Young AM, Hobbs R, Kerr DJ. *ABC of colorectal cancer*: John Wiley & Sons; 2011.
13. Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue. *Journal of translational medicine*. 2016;14:21.
14. Willett WC. Diet and cancer: an evolving picture. *Jama*. 2005;293(2):233-4.
15. Bastide NM, Pierre FH, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: a meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer prevention research*. 2011;4(2):177-84.
16. Cross AJ, Boca S, Freedman ND, Caporaso NE, Huang WY, Sinha R, et al. Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2014;35(7):1516-22.
17. Centelles JJ. General aspects of colorectal cancer. *ISRN oncology*. 2012;2012:139268.
18. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*: Elsevier Health Sciences; 2014.
19. Yu Y, Kanwar SS, Patel BB, Oh PS, Nautiyal J, Sarkar FH, et al. MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGFbetaR2) in colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 2012;33(1):68-76.

20. Wei EK, Wolin KY, Colditz GA. Time course of risk factors in cancer etiology and progression. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(26):4052-7.
21. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2101-14 e5.
22. Johnson IT, Lund EK. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007;26(2):161-81.
23. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-58.
24. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Familial cancer*. 2008;7(1):27-39.
25. Nieuwenhuis MH, Vasen HF. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2007;61(2):153-61.
26. Lieberman D. Progress and challenges in colorectal cancer screening and surveillance. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2115-26.
27. Harris TJ, McCormick F. The molecular pathology of cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2010;7(5):251-65.
28. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Archives of internal medicine*. 1966;117(2):206-12.
29. Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology*. 2010;56(2):167-79.
30. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical genetics*. 2009;76(1):1-18.
31. Kleinerman R, Marino J, Loucas E. Muir-Torre Syndrome / Turcot Syndrome overlap? A patient with sebaceous carcinoma, colon cancer, and a malignant astrocytoma. *Dermatol Online J*. 2012;18(5):3.
32. Vijapura C, Saad Aldin E, Capizzano AA, Policeni B, Sato Y, Moritani T. Genetic Syndromes Associated with Central Nervous System Tumors. *Radiographics*. 2017;37(1):258-80.
33. Nallamilli BR, Hegde M. Detecting APC Gene Mutations in Familial Adenomatous Polyposis (FAP). *Curr Protoc Hum Genet*. 2017;92:10 8 1- 8 6.
34. Waller A, Findeis S, Lee MJ. Familial Adenomatous Polyposis. *J Pediatr Genet*. 2016;5(2):78-83.
35. Church J, Heald B, Burke C, Kalady M. Understanding MYH-associated neoplasia. *Dis Colon Rectum*. 2012;55(3):359-62.
36. McGarrity TJ, Amos CI, Baker MJ. Peutz-Jeghers Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.
37. Jasperson KW. Genetic testing by cancer site: colon (polyposis syndromes). *Cancer J*. 2012;18(4):328-33.
38. Schreiberman IR, Baker M, Amos C, McGarrity TJ. The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review. *The American journal of gastroenterology*. 2005;100(2):476-90.

39. Thalakoti S, Geller T. Basal cell nevus syndrome or Gorlin syndrome. *Handb Clin Neurol*. 2015;132:119-28.
40. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012;62(1):10-29.
41. Mazeh H, Mizrahi I, Ilyayev N, Halle D, Brucher B, Bilchik A, et al. The Diagnostic and Prognostic Role of microRNA in Colorectal Cancer - a Comprehensive review. *Journal of Cancer*. 2013;4(3):281-95.
42. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(19):1420-5.
43. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(11):845-56.
44. Coghlin C, Murray GI. Biomarkers of colorectal cancer: recent advances and future challenges. *Proteomics Clin Appl*. 2015;9(1-2):64-71.
45. Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene*. 2004;23(7):1377-91.
46. Quintero E, Castells A, Bujanda L, Cubiella J, Salas D, Lanás A, et al. Colonoscopy versus fecal immunochemical testing in colorectal-cancer screening. *The New England journal of medicine*. 2012;366(8):697-706.
47. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *The New England journal of medicine*. 2000;343(3):169-74.
