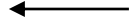


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, **YÜKSEK LİSANS TEZİ**;
Doktora ise **DOKTORA TEZİ** ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA TÜMOR
SÜPRESOR GENLERİNİN, GENETİK
VARYASYONLARININ İNCELENMESİ**

AREZOO GHEYBI

**DANIŞMAN
PROF. DR. Ş. ÜMİT ZEYBEK**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İÜ. Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Doktora öğrencisi **Arezoo GHEYBI** tarafından Prof. Dr. Ş.Ümit ZEYBEK'in danışmanlığında hazırlanan "**Kolorektal Kanserli Hastalarda Tümör Süpresör Genlerinin Genetik Varyasyonlarının İncelenmesi**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 02/05/2019 tarihinde yapılan Tez Savanma Sınavında başarıyla bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlhan YAYLI
İÜ. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı



**Jüri
(Danışman)**

Prof. Dr. Ş. Ümit ZEYBEK
İÜ. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. Ali Osman GÜROL
İÜ. Aziz Sancar DETAE
İmmünoloji Anabilim Dalı



Jüri

Dr. Öğr. Üyesi M. Fatma AYTEKİN
Haliç. Üni. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya
A.D.



Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Cem
HOROZOĞLU
İstanbul Gelişim Üniv. Tıbbi
Hizn ve Teknik A.D.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Arezo GHEYBI



İTHAF

Aileme ve Eşime ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (Aziz Sancar DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım' a,

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, her konuda bana destek olan saygıdeğer hocam İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (Aziz Sancar DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ş. Ümit Zeybek 'e

Tezim için gerekli hasta örnekleri ve verilerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Metin Keskin 'e

Tez çalışmam süresince yardım ve destekleri için Prof. Dr. Hülya Yılmaz-Aydoğan olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tezimin yapımı ve yazımı sırasındaki yardımları ve destekleri için çok değerli arkadaşım Msc. Zeliha Doğan'a, Barış Ertuğrul, Merve Nur Ataş'a

Hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen değerli aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29468

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolonun Anatomisi.....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	4
2.3. Etyolojisi	5
2.4. Kolorektal Kanser Risk Faktörleri	6
2.4.1. Beslenme ve Diyet	6
2.4.2. Sigara	7
2.4.3. Alkol.....	7
2.4.4. Yaş	7
2.4.5. İrk.....	Error! Bookmark not defined.
2.4.6. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları	8
2.4.7. Herediter Faktörler ve Sendromlar	8
2.4.7.1. Polipozis Koli (Famılyal Adenomatöz Polipozis-FAP).....	8
2.4.7.2. Herediter Non-polipozis Kolon Kanseri (HNPkRK) Sendromları (Lynch sendromu I ve II).....	9
2.5. Diyagnoz	9
2.6. Evreleme	9
2.7. Kolorektal Kanserin Moleküler Mekanizması.....	10
2.7.1. Tümör Supresör Genlerdeki Değişimler	11

2.7.2. Protoonkogenlerin Aktivasyonu	11
2.7.3. DNA Onarım Genlerin Değişiklikleri (mismatch repair gens).....	12
2.8. Tiyoredoksin Etkileşimli Protein (TXNIP).....	12
2.8.1. TXNIP'in Genel Özellikleri.....	12
2.8.2. TXNIP'in Kanser Sürecindeki Rolü	13
2.9. A-kinaz Ankraj Proteinler (AKAP12)	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Örneklerin Seçimi	17
3.2. Kullanılan Cihazlar	17
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
3.4. Kullanılan Çözeltiler.....	18
3.4.1. Rna İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	18
3.4.1.1. STL-P1	18
3.4.1.2. Proteinaz K.....	18
3.4.1.3. 3M GIT2.....	18
3.4.1.4. İzopropanol	18
3.4.1.5. DNaz I	18
3.4.1.6. WB1	18
3.4.1.7. WB	18
3.4.1.8. 1X TE (Tris-EDTA buffer)	18
3.4.1.9. 1M EDTA.....	18
3.4.1.10. 5M Sodyum Klorür (NaCl)	18
3.4.1.11. %20'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).....	19
3.5. Kullanılan Yöntemler.....	19
3.5.1. Dokudan RNA İzolasyonu	19
3.5.1.1. Elde Edilen RNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini	20
3.5.2. Primer Dizaynı	20
3.5.2.1. GAPDH genin primer dizayni.....	20
3.5.2.2. TXNIP genin primer dizayni.....	22
3.5.2.3. AKAP12 genin primer dizayni.....	24
3.5.3. Ters Transkripsiyon ve Kantitatif QPCR (qPCR).....	26
3.5.4. Real-Time PCR (RT-PCR)	28
3.5.5. Yüksek Çözünürlükte Erime Eğrisi (HRM) Analizi.....	30

3.5.6. DNA Dizileme ve Karşılaştırmalar	32
3.6. İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Cinsiyet ve Yaş Faktörlerin Analizi.....	38
4.2. Gen ekspresyon seviyelerinin bulunması.....	39
4.2.1. TXNIP gen ekspresyon seviyesinin hesaplanması.....	40
4.2.2. AKAP12 gen ekspresyon seviyesinin hesaplanması	41
4.3. Değerlendirme.....	41
5. TARTIŞMA	43
KAYNAKLAR	48
HAM VERİLER	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
FORMLAR	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ETİK KURUL KARARI	57
PATENT HAKKI İZNİ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	59
ÖZGEÇMİŞ	61

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Kolorektal Kanserde Evreleme ve TNM Sistemi[52].....	10
Tablo 2-2: Tümör Süpresör Gen Tipleri [55].	11
Tablo 4-1: TXNIP gen ekspresyon seviyesinin hesaplanması ve değişim katının $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile bulunması.....	40
Tablo 4-2: TXNIP geninin GAPDH genine göre istatistiksel önemini gösteren T-testi	40
Tablo 4-3: AKAP12 gen ekspresyon seviyesinin hesaplanması ve değişim katının $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile bulunması.....	41
Tablo 4-4: AKAP12 geninin GAPDH genine göre istatistiksel önemini gösteren T-testi.	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 : Kolon anatomisi[15].....	3
Şekil 2-2: Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)[23].....	4
Şekil 2-3: Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)[23].....	5
Şekil 2-4: Kolorektal Kansere Etyolojisi[30].	6
Şekil 2-5: Kolorektal Kanserin Yaşa Özel Hızları (Semi-Log) (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015)[23].	8
Şekil 2-6: TXNIP'in 1. Kromozom Üzerindeki Lokasyonu[59]	12
Şekil 2-7: TXNIP'in Biyolojik Süreçler [55].	13
Şekil 2-8: AKAP12 'in 6. kromozom üzerindeki lokasyonu.....	15
Şekil 2-9: AKAP 12 tarafından kanserde kontrol edilen yollar[72].	16
Şekil 3-1: Primer3 programı ile dizayn edilen GAPDH primerlerin bağlandığı bölgeler ve primerlerin özellikleri.	21
Şekil 3-2: GAPDH için Primer Blast algoritması ile NCBI veribankasında yapılan sanal PCR sonuçları	22
Şekil 3-3: Primer3 programı ile TXNIP geni için dizayn edilen primerlerin bağlandığı bölgeler ve primerlerin özellikleri.	23
Şekil 3-4: Primer Blast algoritması ile TXNIP geni için NCBI veribankasında yapılan sanal PCR sonuçları.	24
Şekil 3-5: Primer3 programı ile AKAP12 geni için dizayn edilen primerlerin bağlandığı bölgeler ve primerlerin özellikleri	25
Şekil 3-6: Primer Blast algoritması ile AKAP12 geni için NCBI veribankasında yapılan sanal PCR sonuçları.	25
Şekil 3-7: Hasta numunelerine yapılan GAPDH geni QPCR çoğalma eğrileri.....	27
Şekil 3-8: Kontrol numunelerine yapılan GAPDH geni QPCR çoğalma eğrileri.	27
Şekil 3-9: Hasta numunelerine yapılan TXNIP geni QPCR çoğalma eğrileri.....	27
Şekil 3-10: Kontrol numunelerine yapılan TXNIP geni QPCR çoğalma eğrileri.	27
Şekil 3-11: Hasta numunelerine yapılan AKAP12 geni QPCR çoğalma eğrileri.....	28

Şekil 3-12: Kontrol numunelerine yapılan AKAP12 geni QPCR çoğalma eğrileri.	28
Şekil 3-13: Hasta numunelerinde TXNIP genine yönelik yapılan HRM analizi ile elde edilen dendrogram.	30
Şekil 3-14: Kontrol numunelerinde TXNIP genine yönelik yapılan HRM analizi ile elde edilen dendrogram.	31
Şekil 3-15: Hasta numunelerinde AKAP12 genine yönelik yapılan HRM analizi ile elde edilen dendrogram.	31
Şekil 3-16: Kontrol numunelerinde AKAP12 genine yönelik yapılan HRM analizi ile elde edilen dendrogram.	32
Şekil 3-17: Sekanslanan TXNIP örneklerine ait sanal agaroz jel elektroforez görüntüsü.	34
Şekil 3-18: Sekanslanan AKAP12 örneklerine ait sanal agaroz jel elektroforez görüntüsü.	34
Şekil 3-19: Geneious program ile oluşturulan TXNIP sekanslarına ait dendrogram.	35
Şekil 3-20: Geneious program ile oluşturulan TXNIP sekanslarına ait benzerlik matrisi ve ısı haritası.	35
Şekil 3-21: Geneious program ile oluşturulan AKAP12 sekanslarına ait dendrogram. .	36
Şekil 3-22: Geneious program ile oluşturulan AKAP12 sekanslarına ait benzerlik matrisi ve ısı haritası.	36
Şekil 4-1: Yaş için normal Q-Q plot.	38
Şekil 4-2: Gruplar arası cinsiyet dağılımı.	39

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AKAP12:	A-kinaz ankraj proteini 12
APC:	Adenomatöz polipozis koli
CpG:	Sitozin- fosfat-guanin bölgeleri
CEA:	Karsinoembriyonik antijen
CT:	Cycle Threshold
CP:	Cross Point
EDTA:	Etilen Diamintetraasetat
FAP:	Adenomatöz Polipozis
GTP:	Guanozin trifosfat
GAPDH:	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HRM:	Yüksek Çözünürlükte Erime Eğrisi
HNPCC:	Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanser
KRK:	Kolorektal kanser
K-RAS:	Kirstein Rat Sarkoma Geni
MSI:	Mikrosatellit Kararsızlık
MMR:	Miss match repair
NADH:	Nikotinamid adenin dinükleotit hidrojen
NAD:	Nikotinamid adenin dinükleotit
NaCl:	Sodyum Klorür
p53:	Protein 53
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKC:	Protein kinaz C
PKA:	Protein kinaz A
qPCR:	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RT-PCR: Gerçek Zamanlı- Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA: Ribo nükleik asit

SSeCKS: Src-Bastırılmış C Kinaz Substratı

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

TBP-2: Tioredoksin etkileşimli protein 2

TXNIP: Tioredoksin etkileşimli protein

TBE: Tris Baz-Borik Asit-EDTA

VDUP- 1: Vitamin D3 up-regüle edilmiş protein 1



ÖZET

Gheybi A. Kolorektal Kanserli Hastalarda Tümör Süpresor Genlerinin, Genetik Varyasyonlarının İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2019.