48. Galdino GM, Yee J. Carpet lesion on CT colonography: a potential pitfall. *AJR Am J Roentgenol*. 2003;180(5):1332-4.
49. Ahlquist DA, Shuber AP. Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2002;315(1-2):157-68.
50. Samowitz WS. Genetic and epigenetic changes in colon cancer. *Experimental and molecular pathology*. 2008;85(1):64-7.
51. Syngal S, Stoffel E, Chung D, Willett C, Schoetz D, Schroy P, et al. Detection of stool DNA mutations before and after treatment of colorectal neoplasia. *Cancer*. 2006;106(2):277-83.
52. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME, Colorectal Cancer Study G. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *The New England journal of medicine*. 2004;351(26):2704-14.
53. Ahmed FE, James SI, Lysle DT, Dobbs LJ, Jr., Johnke RM, Flake G, et al. Improved methods for extracting RNA from exfoliated human colonocytes in stool and RT-PCR analysis. *Digestive diseases and sciences*. 2004;49(11-12):1889-98.
54. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(4):820-3.
55. Zhu Y, Hu J, Hu Y, Liu W. Targeting DNA repair pathways: a novel approach to reduce cancer therapeutic resistance. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(7):590-6.
56. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 2009;457(7229):608-11.

57. Zhu L, Gibson P, Currle DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, et al. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature*. 2009;457(7229):603-7.
58. Schneikert J, Behrens J. The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut*. 2007;56(3):417-25.
59. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1079-99.
60. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7.
61. Brocardo M, Henderson BR. APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond. *Trends Cell Biol*. 2008;18(12):587-96.
62. Herzig DO, Tsikitis VL. Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy. *Journal of surgical oncology*. 2015;111(1):96-102.
63. Rennoll S, Yochum G. Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer. *World J Biol Chem*. 2015;6(4):290-300.
64. Li W, Qiu T, Zhi W, Shi S, Zou S, Ling Y, et al. Colorectal carcinomas with KRAS codon 12 mutation are associated with more advanced tumor stages. *BMC cancer*. 2015;15:340.
65. Kadowaki S, Kakuta M, Takahashi S, Takahashi A, Arai Y, Nishimura Y, et al. Prognostic value of KRAS and BRAF mutations in curatively resected colorectal cancer. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2015;21(4):1275-83.
66. Yaeger R, Cercek A, O'Reilly EM, Reidy DL, Kemeny N, Wolinsky T, et al. Pilot trial of combined BRAF and EGFR inhibition in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(6):1313-20.
67. Morkel M, Riemer P, Blaker H, Sers C. Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget*. 2015;6(25):20785-800.
68. Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Sanderson K, Walters RJ, et al. PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PloS one*. 2013;8(6):e65479.
69. Atreya CE, Sangale Z, Xu N, Matli MR, Tikishvili E, Welbourn W, et al. PTEN expression is consistent in colorectal cancer primaries and metastases and associates with patient survival. *Cancer Med*. 2013;2(4):496-506.
70. Sarli L, Bottarelli L, Bader G, Iusco D, Pizzi S, Costi R, et al. Association between recurrence of sporadic colorectal cancer, high level of microsatellite instability, and loss of heterozygosity at chromosome 18q. *Dis Colon Rectum*. 2004;47(9):1467-82.
71. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *British journal of cancer*. 2005;92(3):434-44.
72. Rooney PH, Boonsong A, McKay JA, Marsh S, Stevenson DA, Murray GI, et al. Colorectal cancer genomics: evidence for multiple genotypes which influence survival. *British journal of cancer*. 2001;85(10):1492-8.
73. Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Human molecular genetics*. 2006;15 Spec No 1:R17-29.
74. Morris KV, Mattick JS. The rise of regulatory RNA. *Nature reviews Genetics*. 2014;15(6):423-37.

75. Nie L, Wu HJ, Hsu JM, Chang SS, Labaff AM, Li CW, et al. Long non-coding RNAs: versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer. *American journal of translational research*. 2012;4(2):127-50.
76. Hamilton MJ, Young MD, Sauer S, Martinez E. The interplay of long non-coding RNAs and MYC in cancer. *AIMS Biophys*. 2015;2(4):794-809.