Kolorektal kanser (KRK), morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerindendir, kadınlarda görülme sıklığı açısından ikinci, erkeklerde ise üçüncü kanser türüdür. Yaşam tarzı, (özellikle sporadik kolorektal kanserde), KRK için en önemli risk faktörlerinden biri olarak tanımlanmaktadır. Kolorektal kanseri de dahil olmak üzere çeşitli insan kanser türlerinde eksprese edilen ve oksidatif stres dahil olmak üzere çeşitli stres türleriyle indüklenen ve (kolorektal kanser de dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde aşağı regüle edilen) tioredoksin etkileşimli protein (TXNIP), redoks dengesinin önemli bir düzenleyicisi olan negatif bir tioredoksin düzenleyicidir. A-kinaz ankraj proteini 12 (AKAP12), hücre çoğalmasında, anjiyogenezde rol oynar. AKAP12'nin çoğu kez promotör hipermetilasyonu ile ilişkili birçok insan kanserinde aşağı doğru düzenlenmesi ya da 6q24-25.2'deki lokusunun kaybı, malignite ve metastaz ilerlemesi ile ilişkilidir. Çalışmada kolorektal kanser primer tümörlerin cerrahi örneklerinde TXNIP ve AKAP12 ekspresyonu, RT-PCR metoduyla incelendi. Tioredoksin bağlayıcı protein-2 ve A-kinaz ankraj proteini 12 ekspresyonu, tümör hücrelerinde azaldığı görülmektedir. Ancak TXNIP ve AKAP12 ekspresyonu sonucu hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Bu veriler, TXNIP ve AKAP12 'nin kolorektal karsinogenezisini negatif olarak düzenleyebileceğini göstermektedir. TXNIP ve AKAP12 , kolorektal kanseri için umut verici prognostik belirteçler olarak düşünülebilir ve ayrıca TXNIP ile AKAP12 ekspresyon seviyelerine dayalı kişiselleştirilmiş adjuvan tedavi uygulanması KRK tedavisinde etkili bir uygulama olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler : Kolorektal kanser, TXNIP, AKAP12, Ekspresyon, RT-PCR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29468

ABSTRACT

Gheybi A. Investigation of Genetic Variations of Tumor Suppressor Genes in Colorectal Cancer Patients. Istanbul University Institute of Health Sciences, Molecular Medicine USA. Doctoral Thesis. İstanbul. 2019.

Colorectal cancer (CRC) is one of the major causes of morbidity and mortality, representing the second major cause of cancer incidence among females and the third among males. Lifestyle is identified as one of the most important risk factors for CRC, especially in sporadic colorectal cancer. Thioredoxin interacting protein (TXNIP), whose expression is induced by various types of stress including oxidative stress and is downregulated in various types of human cancer including colorectal cancer, is a negative regulator of thioredoxin, which is an important regulator of redox balance. A-kinase-anchoring protein 12 (AKAP12) plays a role in cell proliferation, angiogenesis. The downregulation of AKAP12 in many human cancers, often associated with promoter hypermethylation, or the loss of its locus at 6q24-25.2, correlates with progression to malignancy and metastasis. We employed RT-PCR assay to investigate TXNIP and AKAP12 expression in surgical specimens of primary tumors from Colorectal cancer patients. Thioredoxin binding protein -2 and A-kinase-anchoring protein 12 expression is downregulated in tumor cells but there was no statistically significant difference between patient and healthy control groups with regard to TXNIP ve AKAP12 expression. These data indicate that TXNIP and AKAP12 negatively regulates Colorectal carcinogenesis. This signal transduction pathway can be a potent target in preventing or treating Colorectal cancer. TXNIP and AKAP12 are promising prognostic markers for colorectal cancer Furthermore, the application of personalized adjuvant therapy based on TXNIP and AKAP12 expression levels will be an effective application in the treatment of CRC.

Key Words: Colorectal cancer, TXNIP, AKAP12, Expression, RT-PCR

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 29468

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK), gelişmiş ülkelerde morbidite ve mortalitenin en önemli nedenleri arasında yer almaktadır. KRK, tümör lokalizasyonu, genetik ve etnik farklılıklar itibarıyla heterojen bir hastalık olmakla birlikte çevre etkenleri ile etkileşimi, diyet ve yaşam tarzı hastalığın gelişimini etkilemektedir. KRK risk faktörleri, kalıtsal bileşenler (kalıtsal nonpolipozis KRK gibi), polip gelişimine yatkınlık, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, obezite, yüksek yağ içeren diyet, alkol bağımlılığı, sigara ve stresi kapsamaktadır. Çok fazla ortak özelliği olması nedeniyle Kolon ve rektal kanserleri, kolorektal kanser olarak ifade edilir[1].

Kolorektal kanser en yaygın üçüncü kanser olmakla beraber ölüme sebebiyet veren kanser türlerinden de dördüncü sıradadır. Kolorektal kanser vakası Batı ülkelerinde çok sıklıkla görülmektedir ve her yıl insidansı artmaktadır[2]. Cinsiyete göre, KRK kadınlarda en sık görülen ikinci (% 9,2), erkeklerde ise üçüncü (% 10) sıradadır[3].

Kolorektal kanserin başlama nedeni diğer kanser türlerinde görüldüğü gibi, spesifik genlerdeki mutasyonlar olabilir. Bu mutasyonlar tümör baskılayıcı genlerde, onkogenlerde ve DNA tamir mekanizmalarında sebep olan genlerde ortaya çıkabilir. Kolorektal karsinomlar mutasyonun kökenine bağlı 3 gruba (sporadik, kalıtsal ,ailesel) sınıflandırılabilir[4].

KRK varlığı birinci derece aile bireyinde, hastalık riskini yaklaşık iki kata artırır. Birden fazla bireyde görülmesi riski dört kata kadar çıkarır. KRK varlığının 45 yaşın altındaki yakınlarında hastalık riski beş kat artırdığı görülmektedir[5].

Ailesel KRK'lerin nedeni tümör baskılayıcı geni olan Adenomatöz polipozis koli (APC) ve DNA tamir genlerinde meydana gelen mutasyonlardır. Bunun gerçekleşmesi için tümör baskılayıcı genlerde (APC ve p53) her iki allelinde de mutasyon olması gerekmektedir[6].

Sporadik KRK'lerin, ailesel ve kalıtsal nedeni yoktur ve KRK'lerin yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır. Bu kanserler çevresel faktörler, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde genetik değişiklikler sonucu ortaya çıkar[7]. Sporadik KRK gelişiminde en önemli risk faktör yaştır. 40 yaşın altında KRK nadir görülürken, 50 yaş ve üzerinde artmaktadır[8].

Metastaz supresörleri, hücre lokasyonları ve biyokimyasal işlevlerde farklılık gösterebilirler. Aynı zamanda proteinler gibi hem hücre içi hem de hücre dışı bulunmaktadır. Örneğin plazma membranda (cadherin, KAI1, CD44), sitozolde (JNKK1/MKK4, nm23-H1, RKIP), mitokondride (caspase 8) ve çekirdekte (BRMS1, CRSP3, TXNIP) görünmektedirler[9][10]. Metastaz supresörleri baskılayıcı aktivitesini, metastatik yolağın bir veya birden fazla basamağında uygulamaktadır[11]. Tiyoredoksin intracting proteinin (TXNIP) metastaz baskılayıcı fonksiyonun tanınması, hücrel strese karşı hücre yanıtı ve metastatik kabiliyetin modülasyonu arasında farklı bir mekanistik bağ olduğunu öne sürmektedir. TXNIP, sitoplazmik tiyoredoksinin endojen bir inhibitörü, ubiquitous tiyol indirgeyici sistemin bir bileşeni olup kanserin ilerlemesinde etkilidir[12]. AKAP12 (A-kinaz bağlayıcı protein -Gravin olarak da bilinir) tümör baskılayıcı olarak birçok insan primer kanserinde görülmektedir. AKAP familyasına ait olmakla beraber çeşitli kanserlerde azalmış ekspresyon ve belirgin hipermetilasyon göstermektedir[13]. KRK'da tümör supresör genler hastalığın ilerlemesiyle anlamlı bir şekilde baskılanmaktadır. İleri evre KRK'da tümör büyümesini inhibe etme fonksiyonu bulunan genlerin taranması hastalığın ilerlemesini ve tümör metastazının baskılanmasında katkı sağlamaktadır. Kanser gelişiminde onkogenlerin ekspresyonu artarken, tümör supresör genlerin ekspresyonu inhibe olmaktadır[14].

Bu çalışmanın amacı kolorektal kanserli hastalarda TXNIP ve AKAP12 genlerinin genetik varyasyonlarını incelemek ve bu genlerin kolorektal kanseri için moleküler marker niteliği taşıyıp taşımadığını araştırmaktır. Bu tez çalışması kapsamında TXNIP ve AKAP12 genlerinin, aktin genine (house keeping gene) rölatif ekspresyon seviyesi RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve kantitatif real-time PZR (qPZR) yöntemleri kullanılarak belirlenecektir.

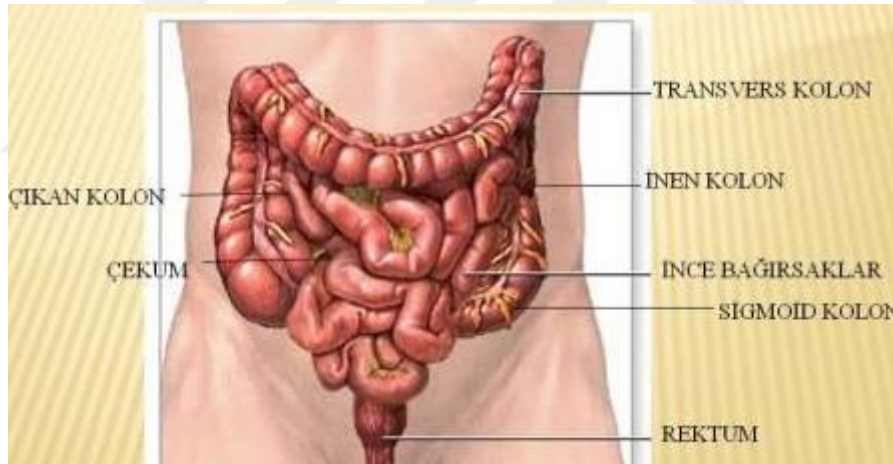
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolonun Anatomisi

Kalın bağırsak, ileumun bitiminden anüse kadar ortalama 1,5 – 2 m uzanır ve sindirim kanalının 1/5'ini oluşturur. İnce bağırsaklardan yapı, hacim ve görünüş olarak farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar;

1. Çap olarak kalın bağırsak ince bağırsaktan daha büyüktür.
2. Sekonder retroperitoneal büyük bölümüdür ve arka duvarına yapışmaktadır.
3. Belirli yerlerde longitudinal kas lifleri yoğunlaşarak Taenia coli şeritlerini oluşturur.

Kalın bağırsak çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum bölümlerinden oluşmaktadır[15].