77. Ahmed FE, Ahmed NC, Vos PW, Bonnerup C, Atkins JN, Casey M, et al. Diagnostic microRNA markers to screen for sporadic human colon cancer in stool: I. Proof of principle. *Cancer genomics & proteomics*. 2013;10(3):93-113.
78. Yang X, Zhong J, Ji Y, Li J, Jian Y, Zhang J, et al. The expression and clinical significance of microRNAs in colorectal cancer detecting. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(4):2675-84.
79. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
80. Horvat M, Stabuc B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Radiol Oncol*. 2011;45(2):75-81.
81. McGranahan N, Burrell RA, Endesfelder D, Novelli MR, Swanton C. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO reports*. 2012;13(6):528-38.
82. Jones RN. McClintock's controlling elements: the full story. *Cytogenetic and genome research*. 2005;109(1-3):90-103.
83. Suijkerbuijk SJ, Kops GJ. Preventing aneuploidy: the contribution of mitotic checkpoint proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1786(1):24-31.
84. Frasnini R, Beretta A, Sironi L, Musacchio A, Lucchini G, Piatti S. Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores. *The EMBO journal*. 2001;20(23):6648-59.
85. Tang Z, Shu H, Oncel D, Chen S, Yu H. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Molecular cell*. 2004;16(3):387-97.
86. Sage J, Straight AF. RB's original CIN? *Genes & development*. 2010;24(13):1329-33.
87. Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer research*. 2001;61(3):818-22.
88. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(20):3380-7.
89. Iacopetta B, Grieco F, Amanuel B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2010;6(4):260-9.
90. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer research*. 1998;58(22):5248-57.
91. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 2002;123(6):1804-11.
92. Kloor M, Michel S, von Knebel Doeberitz M. Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(5):1001-10.

93. Soreide K, Nedrebo BS, Knapp JC, Glomsaker TB, Soreide JA, Korner H. Evolving molecular classification by genomic and proteomic biomarkers in colorectal cancer: potential implications for the surgical oncologist. *Surg Oncol*. 2009;18(1):31-50.
94. Ogino S, Chan AT, Fuchs CS, Giovannucci E. Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut*. 2011;60(3):397-411.
95. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature reviews Cancer*. 2006;6(2):107-16.
96. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell death and differentiation*. 2010;17(2):193-9.
97. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1812(5):592-601.
98. Katoh M, Katoh M. Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells. *International journal of molecular medicine*. 2006;17(4):681-5.
99. Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(5).
100. Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*. 2001;411(6835):349-54.
101. Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes & development*. 2003;17(14):1709-13.
102. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature cell biology*. 2010;12(5):468-76.
103. King TD, Zhang W, Suto MJ, Li Y. Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. *Cellular signalling*. 2012;24(4):846-51.
104. Willert K, Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(9):a007864.
105. Herbergs J, Hopman AH, De Bruine AP, Ramaekers FC, Arends JW. In situ hybridization and flow cytometric analysis of colorectal tumours suggests two routes of tumourigenesis characterized by gain of chromosome 7 or loss of chromosomes 17 and 18. *The Journal of pathology*. 1996;179(3):243-7.
106. Habas R. Canonical Wnt signaling: an unexpected new player. *Developmental cell*. 2006;11(2):138-9.
107. Yang C, Iyer RR, Yu AC, Yong RL, Park DM, Weil RJ, et al. beta-Catenin signaling initiates the activation of astrocytes and its dysregulation contributes to the pathogenesis of astrocytomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(18):6963-8.
108. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:303-9.
109. Tauriello DV, Jordens I, Kirchner K, Slootstra JW, Kruitwagen T, Bouwman BA, et al. Wnt/beta-catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(14):E812-20.
110. Holloway KR, Calhoun TN, Saxena M, Metoyer CF, Kandler EF, Rivera CA, et al. SIRT1 regulates Dishevelled proteins and promotes transient and constitutive Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(20):9216-21.

111. Noshio K, Shima K, Irahara N, Kure S, Firestein R, Baba Y, et al. SIRT1 histone deacetylase expression is associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2009;22(7):922-32.
112. Liu A, Chen S, Cai S, Dong L, Liu L, Yang Y, et al. Wnt5a through noncanonical Wnt/JNK or Wnt/PKC signaling contributes to the differentiation of mesenchymal stem cells into type II alveolar epithelial cells in vitro. *PloS one.* 2014;9(3):e90229.
113. Early DS, Fontana L, Davidson NO. Translational approaches to addressing complex genetic pathways in colorectal cancer. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine.* 2008;151(1):10-6.
114. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut.* 2011;60(1):116-29.
115. Croce CM. Oncogenes and cancer. *The New England journal of medicine.* 2008;358(5):502-11.
116. Maurer G, Tarkowski B, Baccarini M. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene.* 2011;30(32):3477-88.
117. Blum R, Kloog Y. Tailoring Ras-pathway--inhibitor combinations for cancer therapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy.* 2005;8(6):369-80.
118. Zhang YJ, Duan Y, Zheng XF. Targeting the mTOR kinase domain: the second generation of mTOR inhibitors. *Drug discovery today.* 2011;16(7-8):325-31.
119. Tatosyan AG, Mizenina OA. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry Biokhimiia.* 2000;65(1):49-58.
120. Massague J. TGFbeta signalling in context. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2012;13(10):616-30.
121. He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nature genetics.* 2004;36(10):1117-21.
122. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *Journal of biomedicine & biotechnology.* 2011;2011:978312.
123. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes & development.* 2008;22(18):2454-72.
124. Chatel G, Ganef C, Boussif N, Delacroix L, Briquet A, Nolens G, et al. Hedgehog signaling pathway is inactive in colorectal cancer cell lines. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2007;121(12):2622-7.
125. Chaudary N, Pintilie M, Hedley D, Fyles AW, Milosevic M, Clarke B, et al. Hedgehog pathway signaling in cervical carcinoma and outcome after chemoradiation. *Cancer.* 2012;118(12):3105-15.
126. Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, Artavanis-Tsakonas S. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature.* 2005;435(7044):964-8.
127. Wu CY, Tsai YP, Wu MZ, Teng SC, Wu KJ. Epigenetic reprogramming and post-transcriptional regulation during the epithelial-mesenchymal transition. *Trends in genetics : TIG.* 2012;28(9):454-63.
128. Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(14):6414-8.

129. Sikandar SS, Pate KT, Anderson S, Dizon D, Edwards RA, Waterman ML, et al. NOTCH signaling is required for formation and self-renewal of tumor-initiating cells and for repression of secretory cell differentiation in colon cancer. *Cancer research*. 2010;70(4):1469-78.
130. Sweetser S, Smyrk TC, Sinicrope FA. Serrated colon polyps as precursors to colorectal cancer. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013;11(7):760-7; quiz e54-5.
131. Shussman N, Wexner SD. Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterology report*. 2014;2(1):1-15.
132. Diamond SJ, Enestvedt BK, Jiang Z, Holub JL, Gupta M, Lieberman DA, et al. Adenoma detection rate increases with each decade of life after 50 years of age. *Gastrointestinal endoscopy*. 2011;74(1):135-40.
133. Burnett-Hartman AN, Passarelli MN, Adams SV, Upton MP, Zhu LC, Potter JD, et al. Differences in epidemiologic risk factors for colorectal adenomas and serrated polyps by lesion severity and anatomical site. *American journal of epidemiology*. 2013;177(7):625-37.
134. Fu Z, Shrubsole MJ, Smalley WE, Wu H, Chen Z, Shyr Y, et al. Lifestyle factors and their combined impact on the risk of colorectal polyps. *American journal of epidemiology*. 2012;176(9):766-76.
135. Okabayashi K, Ashrafian H, Hasegawa H, Yoo JH, Patel VM, Harling L, et al. Body mass index category as a risk factor for colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*. 2012;107(8):1175-85; quiz 86.
136. van Rijn JC, Reitsma JB, Stoker J, Bossuyt PM, van Deventer SJ, Dekker E. Polyp miss rate determined by tandem colonoscopy: a systematic review. *The American journal of gastroenterology*. 2006;101(2):343-50.