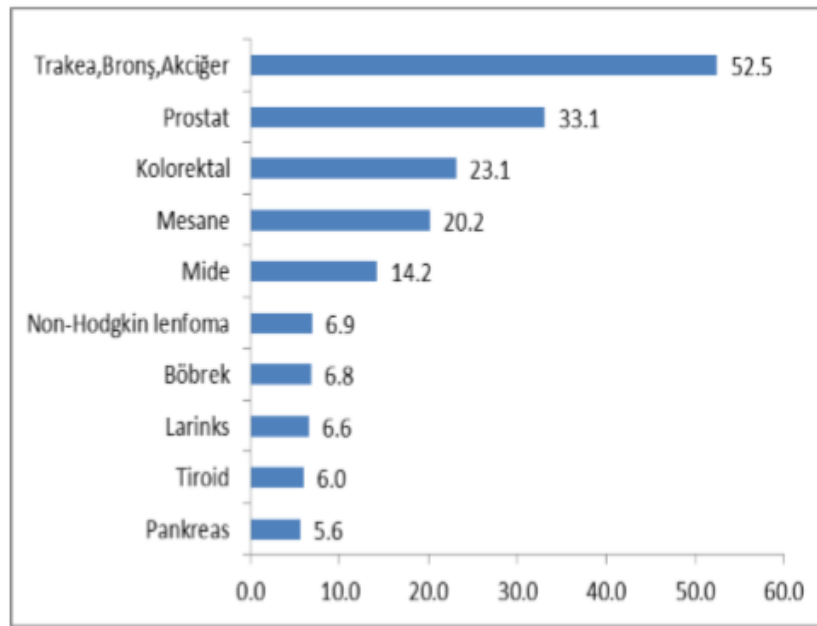


Şekil 2-1 : Kolon anatomisi[16].

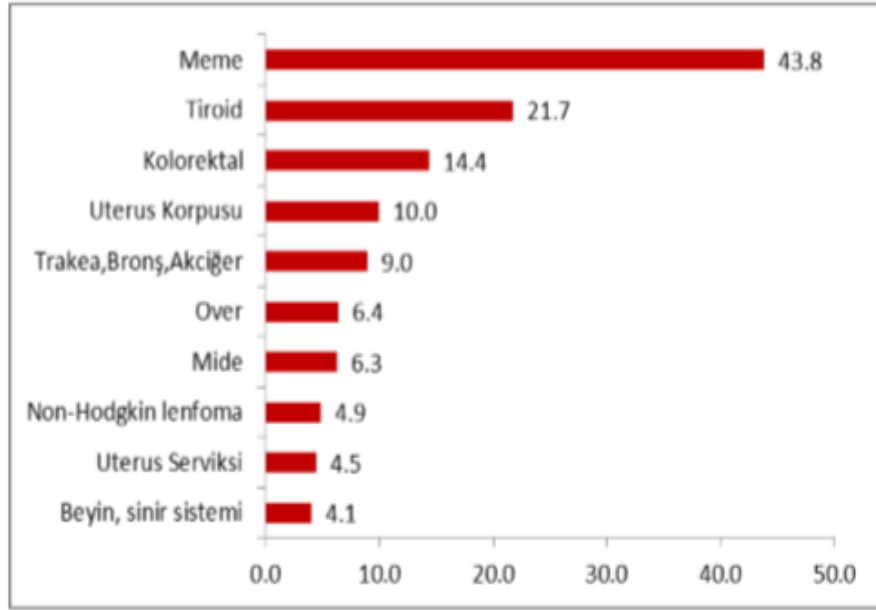
Çekum; kolon, rektum ve anüs bölümlerine ayrılır. Çekum, kalın bağırsağın ilk parçasıdır. Uzunluğu ortalama 6 cm, genişliği 7.5–8.5 cm olup kolonun en geniş kısmıdır. Çekumun en uzun ve birinci bölüm kolondur. Kolon, dört bölüme ayrılır: çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon. Kolon, ince bağırsağın ileumuna çekum ile bağlanırken, rektuma sigmoid kolon vasıtasıyla bağlanır[17].

2.2. Epidemiyoloji

Dünyada KRK, meme, prostat ve akciğer kanserlerinden sonra 4.sırada yer alır. Erkek ve kadınlarda kansere yakalanma olasılığı yaklaşık %10-15'tir[18]. Kolorektal kanseri dünyadaki tüm kanserin %9,7'lik kısmını oluşturur[19]. Kolorektal kanser yaygınlığı ve ölüm oranı kadın ve erkeklerde benzer oranlara sahiptir[20]. Dünyanın çeşitli ülkelerinde hastalığa yakalanma riski farklılık göstermektedir[21]. Gelişmiş ülkelerde hastalığa yakalanma oranı çok daha yüksektir[22]. Kuzey Amerika, Batı Avrupa ve Avustralya'da yüksek oranda, Doğu Avrupa'da orta oranda, Orta Afrika'da ise düşük oranda görülmektedir[23]. KRK'nın, erkeklerde görülme sıklığı prostat ve akciğer kanserlerinden sonra üçüncü sıradayken, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sıradadır[24]. Günümüzde KRK insidansı 45-50 yaşa kadar düşmüştür. Progresyonu yaşla birlikte kadınlara oranla erkeklerde artmaktadır. ABD'de 2009 yılında 136.717 kişiye (70.223 erkek, 66.494 kadın), 2013 yılında 142.820 yetişkine KRK teşhisi konmuştur. Rakamsal verilerle Amerika'da her yıl en az 102.480 kolon kanseri ve 40.340 rektal kanser teşhisi edilmektedir[25]. Avrupa'da KRK, tüm kanser tipleri arasında ikinci sırada yer almaktadır[26].



Şekil 2-2: Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserın Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları
(Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)[24].



Şekil 2-3: Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanser Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları
(Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)[24].

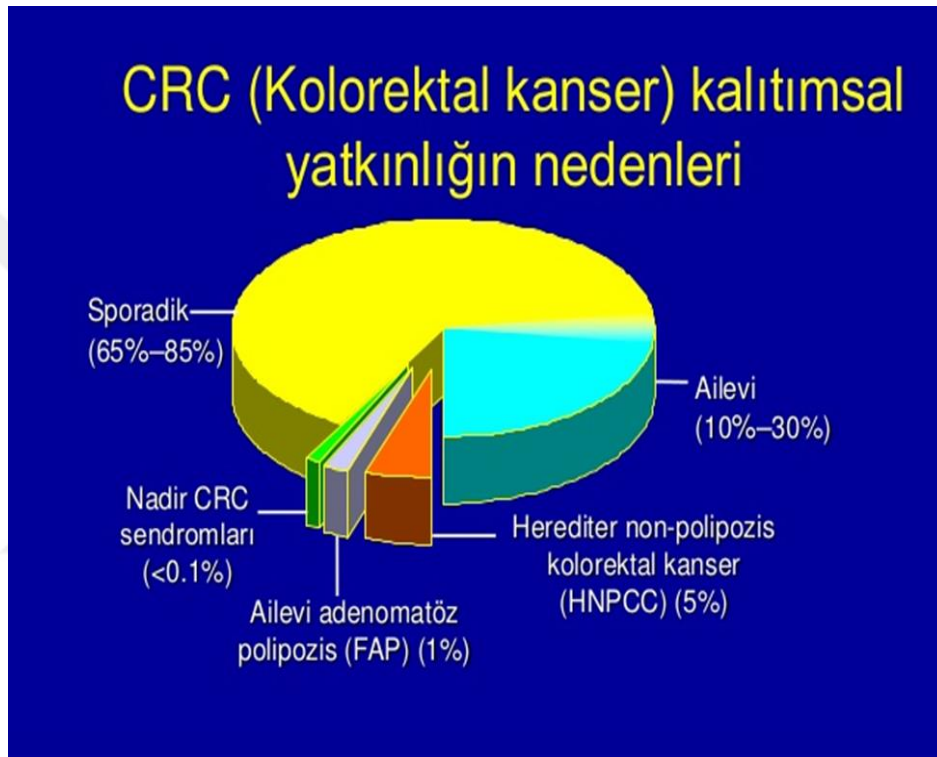
2.3. Etiyolojisi

KRK etiolojisinde genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. Üreme hücrelerinde genetik değişiklikler meydana gelirse kalıtsal, somatik hücrelerde oluşursa sporadik kanserler meydana gelir [27]. Kolorektal kanserlerin çoğu sporadiktir ve büyük çoğunluğu (%95) adenokarsinomlardır [28]. Kalıtsal kolorektal kanserlere örnek olarak Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanserler (HNPCC) verilebilir[29].

Tüm KRK vakalarının % 5'ini kalıtsal kanserler oluşturur. Mutasyona uğramış genin iki alelinden birisinde mutasyon gerçekleşirse kalıtsal mutasyonlara neden olurken, diğer aleldeki nokta mutasyonun etkisiyle tümör hücresinin ve karsinomun ortaya çıkmasına sebep olur[30]. Kalıtsal kanserlerin sınıflandırılması için polipoz formlar ve polipoz olmayan formlar diye iki grup kurulmuştur. Polipoz varyantı, kolonda potansiyel olarak malign polip oluşumu ile karakterizedir ve ailesel adenomatous polipozu (FAP) içerir 31]. Kalıtsal polipoz olmayan kolorektal kanser (HNPCC), DNA tamir mekanizmasında olan mutasyonlarla ilişkilidir. HNPCC'nin önemli nedeni, DNA onarım proteinlerini (MLH1, MLH6, MSH2, PMS1 ve PMS2)

kodlayan iki alellerden birinde kalıtsal mutasyonların sebep olduğu Lynch sendromudur. Tüm kolorektal kanser vakalarının% 2-3'ünde Lynch sendromu bulunabilir ve bu sebeple HNPCC grubunda görülen en sık sendromdur[32].

Sporadik kanserler ise nokta mutasyonlarından türetilen kanserlerdir ve tüm kolorektal kanserlerin% 70'ini oluşturur. Sporadik kanserin moleküler patogenezinin heterojen olma nedeni, farklı genlerdeki mutasyonlardır[4].



Şekil 2-4: Kolorektal Kanser Etiyolojisi[32].

2.4. Kolorektal Kanser Risk Faktörleri

2.4.1. Beslenme ve Diyet

Diyet kolorektal kanser gelişiminde önemli bir role sahiptir. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda, çeşitli gıdaların ve besinlerin tüketimi kolorektal neoplazi riski etkilemektedir[33]. Kalsiyum, süt, lif ve tam tahıl kolorektal kanser riskini azaltırken, kırmızı et ve işlenmiş et bu riski arttırmaktadır[34]. Kırmızı et ve yüksek kalorili gıda tüketimi, antineoplastik vitamin, antioksidan, antimutajen, lifsel komponenti olmayan diyet, tümör oluşum riski oluşturmaktadır[35][36]. Aynı zamanda

besin maddeleri ve gıdalar diyetel bir model olarak kolorektal kanser riskini etkileyebilir[37]. Muhtemelen, iltihaplanma üzerine ve bağıışıklık sistemi tepkisine de doğrudan etki yapabilir. Bu nedenle diyet değışikliğı, kolorektal kanser insidansını azaltma olasılığına sahiptir[38]. Diyetteki yağdan dolayı; kolon bakterileri vasıtasıyla sentezi artmakta olan karaciğerde kolesterol ve primer safra asitleri, kolesterol metabolitlerine ve sekonder safra asitlerine dönüştürölerek kolonik mukozada hasar oluşturmaktadırlar[39]. Bu oluşan hasarla birlikte sekonder safra asitlerinin etkisiyle protein kinaz C ve kolonik ornitin dekarboksilaz artar ve araşidonik asitten prostoglandinler sentez edilir. Sonuç olarak hücresel proliferasyon meydana gelir. Prolifere olan hücreler karsinojenlerin etkilerine duyarlıdırlar[40].