137. Shao X, Zheng W, Huang Z. In vivo diagnosis of colonic precancer and cancer using near-infrared autofluorescence spectroscopy and biochemical modeling. *Journal of biomedical optics*. 2011;16(6):067005.
138. McGill SK, Evangelou E, Ioannidis JP, Soetikno RM, Kaltenbach T. Narrow band imaging to differentiate neoplastic and non-neoplastic colorectal polyps in real time: a meta-analysis of diagnostic operating characteristics. *Gut*. 2013;62(12):1704-13.
139. Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I, Butler JA, Puckett ML, Hildebrandt HA, et al. Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *The New England journal of medicine*. 2003;349(23):2191-200.
140. Sambrook A, McAteer D, Yule S, Phull P. MR colonography without bowel cleansing or water enema: a pilot study. *The British journal of radiology*. 2012;85(1015):921-4.
141. Van Gossum A, Munoz-Navas M, Fernandez-Urien I, Carretero C, Gay G, Delvaux M, et al. Capsule endoscopy versus colonoscopy for the detection of polyps and cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;361(3):264-70.
142. Lidgard GP, Domanico MJ, Bruinsma JJ, Light J, Gagrut ZD, Oldham-Haltom RL, et al. Clinical performance of an automated stool DNA assay for detection of colorectal neoplasia. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013;11(10):1313-8.
143. Soltysova A, Altanerova V, Altaner C. Cancer stem cells. *Neoplasma*. 2005;52(6):435-40.
144. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287(5457):1433-8.

145. Yu Z, Li Y, Fan H, Liu Z, Pestell RG. miRNAs regulate stem cell self-renewal and differentiation. *Frontiers in genetics*. 2012;3:191.
146. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(12):2144-51.
147. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(4):275-84.
148. Sun X, Jiao X, Pestell TG, Fan C, Qin S, Mirabelli E, et al. MicroRNAs and cancer stem cells: the sword and the shield. *Oncogene*. 2014;33(42):4967-77.
149. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine*. 2011;17(3):313-9.
150. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(2):133-43.
151. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell stem cell*. 2007;1(4):389-402.
152. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature medicine*. 2001;7(9):1028-34.
153. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.
154. Dick JE. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nature biotechnology*. 2009;27(1):44-6.
155. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008;112(13):4793-807.
156. Wong DJ, Liu H, Ridky TW, Cassarino D, Segal E, Chang HY. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell stem cell*. 2008;2(4):333-44.
157. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(10):755-68.
158. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature biotechnology*. 2007;25(11):1315-21.
159. Srinivasan T, Walters J, Bu P, Than EB, Tung KL, Chen KY, et al. NOTCH Signaling Regulates Asymmetric Cell Fate of Fast- and Slow-Cycling Colon Cancer-Initiating Cells. *Cancer research*. 2016;76(11):3411-21.
160. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
161. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007;448(7151):318-24.
162. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
163. Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells*. 2014;3(2):74-82.

164. Sotomayor P, Godoy A, Smith GJ, Huss WJ. Oct4A is expressed by a subpopulation of prostate neuroendocrine cells. *The Prostate*. 2009;69(4):401-10.
165. Yamada Y, Watanabe A. Epigenetic codes in stem cells and cancer stem cells. *Advances in genetics*. 2010;70:177-99.
166. Yasuda H, Tanaka K, Okita Y, Araki T, Saigusa S, Toiyama Y, et al. CD133, OCT4, and NANOG in ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Oncology letters*. 2011;2(6):1065-71.
167. Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;383(2):157-62.
168. Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*. 2009;137(4):647-58.
169. Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 2008;455(7216):1124-8.
170. Singovski G, Bernal C, Kuciak M, Siegl-Cachedenier I, Conod A, Ruiz IAA. In vivo epigenetic reprogramming of primary human colon cancer cells enhances metastases. *Journal of molecular cell biology*. 2015.
171. Shi Z, Bai R, Fu ZX, Zhu YL, Wang RF, Zheng S. Induced pluripotent stem cell-related genes influence biological behavior and 5-fluorouracil sensitivity of colorectal cancer cells. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2012;13(1):11-9.