2.4.2. Sigara

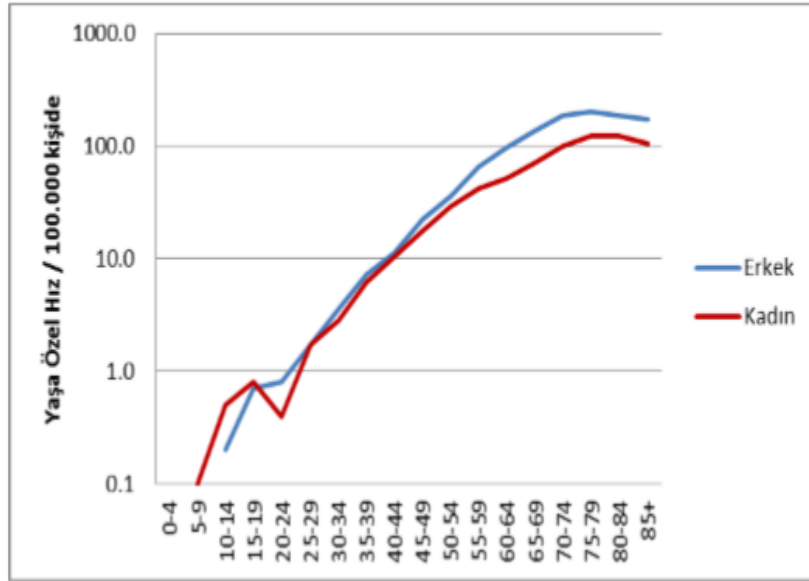
KRK sıklığı ve yüksek mortalitesi sigara içimi ile belirlenmiştir[41]. Genç yaşta sigaraya başlama ve uzun süreli sigara kullanımı (30-40 yıl) kişilerde kolon kanseri için büyük risk taşıdıkları belirlenmiştir[42]. Kolorektal kanseri riski üzerinde tütün kullanımının erkeklerde (%21) ve kadınlarda (%12) farklıdır. Tütün dumanının içerdığı kanserojenler; polisiklik hidrokarbonlar, heterosiklik aminler ve nitrozaminlerdir[43].

2.4.3. Alkol

Alkol tüketimi ve KRK risk artışı arasında netlik kazanmış bir ilişki yoktur ancak alkolün riski artırma sebebi olarak folat emilimini azaltması düşünülmektedir [41]. Alkolün kendisi karsinojen değil ancak tümör destekleyici olarak işlev yapabilir [44]. Asetaldehit, önemli bir alkol metabolitidir ve sigarayla etkileşimi DNA’da spesifik mutasyonlara yol açabilmektedir. Alkol; lipid peroksidasyonu, prostaglandinler ve serbest oksijen radikali üretimine etki edebilir[45].

2.4.4. Yaş

ABD’de KRK sıklığı kadınlarda ve erkeklerde 20-49 yaşları arasındadır[46]. Yaşın ilerlemesi ile kolorektal kanseri gelişime riski artmaktadır ve bu riskin 50 yaş ve üstünde sıklığı %90’dan fazladır. Bu risk 65-85 yaşları arasındaki bireylerde 50 yaş altındaki bireylere göre 6 kat daha yüksektir[47].



Şekil 2-5: Kolorektal Kanserin Yaşa Özel Hızları (Semi-Log) (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015)[24].

İrksal ve etnik gruplara göre kanser insidansı ve ölüm oranları farklılık gösterilmektedir. Araştırmalara göre 2004-2008 yıllarında KRK insidansı ve ölüm oranı Afrika kökenli Amerikalılarda, Amerika'daki diğer gruplara göre yüksek orandadır. Doğu Avrupa Yahudilerinde de KRK sık görülmektedir 48].

2.4.5. İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları

Crohn hastalığı veya Kronik ülseratif kolit olan kişilerde kolon kanser riskinin arttığı görülmektedir. Bu kişilerde hastalığın başlangıç döneminde %3-8 olan kanser gelişme oranı, 10 yıl sonra %10'a kadar ve 25 yıl sonra ise %30'lara kadar yükselmektedir[49].

2.4.6. Hereditör Faktörler ve Sendromlar

KRK hastalığında kalıtsal yatkınlığı düşündüren olay hastaların %25'inde aile hikayesinin olmasıdır. Kalıtsal kolon kanserlerin iki ana grubu da polipozis sendromları ve nonpolipozis sendromlarıdır[29].

2.4.6.1. Polipozis Koli (Familiyal Adenomatöz Polipozis-FAP)

Hereditör bir hastalık olan polipozis koli otozomal dominant geçiş göstermektedir. Adenomlardan gelişir ve KRK'de %1 oranda oluşmaktadır[50]. Bu adenomlar çocuklukta oluşur ve semptomları ortalama 16 yaşında ortaya çıkmaktadır.

Hastalık, klinik olarak takipsiz hastaların %90'ında kolon kanserinin ortaya çıkma yaşı 45'tir[29]. Sorumlu olan genetik defektin 5.kromozom üzerinde q 21 lokusunda bulunan APC geni olduğu bilinmektedir[51].

2.4.6.2. Herediter Non-polipozis Kolon Kanseri (HNPCK) Sendromları (Lynch sendromu I ve II)

Görülme sıklığı %1-5 olup FAP'den daha sıktır ve otozomal dominant olarak geçer. Mismatch tamir genleri olan hMSH2, hMSH6, hMLH1, PMS2 genlerindeki mutasyon HNPCK'ne sebep olur. Tanı yaşı ortalama 48 olan HNPCK en çok sağ kolonda saptanmaktadır. Lynch I sendromunda sadece kolon kanseri görülür[52]. Lynch II sendromunda ise mide, meme, over, uterus, ince bağırsak, üreter, renal pelvis kanserlerde görülmektedir[53].

2.5. Diyagnoz

KRK tanısında rektalde kanama, dışkılama alışkanlığında değişiklikler olması, karında dolgunluk hissi, karın ağrısı, barsakda obstrüksiyon belirtileri olması, demir eksikliği anemisi bulgu ve semptomlarla başvuran hastada kolonoskopi veya rektosigmoidoskopi ile tümör biyopsisi yapılır ve teşhis konulur[54]. Basit noninvaziv tanı muayenesi gaitada gizli kan testidir. Dışkıda hemoglobin olup olmadığını göstermek için bu test yapılır. Dışkıda kan olması gastrointestinal kısımda kanama olduğunu gösterir[54]. Tümör markerları, tümör hücreleri ya da sağlıklı hücreler tarafından tümöre cevap olarak üretilen maddelerdir. Tümör markerları olan CA 19.9, CA 72.4 ve özellikle CEA (karsinoembriyonik antijen) hastalığın takibinde faydalıdır ama tanıda kullanılamazlar[2].

2.6. Evreleme

Kolon kanserinde son derece önemli olan yayılım prognoz, değişik evreleme yöntemlerini kullanılmaktadır. 1930 yılında ilk çalışmalar Dukes tarafından Kolorektal kanser evrelendirilmesi üzerine yapılmış, 1954 yılında Astler ve Coller tarafından Dukes sınıflandırılması modifiye edilmiştir[55]. En sık kullanılan sistem Dukes tarafından oluşturulan evreleme sistemi ve TNM sistemidir (T:Tümör invazyonu, N:Lenf nodu tutulumu, M:Metastaz) (Tablo 2-1)[56].

Tablo 2-1: Kolorektal Kanserde Evreleme ve TNM Sistemi[57].

Tis: İnsitu karsinom	N0: Lenf nodu tutulumu yok
T1: Submukoza invazyonu	N1: 1-3 lenf nodu tutulumu
T2: Muskularis propriaya invazyon	N2: >4 lenf nodu tutulumu
T3: Seroza invazyonu	M0: Uzak metastaz yok
T4: Komşu organ invazyonu	M1: Uzak metastaz var

Evre	TNM	Dukes sınıflaması	Tümör invazyon derecesi	5 yıl hayatta kalım
0	T0, N0, M0		Gözle görülür tümör yok	
I	T1, N0, M0	A	Tümör mükularis mukoza ve submukozaya sınırlı	% 97
I	T2, N0, M0			% 90
II	T3, N0, M0	B1	Tümör mükularis propriaya sınırlı	% 78
II	T4, N0, M0	B2		% 63
III	T1-4, N1, M0	C1	Serozaya ulaşmış, komşu organ tutulumu olabilir	% 56-65
III	T1-4, N2, M0	C2		% 26-37
IV	T1-4, N1-2, M1	D	Uzak metastaz var	%1

2.7. Kolorektal Kanserin Moleküler Mekanizması

Normal dokuda büyümeyi kontrol eden moleküler mekanizmaların bozulması, genetik değişikliklere sebep olarak kolorektal kanserini oluşturmaktadır. Onkogenlerdeki multiple mutasyonların birikimi ve tümör süpresör genler, hücre proliferasyonun ve apoptozun arasındaki dengeyi etkileyerek karsinogenezde ilk değişikliğe sebep olur[58]. Temelde genetik değişimler, iki farklı mekanizmadır ve epitel hücrelerin neoplazik sürece girmesi için gereklidir. Bu mekanizmalar:

1. Genomic instability; allelik kayıplar ve anöploidi ile karakterize olan kromozomal kararsızlıklar,
2. Microsatellite instability-MSI; DNA mutasyonları ve diploidinin artması ile kendisini gösteren değişiklikler[59].

Kolorektal kanser gelişimindeki üç temel genetik değişiklikler;

1. Tümör supresor gen aktivitesinin düşüşü veya kaybolması
2. Protoonkogenlerde oluşan değişiklikler
3. DNA onarımına (mismatch repair) sebep olan genlerdeki değişiklikler[60].

2.7.1. Tümör Supresör Genlerdeki Değişimler

Tümör supresör genler, hücre çoğalmasında negatif yönde rol oynayan genlerdir. Bu genlerin aktivitelerinin kaybolması ve hücrenin programlanmış ölümü (apoptoz) engellenmek için her iki allel gende mutasyon veya kayıp oluşması gerekir. Eğer proliferasyonu doğrudan baskılıyorsa “bekçi” (gatekeeper) tipi genler denmektedir. Bekçiler, hücre siklusunu denetleyerek hücreyi apoptoza yönlendirirler. Örneğin TP53 önemli bir tümör süpresör genidir[61].

Bir başka tümör süpresör gen tipi de dolaylı etki gösterenlerdir. Bunlara “bakıcı” (caretaker) tipi tümör süpresör genleri denir. Bakıcılar mutasyon oluşumunu engelleyen ve genomun tamamından sorumlu DNA tamir genleridir[62].

Tablo 2-2: Tümör Süpresör Gen Tipleri [62].

Tümör süpresör genin tipi	Gen	Kalıtsal kanser	Sporadik kanser
Hücre bölünmesi kontrolü (Bekçi tipi TSG)	RB1	Retinoblastoma	Bir çok sporadik kanser
	VHL	Von Hippel Lindau hastalığı	Böbrek tümörü, merkezi sinir sistemi hemanjiyoblastoması
	NF1	Nörofibromatozis tip 1	Malin periferik sinir kılıfı tümörü
	NF2	Nörofibromatozis tip 2	Meningiom
	APC	Familiyal adenomatöz polipozis	Kolorektal kanser
DNA tamir genleri (Bakıcı tipi TSG)	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	Hereditör non-polipozis kolon kanseri	Kolon, mide, endometriyum kanseri
	BRCA1, BRCA2	Hereditör meme/over kanseri	Over ve meme kanseri
Apoptozis genleri	TP53	Li-Fraumeni sendromu	Bir çok sporadik kanser
	P16	Ailesel melanoma	Bir çok sporadik kanser

2.7.2. Protoonkogenlerin Aktivasyonu

Hücrede uyarı iletiminde rol oynayan ve hücre büyümesini kontrol eden genler, Protoonkogenlerdir. Bu genlerin uygunsuz aktivasyonları hücrenin yüzeyinden nukleusa mesajların anormal iletilmesine ve anormal hücre proliferasyonuna sebep olarak tümör oluşumuna neden olur. Ras geni önemli bir onkogendir. İnsan metabolizmasında hücre içi uyarı iletimini düzenleyen nükleotidi (guanin) bağlayan proteinleri kodlayan 3 tane ras geni bulunmaktadır (K-ras, N-ras ve H-ras). Kolorektal kanserlerin %65’inde ras

geninde nokta mutasyonu mevcuttur (genelde K-ras). Adenom gelişim sürecinde orta dönemlerinde de ras mutasyonları oluşmaktadır.