172. Miyazaki S, Yamamoto H, Miyoshi N, Wu X, Ogawa H, Uemura M, et al. A Cancer Reprogramming Method Using MicroRNAs as a Novel Therapeutic Approach against Colon Cancer : Research for Reprogramming of Cancer Cells by MicroRNAs. *Annals of surgical oncology*. 2014.
173. Oshima N, Yamada Y, Nagayama S, Kawada K, Hasegawa S, Okabe H, et al. Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PloS one*. 2014;9(7):e101735.
174. Amini S, Fathi F, Mobalegi J, Sofimajidpour H, Ghadimi T. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. *Anatomy & cell biology*. 2014;47(1):1-11.
175. Dai X, Ge J, Wang X, Qian X, Zhang C, Li X. OCT4 regulates epithelial-mesenchymal transition and its knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and invasion. *Oncology reports*. 2013;29(1):155-60.
176. Weina K, Utikal J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med*. 2014;3:19.
177. Carrasco-Garcia E, Santos JC, Garcia I, Brianti M, Garcia-Puga M, Pedrazzoli J, Jr., et al. Paradoxical role of SOX2 in gastric cancer. *Am J Cancer Res*. 2016;6(4):701-13.
178. Otsubo T, Akiyama Y, Hashimoto Y, Shimada S, Goto K, Yuasa Y. MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and contributes to gastric carcinogenesis. *PloS one*. 2011;6(1):e16617.
179. Kuzmichev AN, Kim SK, D'Alessio AC, Chenoweth JG, Wittko IM, Campanati L, et al. Sox2 acts through Sox21 to regulate transcription in pluripotent and differentiated cells. *Current biology : CB*. 2012;22(18):1705-10.
180. Neumann J, Bahr F, Horst D, Kriegl L, Engel J, Luque RM, et al. SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. *BMC cancer*. 2011;11:518.

181. Fang X, Yu W, Li L, Shao J, Zhao N, Chen Q, et al. ChIP-seq and functional analysis of the SOX2 gene in colorectal cancers. *Omics : a journal of integrative biology*. 2010;14(4):369-84.
182. Malik D, Kaul D. KLF4 Genome: A double edged sword. *Journal of Solid Tumors*. 2015;5(1):49.
183. Evans PM, Liu C. Roles of Krupel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2008;40(7):554-64.
184. Wei D, Kanai M, Huang S, Xie K. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis*. 2006;27(1):23-31.
185. Zhang W, Chen X, Kato Y, Evans PM, Yuan S, Yang J, et al. Novel cross talk of Kruppel-like factor 4 and beta-catenin regulates normal intestinal homeostasis and tumor repression. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(6):2055-64.
186. Choi BJ, Cho YG, Song JW, Kim CJ, Kim SY, Nam SW, et al. Altered expression of the KLF4 in colorectal cancers. *Pathology, research and practice*. 2006;202(8):585-9.
187. Shie JL, Chen ZY, O'Brien MJ, Pestell RG, Lee ME, Tseng CC. Role of gut-enriched Kruppel-like factor in colonic cell growth and differentiation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2000;279(4):G806-14.
188. Parasramka MA, Dashwood WM, Wang R, Saeed HH, Williams DE, Ho E, et al. A role for low-abundance miRNAs in colon cancer: the miR-206/Kruppel-like factor 4 (KLF4) axis. *Clinical epigenetics*. 2012;4(1):16.
189. Patel NV, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW. Expression of the tumor suppressor Kruppel-like factor 4 as a prognostic predictor for colon cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2010;19(10):2631-8.
190. Hu R, Zuo Y, Zuo L, Liu C, Zhang S, Wu Q, et al. KLF4 Expression Correlates with the Degree of Differentiation in Colorectal Cancer. *Gut and liver*. 2011;5(2):154-9.
191. Leng Z, Tao K, Xia Q, Tan J, Yue Z, Chen J, et al. Kruppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells. *PloS one*. 2013;8(2):e56082.