2.7.3. DNA Onarım Genlerin Değişiklikleri (mismatch repair gens)

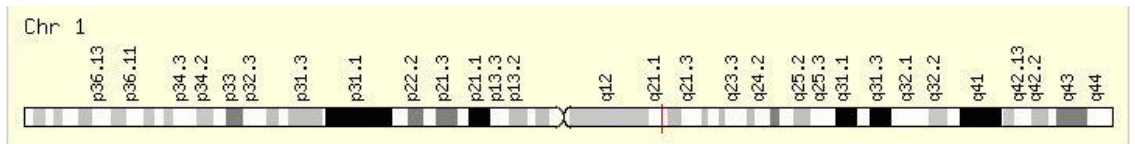
İnsan genomu var olan 23 çift kromozom, yaklaşık olarak 100.000 gen içerir. Bu da 3 milyara yakın nükleotit demektir. Kalıtım yoluyla her bir kromozom çifti anne ve babadan geçer ve kromozom üzerinde her genin bir benzeri (allel) bulunur. Hücre bölünmesi sırasında kromozomlardaki dizilim kopyalanır ve yeniden eşleşerek oğul hücrelere aktarılır. Normal kabul edilebilir bir mutasyon hatası, bir hata her 10 milyar nükleotid çiftinin kopyalanması sırasındadır. Daha fazla kopyalanma hatalarının düzeltilmesi için onarım genleri mevcuttur (Mismatch repair genes – MMR). Bir hücre fazlaca mutasyona uğrarsa kanser hücresine dönüşme sebebi genomik kararsızlık (genomic instability) mekanizmasıdır. Bu mekanizma kolon karsinogenezinde önemli bir mekanizmadır. Kolon kanserinde sık olarak görülen genomik kararsızlık türleri; kromozom translokasyonları, mikrosatellit kararsızlığı (Microsatellite instability -MSI) ve kromozom kararsızlıklarıdır[63].

2.8. Tiyoredoksin Etkileşimli Protein (TXNIP)

2.8.1. TXNIP'in Genel Özellikleri

TXNIP ilk kez 1994 yılında, ekspresyonu artan bir gen olarak HL-60 hücrelerinde 1,25 Dihidroksivitamin D3 ile tanımlanmıştır[64].

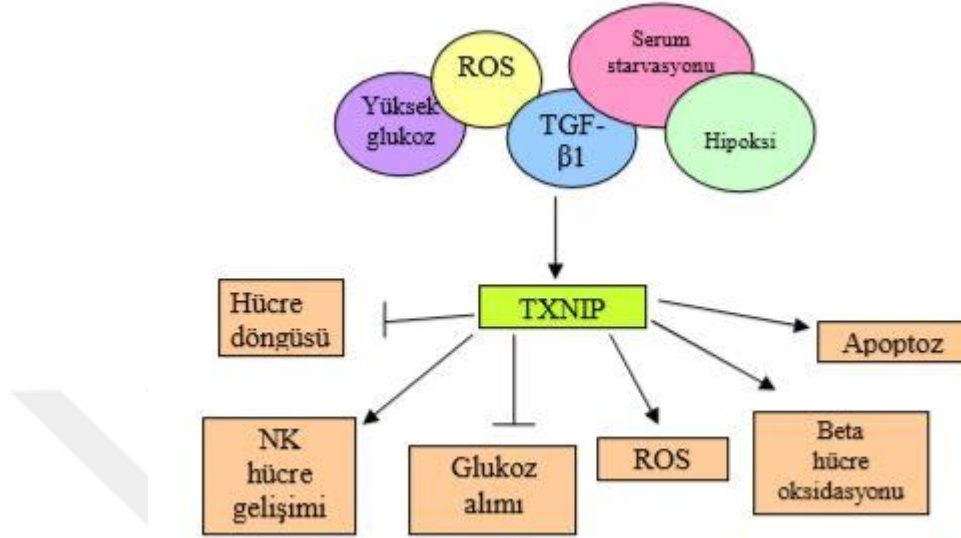
TXNIP (VDUP- 1 veya TBP-2) redoks sisteminin anahtar modülatörüdür ve tioredoksinnin (TRX) aktif sistein kalıntısına bağlanıp antioksidatif fonksiyonunu inhibe eder. TRX'in negatif bir regülatörüdür ve aynı zamanda güçlü bir büyüme baskılayıcıdır[65]. Bu gen metastaz inhibitör özelliği ile proapoptotik fonksiyona sahiptir[66]. İnsan TXNIP geni 4174 bp uzunluğu, 1q21.1 kromozomunda, 391 amino asit ve 8 ekzon içerir[67].



Şekil 2-6: TXNIP'in 1. Kromozom Üzerindeki Lokasyonu[67]

Tiyoredoksin etkileşimli protein, hücresel redoks dengesini sağlamaktadır. TXNIP geni, stres koşulları altında örneğin; H₂O₂, serum starvasyonu, ısı şoku ve

yüksek glikozla uyarılmaktadır. TXNIP geninde oluşabilecek bir mutasyon, glukoz metabolizmasını, lipid metabolizmasını ve NADH/NAD⁺ oranlarını etkilemektedir.



Şekil 2-7: TXNIP'in Biyolojik Süreçler [62].

TXNIP genin ekspresyon kaybı veya downregülasyonu çeşitli yaklaşımlarla insanın primer tümör hücrelerinde belirlenmiştir.

TXNIP aşırı ekspresyonu, tümör hücresi proliferasyonunu ve hücre döngüsü progresyonunu inhibe eden TXN aktivitesini durdurur[68].

2.8.2. TXNIP'in Kansere Sürerindeki Rolü

Tümör baskılayıcı genlerde ve hücrel onkogenlerde biriken mutasyonlar, tümör gelişimine sebep olmaktadır[69]. Ekspresyonu değışen genler, proliferasyon, diferasyasyon apoptoz gibi birçok biyolojik yanıtı karsinogenez boyunca etkilerler. Bu bakış açısından, akciğer, kolon ve meme gibi birçok tümör dokusunda TXNIP ekspresyonu azaldığı gösterilmiştir[70]. TXNIP ekspresyonundaki azalma, epigenetik mekanizmalara örneğin; histon asetilasyonuna ve DNA metilasyonuna bağlıdır[71]. Renal kanser üzerinde bir çalışmada, promotor bölgede CpG adacıklarının hipermetile olarak TXNIP'in protein düzeyinde ekspresyonu azalmıştır[72].

2.9. A-kinaz Ankraj Proteinler (AKAP12)

AKAP'ler, protein kinaz A'nın (PKA) alt birimlerini sabitleme vasıtasıyla çeşitli hedefleme alanları amacıyla farklı hücresel konumlara kılavuzluk etmektedir[73]. AKAP'ler, reseptörler, protein kinazlar, iyon kanalları, küçük GTPazlar, fosfatazlar, fosfodiesterazlar ve birçok başka sinyal elementleri ile ilişkilidir. Bir çok AKAP, hücre döngüsü regülasyonunda önemli olmalarından dolayı hayati rolleri nedeniyle tümör baskılayıcı olarak tanımlanmaktadır[74]. İskelet proteinleri olan A-kinaz ankraj proteinler (AKAP'ler) hücre içi sinyalleme kompartmanizasyonu korurlar[57]. AKAP olarak keşfinden beri, hücre döngüsü regülasyonunda AKAP12 en çok çalışılan AKAP'lerden birisidir[75].

İlk olarak AKAP12, myastenia gravis hastaların serumda otoantijen olarak kabul edilmiştir [76]. AKAP12 ekspresyonu malignitede baskılama özelliğine sahiptir. Örneğin; meme, prostat, mide ve kolon kanserleri gibi birçok insan malignitesinde baskılandığı bilinmektedir[77]. İnsanlarda ve kemirgenlerde, 2 ana AKAP12 transkript α ve β , yaklaşık 35 Kb aralıklı bağımsız promotörlerden eksprese edilir. Ancak, >% 93 amino asit kimliğini paylaşımlarıyla sonuçlanan ortak bir büyük ekzonla birleşirler. α ve β AKAP12 protein izoformları, embriyoda ve erişkinde her yerde sırasıyla 305- veya 290-kDa ürünleri olarak ifade edilmektedir[78].

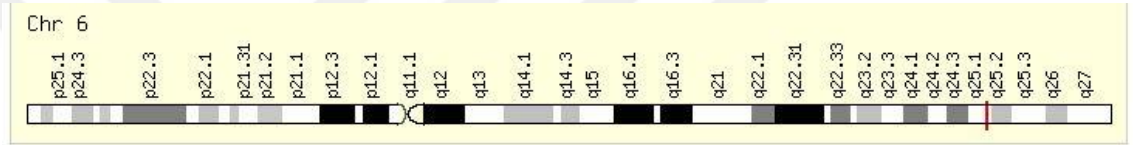
Gravin ve olarak bilinen A-kinaz ankraj proteini 12 (AKAP12), protein kinaz C (PKC), PKA, F-aktin gibi birçok önemli sinyal faktörü için yeni bir kuvvetli iskele proteindir. Aynı zamanda hücre iskeleti tadilatı, hücre göçü, kan-beyin bariyeri gelişimi gibi çeşitli hücresel ve fizyolojik olayları modüle eder ve onkogenik süreçlerde de görev almaktadır. AKAP12 downregülasyonu genel olarak kromozomlarda hipermetilasyon veya silinmeden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, hücrelerde yoğun ekspresyonunun onkogenik ve metastatik özellikleri baskımlarken eksikliğin onkojenik transformasyona duyarlılığı yükselttiği düşünülmektedir[79].

Hücre döngüsü regülasyonundaki bozukluklar; nörodejenerasyon, kanser ve diyabet gibi hastalıklarla ilişkilidir. Hücresel cevapların verimliliğini ve doğruluğunu sağlamak için en yaygın strateji hücresel sinyalleme bölümlere ayrılmasıdır[80].