192. Ghaleb AM, McConnell BB, Nandan MO, Katz JP, Kaestner KH, Yang VW. Haploinsufficiency of Kruppel-like factor 4 promotes adenomatous polyposis coli dependent intestinal tumorigenesis. *Cancer research*. 2007;67(15):7147-54.
193. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(12):976-90.
194. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(8):635-45.
195. Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. *Genes & development*. 2008;22(20):2755-66.
196. Strasser A, Elefanty AG, Harris AW, Cory S. Progenitor tumours from Emu-bcl-2-myc transgenic mice have lymphomyeloid differentiation potential and reveal developmental differences in cell survival. *The EMBO journal*. 1996;15(15):3823-34.
197. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*. 2008;26(1):101-6.
198. Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell stem cell*. 2008;2(1):10-2.

199. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003;113(5):643-55.
200. Karantzali E, Lekakis V, Ioannou M, Hadjimichael C, Papamatheakis J, Kretsovali A. Sall1 regulates embryonic stem cell differentiation in association with nanog. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(2):1037-45.
201. Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, et al. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*. 2009;138(4):722-37.
202. Tay YM, Tam WL, Ang YS, Gaughwin PM, Yang H, Wang W, et al. MicroRNA-134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post-transcriptional attenuation of Nanog and LRH1. *Stem cells*. 2008;26(1):17-29.
203. Meng HM, Zheng P, Wang XY, Liu C, Sui HM, Wu SJ, et al. Over-expression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer biology & therapy*. 2010;9(4):295-302.
204. Horst D, Scheel SK, Liebmann S, Neumann J, Maatz S, Kirchner T, et al. The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *The Journal of pathology*. 2009;219(4):427-34.
205. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2008;99(8):1285-9.
206. Ieta K, Tanaka F, Haraguchi N, Kita Y, Sakashita H, Mimori K, et al. Biological and genetic characteristics of tumor-initiating cells in colon cancer. *Annals of surgical oncology*. 2008;15(2):638-48.
207. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445(7123):111-5.
208. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(6):2111-20.
209. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445(7123):106-10.
210. Hibi K, Sakata M, Kitamura YH, Sakuraba K, Shirahata A, Goto T, et al. Demethylation of the CD133 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer research*. 2009;29(6):2235-7.
211. Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(12):3488-98.
212. Galizia G, Gemei M, Del Vecchio L, Zamboli A, Di Noto R, Mirabelli P, et al. Combined CD133/CD44 expression as a prognostic indicator of disease-free survival in patients with colorectal cancer. *Archives of surgery*. 2012;147(1):18-24.
213. Handra-Luca A, Taconet S. CD133 expression in colorectal adenomas. *Journal of clinical pathology*. 2013;66(12):1097-8.
214. Mohammadi M, Bzorek M, Bonde JH, Nielsen HJ, Holck S. The stem cell marker CD133 is highly expressed in sessile serrated adenoma and its borderline variant compared with hyperplastic polyp. *Journal of clinical pathology*. 2013;66(5):403-8.

215. Sahlberg SH, Spiegelberg D, Glimelius B, Stenerlow B, Nestor M. Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells. *PloS one*. 2014;9(4):e94621.
216. Montgomery RK, Breault DT. Small intestinal stem cell markers. *Journal of anatomy*. 2008;213(1):52-8.
217. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*. 2007;449(7165):1003-7.
218. Becker L, Huang Q, Mashimo H. Immunostaining of *Lgr5*, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *TheScientificWorldJournal*. 2008;8:1168-76.
219. Fan XS, Wu HY, Yu HP, Zhou Q, Zhang YF, Huang Q. Expression of *Lgr5* in human colorectal carcinogenesis and its potential correlation with beta-catenin. *International journal of colorectal disease*. 2010;25(5):583-90.
220. Amsterdam A, Raanan C, Schreiber L, Freyhan O, Fabrikant Y, Melzer E, et al. Differential localization of *LGR5* and *Nanog* in clusters of colon cancer stem cells. *Acta histochemica*. 2013;115(4):320-9.
221. Chai N, Zhang W, Wang Y, Zhou Z, Zhang Y, Liu H, et al. [*Lgr5* and *CD44* expressions in different types of intestinal polyps and colorectal cancer]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2013;33(7):972-6.