Genellikle AKAP12'nin, hücre döngüsü fazlarının farklı birleşmesi nedeniyle hücre döngüsünü düzenlediğini göstermektedir:

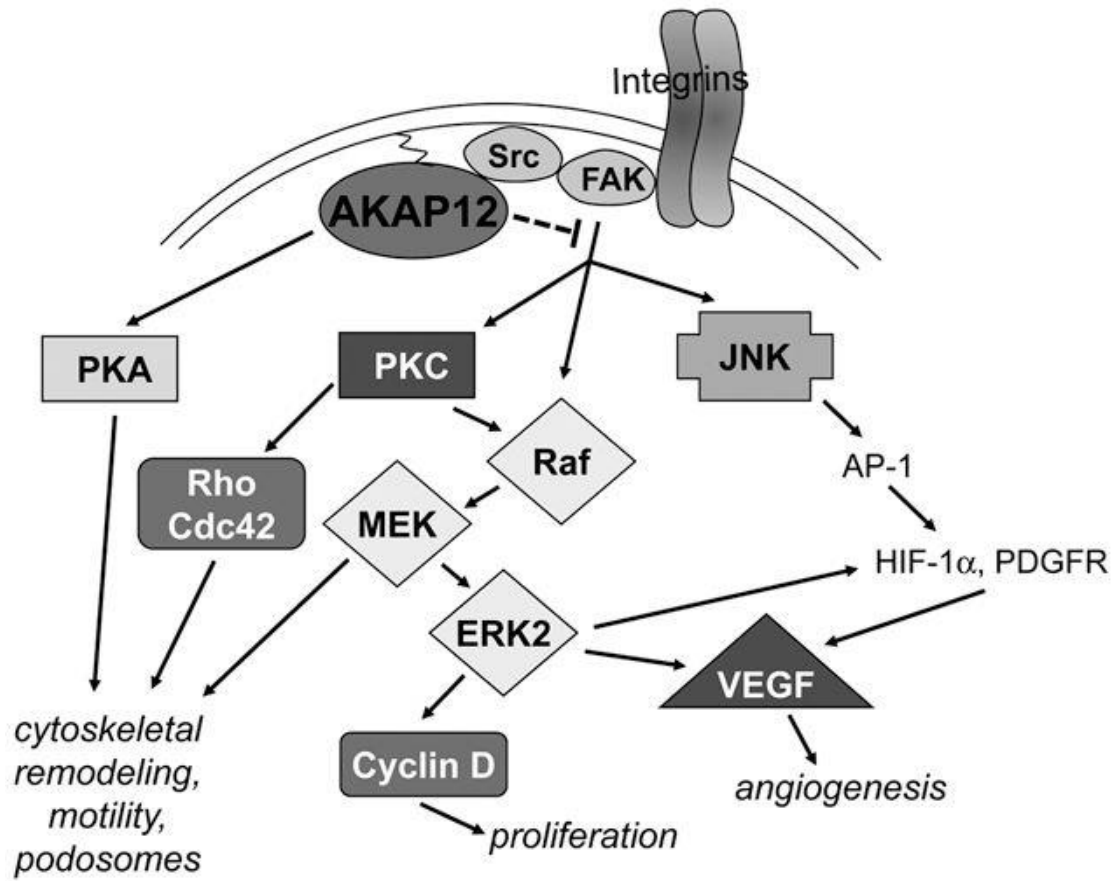
1. Uygun ve doğru olmayan hücre döngüsü ilerlemesinde negatif regülatör olarak davranmak;
2. Sitokinezi ve mitozu kolaylaştırmaya yardım etmektir[81] .

AKAP12 ekspresyonunda downregülasyonunun neden olduğu anormal hücre döngüsü regülasyonu, prostat hiperplazisine, pulmoner adenokarsinoma, myelodisplastik sendroma ve mide karsinomasına sebep olmaktadır. AKAP12 promoterinin hipermetilasyonu ve downregülasyonu özofageal neoplastik progresyon, gastrik karsinomda, kolon kanserinde yapılan bir çalışmada gözlemlenmiştir. AKAP12'ta bulunan 6q24-25.2 lokusunun kaybı, malignite ve metastaz ilerlemesiyle de ilişkilidir[57].



Şekil 2-8: AKAP12 'in 6. kromozom üzerindeki lokasyonu.

AKAP12 kanserin ilerlemesini de baskılamaktadır. Bunu yaparken Src-FAK komplekslerinin yapışmayı ve büyüme faktörünün neden olduğu aktivasyonunu, muhtemelen AKAP12'nin Src'ye direkt olarak bağlanması yoluyla, Raf / MEK / ERK- ve JNK-aracılı proliferasyon, anjiyogenez ve sitokeletal yeniden biçimlendirme sinyallerinin transdüksiyonundan ayırmak suretiyle kanser ilerlemesini baskılamaktadır. -SH3 alanı, Src-FAK sinyal komplekslerinin değişmesine sebep olmaktadır. AKAP12 ayrıca doğrudan bir iskele fonksiyonuyla PKC aktivasyonunu da durdurmaktadır. Bir diğer yandan ise AKAP12, PKA'nın iskele edilmesi cAMP kaynaklı sitoskeletal remodeling'i kolaylaştırmaktadır[82].



Şekil 2-9: AKAP 12 tarafından kanserde kontrol edilen yollar[80].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Seçimi

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır:

1. 58 sağlıklı ve kolorektal kansere ilişkin herhangi bir patolojik bulgusu bulunmayan kontrol grup
2. 80 hasta ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi tarafından takip edilen ve kolorektal kanser tanısı konulmuş hasta grubu

Çalışmaya katılacak olan gönüllülere, yapılacak araştırma ile ilgili bilgilendirilmiş gönüllü onam formu okutularak imzalatılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik değerlendirmeleri ve örnek alımları ilgili kliniklerde gerçekleştirilmiştir ve alınan kan örnekleri gerekli koşullar altında anabilim dalımıza ulaştırılmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı (+4 °C) (Arçelik, Türkiye)
- Buzdolabı (-20 °C) (Arçelik, Türkiye)
- Derin Dondurucu (-80 °C) (DaihanScientefic, Güney Kore)
- Distile Su Cihazı (Millipore, Almanya)
- Homojenizatör (Analytik Jena, Almanya)
- Vorteks-Mikrospin (Biosan, Letonya)
- Isıtıcı Blok (Biosan, Letonya)
- Otomatik Pipet Seti (Gilson, Amerika Birleşik Devletleri)
- Nanodrop Spektrofotometre (Thermo Scientific, Almanya)
- Qubit Florometre (Invitrogen, Amerika Birleşik Devletleri)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter, Almanya)
- DNA/RNA UV Cleaner Kabin (Biosan, Letonya)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Wealtec Keta, Amerika Birleşik Devletleri)
- Real Time PCR Cihazı (Agilent Technologies Stratagene, Amerika Birleşik Devletleri)

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

STL-P1, Proteinaz K, 3M GIT2, Izopropanol, DNaz I, WB1, WB, 1X TE, Tris baz, EDTA, Etanol (%99), Sodyum klorür, sodyum hidroksit, SDS, TRİTONX

3.4. Kullanılan Çözeltiler

3.4.1. Rna İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.4.1.1. STL-P1

1M Tris-Cl pH 8.0 + 1M EDTA pH 8.0 + 5M NaCl + %20 SDS + PVP-10

3.4.1.2. Proteinaz K

25 miligram Proteinaz K tartılarak steril bir tüp içinde steril distile su ile 1 mililitreye tamamlandı

3.4.1.3. 3M GIT2

3M GIT+%2 TRİTONX

3.4.1.4. Izopropanol

3.4.1.5. DNaz I

3.4.1.6. WB1

3.4.1.7. WB

1:2 3M GIT+%100 EtOH

3.4.1.8. 1X TE (Tris-EDTA buffer)

10 mM Tris + HCl + 1 mM EDTA

3.4.1.9. 1M EDTA

372.2 gram Etilendiamintetraasetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 1600 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü ve pH'sı NaOH çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.10. 5M Sodyum Klorür (NaCl)

292 gram NaCl tartılarak erlene alındı. Üzerine 1000 mililitre distile su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. 120°C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.11. %20'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

20 gram Sodyum dodesil sülfat tartıldı. Beher içine alınarak üzerine 160 mililitre distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü ve pH'sı 7.2'ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Dokudan RNA İzolasyonu

- 150 mg doku numunesi 2.0 ml lik vida kapaklı boncuklu tüpe alınır, üzerine 500 µl STL- P1 (1M Tris-Cl pH 8.0, 1M EDTA pH 8.0, 5M NaCl, %20 SDS, PVP-10) eklenir.
- 7000 rpm de, 2 dakika homejenizatörde parçalanır.
- 95 °C'de 10 dakika inkübe edilir.
- Üzerine 25 µl Proteinaz K ve 500 µl 3M GIT2 (3M GIT+%2 TRİTONX) eklenerek vorteksle iyice karıştırılır
- 56 °C de 10 dakika inkübe edilir.
- Ardından 70 °C de 5 dakika inkübe edilir
- Daha sonra 500 µl izopropanol eklenir ve pipetajla karıştırılır
- Tüm numune DNA kolonundan 2 seferde geçirilir.
- Kolona 50 µl DNaz I eklenir ve 37 °C de 5 dakika inkübe edilir.
- Kolona 500 µl 1 WB1(1:1 3M GIT+%100 EtOH) eklenerek 14000 g'de, 1 dakika santrifül edilerek alt faz atılır
- 2 defa 500 µl WB (1:2 3M GIT+%100 EtOH) ile yıkama yapılır
- Alt faz atıldıktan sonra 1 kere tüp boş santrifüj edilir
- Kolon 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne alınır ve 100 µl 1X TE (pH 8.0) eklenir.
- 14000 g de 1 dk santrifüj edilerek kolon atılır oluşan sıvı RNA dır.

3.5.1.1. Elde Edilen RNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Elde edilen RNA'ların saflıkları ve konsantrasyonlarını belirlemek için Thermo Scientific NaNoDrop 2000 spektrofotometre cihazını kullandık. Aşağıda belirtilen formülü kullanılarak tek zincirli RNA'nın konsantrasyonu belirlenmektedir.

$$\text{RNA Konsantrasyonu (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD } 260 \text{ nm} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Seyreltme Katsayısı}) / 1000$$

maksimum absorbans dalga boyları DNA için 260, protein için 280 ve fenolün için 230 'dur. RNA'nın saflığını 260 ve 280 nm'de alınan değerler arasındaki oran belirlemektedir ve bunun için en uygun A260/A280 oranı 1.8-2.0 değer aralığıdır. Konsantrasyonları belirlenen RNA örneklerini cDNA sentezine kadar -80 °C' de saklandı.

3.5.2. Primer Dizaynı

AKAP12 ve TXNIP genlerinin RT-qPCR deneylerinin yapılabilmesi ve bu genlerin sekanslanabilmeleri amacıyla oluşturulan primerler aşağıda verilmiştir. Ayrıca çalışmada yapılacak gen ekspresyon seviyelerinin ölçülebilmesi için gerekli olan referans housekeeping gen olarak seçilen GAPDH genine ait primer dizaynı da verilmiştir.

3.5.2.1. GAPDH genin primer dizaynı

Primer dizaynı için insan GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) genine ait ekzonlar hg38 genom versiyonuna göre incelenmiş ve en uzun ekzon aşağıda sekansı verildiği üzere seçilmiştir.

Primer dizaynı için insan GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) genine ait ekzonlar hg38 genom versiyonuna göre incelenmiş ve en uzun ekzon aşağıda sekansı verildiği üzere seçilmiştir.

>NM_002046.66'in 1. Transkriptine göre RT-PCR primeri dizayn edilmiştir.

Elde edilen sekansa, Primer3 programı yardımıyla 312 bp uzunluğunda ürün verecek şekilde primerler tasarlanmış, primerlerin erime sıcaklıkları arasındaki farkın 10°C den az olması sağlanmış, primer dimer oluşturmamaları için sekanslarının

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACAGTCAGCCGCATCTTCTT	20	59.68	50.00	3.00	0.00
Reverse primer	TTGATTTTGGAGGGATCTCG	20	55.13	45.00	4.00	2.00
Products on target templates						
-NM_001209745.2 Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 3, mRNA						
product length = 484						
Forward primer	1 ACAGTCAGCCGCATCTTCTT	20				
Template	22	41				
Reverse primer	1 TTGATTTTGGAGGGATCTCG	20				
Template	425	484				
-NM_002248.6 Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 1, mRNA						
product length = 332						
Forward primer	1 ACAGTCAGCCGCATCTTCTT	20				
Template	22	41				
Reverse primer	1 TTGATTTTGGAGGGATCTCG	20				
Template	333	354				
-NM_001267943.1 Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 7, mRNA						
product length = 258						
Forward primer	1 ACAGTCAGCCGCATCTTCTT	20				
Template	22	41				
Reverse primer	1 TTGATTTTGGAGGGATCTCG	20				
Template	279	298				

Şekil 3-2: GAPDH için Primer Blast algoritması ile NCBI veribankasında yapılan sanal PCR sonuçları

Elde edilen primerler GAPDH_Human_F (5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3') ve GAPDH_Human_R (5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3') olarak adlandırılmış ve Gerçek zamanlı PZR bu primerlerle optimize edilerek çalışılmıştır.

3.5.2.2. TXNIP genin primer dizayni

Primer dizayni için insan TXNIP genine ait ekzonlar hg38 genom versiyonuna göre incelenmiş ve en uzun ekzon aşağıda sekansı verildiği üzere seçilmiştir.

>hg38_knownGene_uc031utr.2_7 range=chr1:145992385-145993936 5'pad=50 3'pad=50 strand=- repeatMasking=none

Elde edilen sekansa Primer3 programı (bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0) yardımıyla 413 bp uzunluğunda ürün verecek şekilde primerler tasarlanmış, primerlerin erime sıcaklıkları arasındaki farkın 10C den az olması sağlanmış, primer dimer oluşturmamaları için sekanslarının kendilerine ve diğer primere, erime sıcaklığının 100C altına kadar bağlanmamasına dikkat edilmiştir.

[illegible]

Şekil 3-3: Primer3 programı ile TXNIP geni için dizayn edilen primerlerin bağlandığı bölgeler ve primerlerin özellikleri.

Ardından elde edilen primerlerin spesifikliğinin ve diğer insan genom varyasyonlarında tanımlanmış TXNIP genini çoğaltabildiği, sanal PZR ile kontrol edilmiştir. Primer blast algoritması kullanılarak NCBI veribankasında bulunan tüm sekanslar taranarak primerlerin spesifik olduğu aşağıda figür 4 de gösterildiği üzere belirlenmiştir.

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTCGATAGTTTCGGGTCAGG	20	57.05	50.00	5.00	0.00
Reverse primer	CACAGTGCAATAGGCTCCAA	20	56.17	50.00	5.00	2.00
Products on target templates						
~NM_01700035.2 PREDICTED: Homo sapiens thioredoxin interacting protein (TXNIP), transcript variant X1, mRNA						
product length = 413						
Forward primer	1 TTCGATAGTTTCGGGTCAGG 20					
Template	5915 5934					
Reverse primer	1 CACAGTGCAATAGGCTCCAA 20					
Template	2327 2388					
~NM_005335872.1 Homo sapiens thioredoxin interacting protein (TXNIP), transcript variant 2, mRNA						
product length = 413						
Forward primer	1 TTCGATAGTTTCGGGTCAGG 20					
Template	5489 5489					
Reverse primer	1 CACAGTGCAATAGGCTCCAA 20					
Template	5981 5982					
~NM_009472.5 Homo sapiens thioredoxin interacting protein (TXNIP), transcript variant 1, mRNA						
product length = 413						
Forward primer	1 TTCGATAGTTTCGGGTCAGG 20					
Template	5938 5957					
Reverse primer	1 CACAGTGCAATAGGCTCCAA 20					
Template	2256 2275					

Şekil 3-4: Primer Blast algoritması ile TXNIP geni için NCBI veribankasında yapılan sanal PZR sonuçları.

Elde edilen primerler TXNIP_Human_F (5'- TTCGATAGTTTCGGGTCAGG-3') ve TXNIP_Human_R (5'-CACAGTGCAATAGGCTCCAA-3') olarak adlandırılmış ve Gerçek zamanlı PZR bu primerlerle optimize edilerek çalışılmıştır.

3.5.2.3. AKAP12 genin primer dizayni

Primer dizaynı için insan AKAP12 genine ait ekzonlar hg38 genom versiyonuna göre incelenmiş ve en uzun ekzon aşağıda sekansı verildiği üzere seçilmiştir.

>hg38_ncbiRefSeqCurated_NM_005100.3_3 range=chr6:151348661-151353802 5'pad=50 3'pad=50 strand=+ repeatMasking=none

Elde edilen sekansa Primer3 programı yardımıyla 451 bp uzunluğunda ürün verecek şekilde primerler tasarlanmış, primerlerin erime sıcaklıkları arasındaki farkın 10°C den az olması sağlanmış, primer dimer oluşturmamaları için sekanslarının kendilerine ve diğer primere, erime sıcaklığının 100°C altına kadar bağlanmamasına dikkat edilmiştir.

ADDITIONAL OUTPUT									
	start	len	tm	gc%	any	3'	seq		
1 LEFT PRIMER	2326	20	60.03	60.00	6.00	1.00	AGGAGCTCAGCGAGAGTCAG		
RIGHT PRIMER	2776	20	60.00	55.00	4.00	0.00	ATGTCAGGTACGCCACCTTC		
PRODUCT SIZE: 451, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00									
2 LEFT PRIMER	2706	20	59.97	55.00	4.00	0.00	TTAACCAGCTCCCGACAC		
RIGHT PRIMER	3145	20	60.05	50.00	4.00	2.00	TCCATCACCATCTCCTGTGA		
PRODUCT SIZE: 440, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 2.00									
3 LEFT PRIMER	2705	20	59.97	55.00	6.00	0.00	GTTAACCAGCTCCCGACAC		
RIGHT PRIMER	3145	20	60.05	50.00	4.00	2.00	TCCATCACCATCTCCTGTGA		
PRODUCT SIZE: 441, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 2.00									
4 LEFT PRIMER	2328	20	59.89	60.00	6.00	0.00	GAGCTCAGCGAGAGTCAGGT		
RIGHT PRIMER	2776	20	60.00	55.00	4.00	0.00	ATGTCAGGTACGCCACCTTC		
PRODUCT SIZE: 449, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00									
Statistics									
con	too	in	in	no	tm	tm	high	high	high
sid	many	ter	excl	bad	GC	too	too	any	3'
ered	Ns	get	reg	GC	clamp	low	high	compl	compl
Left	40256	0	0	0	19	0	10123	18988	1
Right	40247	0	0	0	17	0	9916	19148	0
Pair Stats:									
considered 2069, unacceptable product size 2057, high end compl 1, ok 11									
primer3 release 1.1.4									

Şekil 3-5: Primer3 programı ile AKAP12 geni için dizayn edilen primerlerin bağlandığı bölgeler ve primerlerin özellikleri

Ardından elde edilen primerlerin spesifikliğinin ve diğer insan genom varyasyonlarında tanımlanmış AKAP12 (A-Kinase anchoring protein) genini çoğaltabildiği sanal PZR ile kontrol edilmiştir. Primer blast algoritması kullanılarak NCBI veribankasında bulunan tüm sekanslar taranarak primerlerin spesifik olduğu aşağıda figür 6 da gösterildiği üzere belirlenmiştir.

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGGAGCTCAGCGAGAGTCAG	20	61.03	60.00	6.00	1.00
Reverse primer	ATGTCAGGTACGCCACCTTC	20	59.75	55.00	4.00	0.00
Products on target templates						
->XM_005297235.3 PREDICTED: Homo sapiens A-kinase anchoring protein 12 (AKAP12), transcript variant X2, mRNA						
product length = 451						
Forward primer	1 AGGAGCTCAGCGAGAGTCAG 20					
Template	2408 2427					
Reverse primer	1 ATGTCAGGTACGCCACCTTC 20					
Template	2858 2839					
->XM_01701517.2 PREDICTED: Homo sapiens A-kinase anchoring protein 12 (AKAP12), transcript variant X1, mRNA						
product length = 451						
Forward primer	1 AGGAGCTCAGCGAGAGTCAG 20					
Template	3035 3054					
Reverse primer	1 ATGTCAGGTACGCCACCTTC 20					
Template	3485 3466					
->XM_009205887.2 PREDICTED: Papio anubis A-kinase anchoring protein 12 (AKAP12), transcript variant X5, mRNA						
product length = 451						
Forward primer	1 AGGAGCTCAGCGAGAGTCAG 20					

Şekil 3-6: Primer Blast algoritması ile AKAP12 geni için NCBI veribankasında yapılan sanal PCR sonuçları.

Elde edilen primerler AKAP12_Human_F (5'-AGGAGCTCAGCGAGAGTCAG -3') ve AKAP12_Human_R (5'-ATGTCAGGTACGCCACCTTC -3') olarak adlandırılmış ve Gerçek zamanlı PZR bu primerlerle optimize edilerek çalışılmıştır.

3.5.3. Ters Transkripsiyon ve Kantitatif QPZR (qPZR)

Primer dizaynlarının tamamlanmasının ardından deneyler RNA örneklerinin cDNA'ya çevrilmesiyle devam etmiştir. Ters transkripsiyon metodu aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

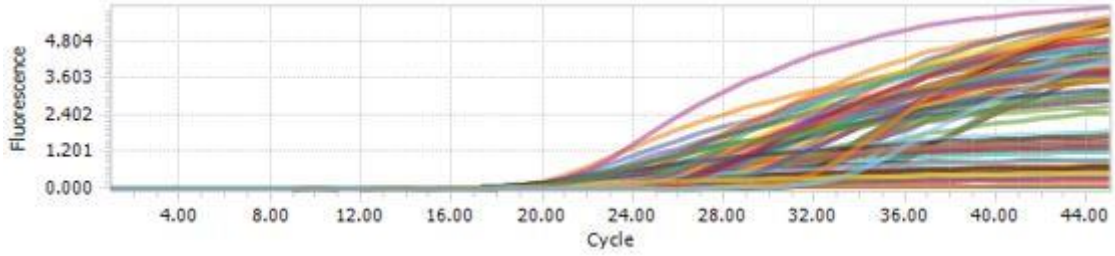
- İzole edilen RNA örneklerinden 12 µL (20 ng/µL) ve 4 µL oligo(dT) primerler (10 nmol) karıştırılır
- 10 dak 70 °C ve daha sonra 5 dak buzda inkübe edilir.
- 8 µL 5x reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ and 50 mM DTT) 2 µL dNTP mix (40 mM), 2 µL ters transkriptaz (200 U/µL) ve 28 µL steril deiyonize su eklenir.
- 60 dak 37°C'de inkübasyon yapılır.
- 10 dak 60°C'de inkübasyon yapılır.
- Elde edilen cDNA, qPZR deneylerinde kullanılabilecek kadar -20°C'de saklanır.

TXNIP ve AKAP12 genlerinin, GAPDH genine (housekeeping) rölatif ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için hasta ve kontrol gruplarının herbirine qPZR analizi aşağıda verilen program ile yapılmıştır.