222. Walker F, Zhang HH, Odorizzi A, Burgess AW. *LGR5* is a negative regulator of tumourigenicity, antagonizes Wnt signalling and regulates cell adhesion in colorectal cancer cell lines. *PloS one*. 2011;6(7):e22733.
223. Baker AM, Graham TA, Elia G, Wright NA, Rodriguez-Justo M. Characterization of *LGR5* stem cells in colorectal adenomas and carcinomas. *Scientific reports*. 2015;5:8654.
224. Takahashi H, Ishii H, Nishida N, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, et al. Significance of *Lgr5*(+ve) cancer stem cells in the colon and rectum. *Annals of surgical oncology*. 2011;18(4):1166-74.
225. Asfaha S, Hayakawa Y, Muley A, Stokes S, Graham TA, Ericksen RE, et al. *Krt19*(+)/*Lgr5*(-) Cells Are Radioresistant Cancer-Initiating Stem Cells in the Colon and Intestine. *Cell stem cell*. 2015;16(6):627-38.
226. Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ, Bergman Y. *Rex-1*, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via *Oct-3/4* and *Oct-6* binding to an octamer site and a novel protein, *Rox-1*, binding to an adjacent site. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(4):1866-78.
227. Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 2006;444(7117):364-8.
228. Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y, Pei D. Regulation of the pluripotency marker *Rex-1* by *Nanog* and *Sox2*. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(33):23319-25.
229. Mongan NP, Martin KM, Gudas LJ. The putative human stem cell marker, *Rex-1* (*Zfp42*): structural classification and expression in normal human epithelial and carcinoma cell cultures. *Molecular carcinogenesis*. 2006;45(12):887-900.
230. Raman JD, Mongan NP, Liu L, Tickoo SK, Nanus DM, Scherr DS, et al. Decreased expression of the human stem cell marker, *Rex-1* (*zfp-42*), in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2006;27(3):499-507.
231. Kim BS, Kang KS, Choi JI, Jung JS, Im YB, Kang SK. Knockdown of the potential cancer stem-like cell marker *Rex-1* improves chemotherapeutic effects in gliomas. *Human gene therapy*. 2011;22(12):1551-62.

232. Schuebel KE, Chen W, Cope L, Glockner SC, Suzuki H, Yi JM, et al. Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS genetics*. 2007;3(9):1709-23.
233. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003;17(6):1013-34.
234. Pryor RJ, Wittwer CT. Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods in molecular biology*. 2006;336:19-32.
235. Zhou L, Myers AN, Vandersteen JG, Wang L, Wittwer CT. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clinical chemistry*. 2004;50(8):1328-35.
236. Ahnen DJ. The American College of Gastroenterology Emily Couric Lecture--the adenoma-carcinoma sequence revisited: has the era of genetic tailoring finally arrived? *The American journal of gastroenterology*. 2011;106(2):190-8.
237. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*. 2004;10(8):789-99.
238. Quail DF, Taylor MJ, Postovit LM. Microenvironmental regulation of cancer stem cell phenotypes. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7(3):197-216.
239. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003;113(5):631-42.
240. Kim J, Orkin SH. Embryonic stem cell-specific signatures in cancer: insights into genomic regulatory networks and implications for medicine. *Genome Med*. 2011;3(11):75.
241. Daley GQ. Common themes of dedifferentiation in somatic cell reprogramming and cancer. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2008;73:171-4.
242. Langan RC, Mullinax JE, Raiji MT, Upham T, Summers T, Stojadinovic A, et al. Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells. *Journal of Cancer*. 2013;4(3):241-50.
243. Li XB, Yang G, Zhu L, Tang YL, Zhang C, Ju Z, et al. Gastric Lgr5(+) stem cells are the cellular origin of invasive intestinal-type gastric cancer in mice. *Cell research*. 2016;26(7):838-49.
244. Curley MD, Therrien VA, Cummings CL, Sergeant PA, Koulouris CR, Friel AM, et al. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem cells*. 2009;27(12):2875-83.
245. Neuzil J, Stantic M, Zobalova R, Chladova J, Wang X, Prochazka L, et al. Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: what's in the name? *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;355(4):855-9.