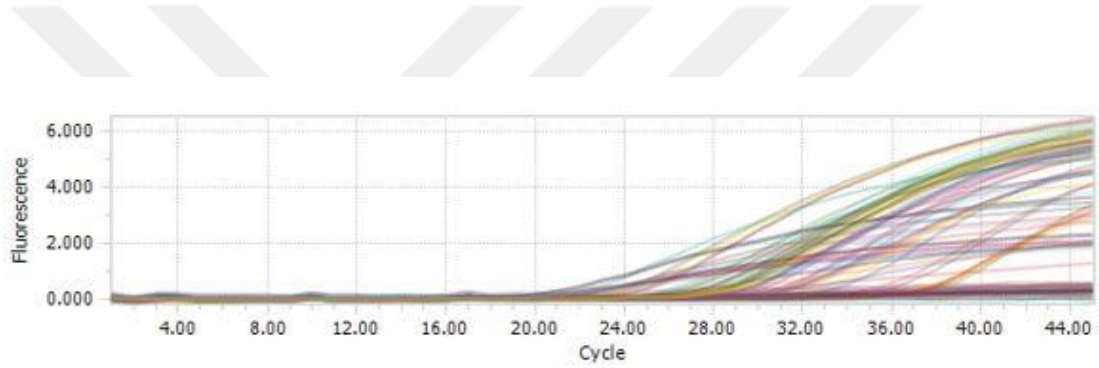
Table 3-1: QPZR çalışma programının sıcaklık ve süreleri

Program	Döngü Sayısı	Sıcaklık °C	Süre(sn)	FAM Floresan okuma(470-510 nm)(Ekzitasyon-Tespit)
Ön Inkübasyon	1	95	600	
Çoğalma	45	95	15	tek
		60	30	
Yüksek Çözünürlüklü Erime Eğrisi	1	65	0.05 °C	sürekli
		95		

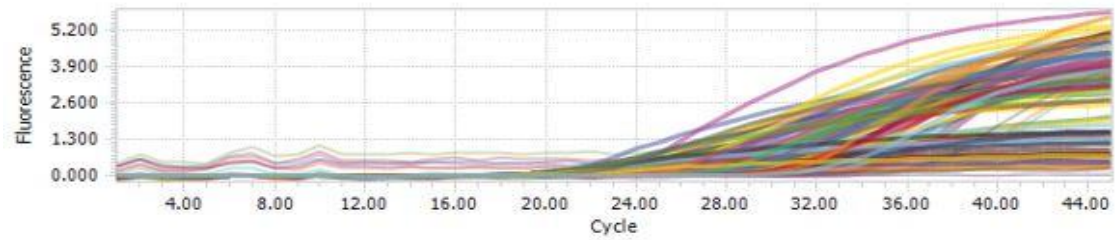
Yapılan QPZR deneylerinden elde edilen yüksek çözünürlüklü erime eğrileri sekansa gidecek örnekleri gruplamak için, çoğalma eğrileri ise ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi için kullanılmıştır. Aşağıda QPZR çalışmasından alınan verilere ait grafikler sunulmuştur.



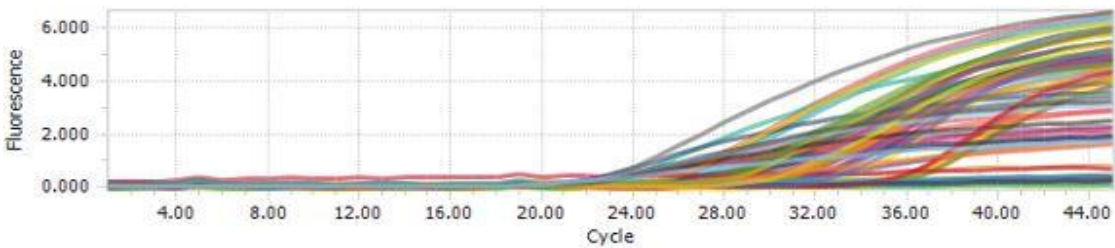
Şekil 3-7: Hasta numunelerine yapılan GAPDH geni QPZR çoğalma eğrileri



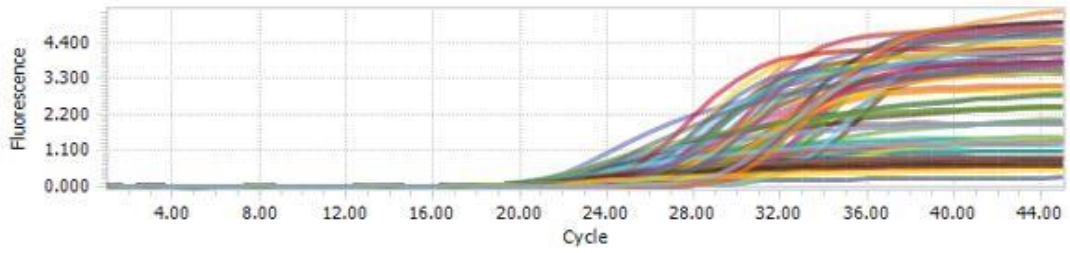
Şekil 3-8: Kontrol numunelerine yapılan GAPDH geni QPZR çoğalma eğrileri.



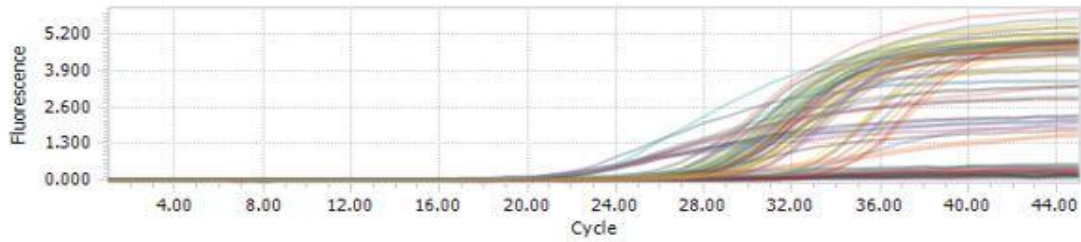
Şekil 3-9: Hasta numunelerine yapılan TXNIP geni QPZR çoğalma eğrileri.



Şekil 3-10: Kontrol numunelerine yapılan TXNIP geni QPZR çoğalma eğrileri.



Şekil 3-11: Hasta numunelerine yapılan AKAP12 geni QPZR çoğalma eğrileri



Şekil 3-12: Kontrol numunelerine yapılan AKAP12 geni QPZR çoğalma eğrileri.

3.5.4. Real-Time PCR (RT-PCR)

Real-Time (Gerçek zamanlı) PZR, nükleik asit miktarlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde nükleik asit miktarının tayini, reaksiyon boyunca ürün miktarı ile orantılı bir şekilde artış gösteren floresan boyaların ve probaların verdiği sinyalin belirlenmesi ile mümkün olmaktadır.

Real-Time PZR 'in en önemli basamağı, DNA parçasının çoğaltımının gerçekleştiği ilk PCR döngüsünün saptandığı basamaktır. Bu döngü Eşik Döngüsü (Cycle Threshold (CT) yada Cross Point (CP)) olarak adlandırılır ve hedef DNA dizisinin neden olduğu floresan ışımının, arka plan ışımından daha büyük olduğu döngüdür. Başlangıçtaki DNA miktarı ne kadar fazlaysa, floresan ışımadaki artış o kadar çabuk gerçekleşir; CT değeri de düşer.

Table 3-2: qRT-PZR karışımının maddeleri ve miktarlar

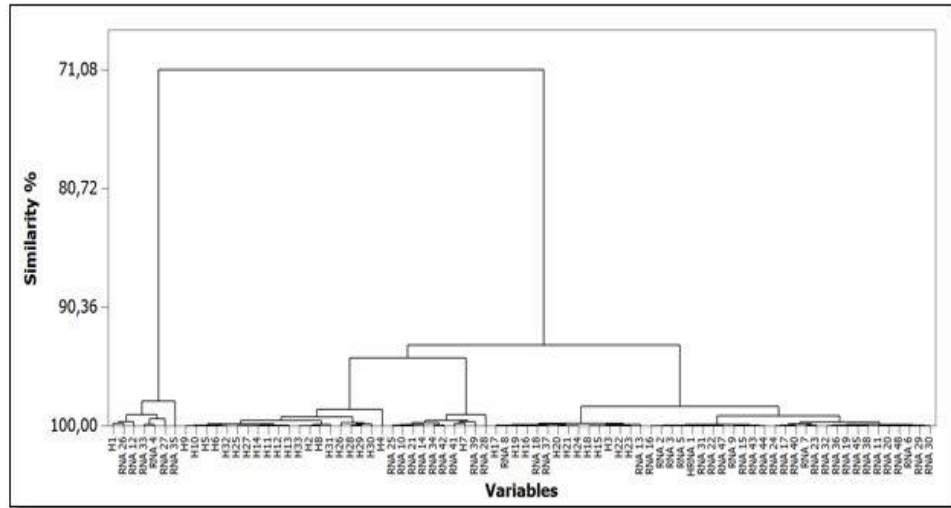
Bileşenler	Miktar
2x RT- HRM Mix	10 µl
Ic GREEN	0,5 µl
RT-RIN Mix	0,6 µl
Primer-Forward (10 pmol/µL)	0,8 µl
Primer-Reverse (10 pmol/µL)	0,8 µl
Steril Su	3 µl
cDNA	4,8 µl
Toplam son hacim	20 µl

Table 3-3: qRT-PZR koşulları

	Sıcaklık	Süre
Ters Transkripsiyon	45 °C	30 Dakika
Ön İnkübasyon	95 °C	5 Dakika
Denatürasyon	95 °C	15 Saniye
Bağlanma ve Uzama	60 °C	30 Saniye
HRM	65°C-95°C	0.02 Saniye

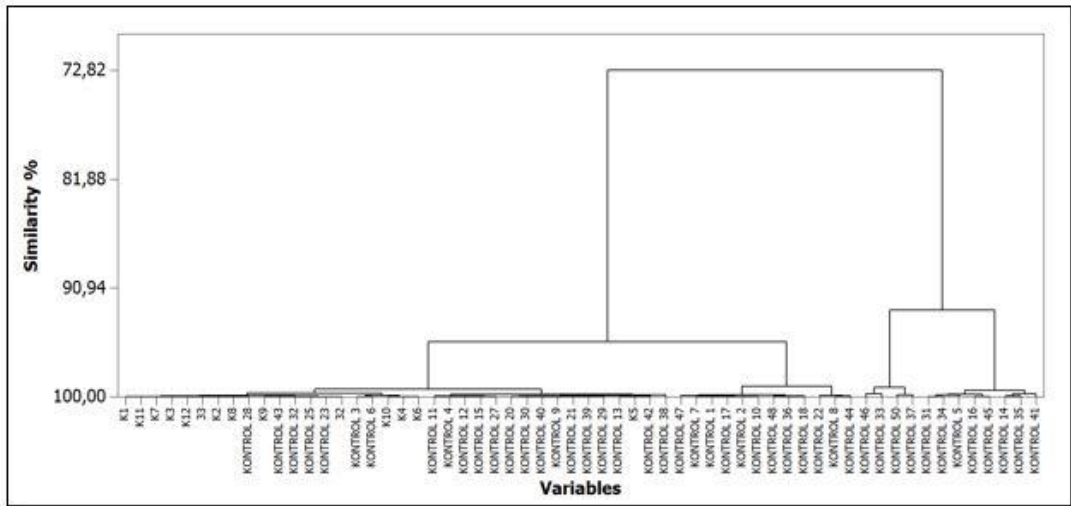
3.5.5. Yüksek Çözünürlükte Erime Eğrisi (HRM) Analizi

HRM analizi, erime eğrilerine ait verilerin sıcaklığa karşı negatif türevi alınıp, floresan seviyelerine göre normalize edilmesinden sonra fark grafiğinin oluşturulmasıyla elde edilen verilerin birbirlerine olan vektörel benzerliklerinin analiz edilmesiyle yapıldı. Bu işlem için Bio-Speedy HRM Analyzer 1.1 yazılımı ve MİNİTAB 14 programı kullanıldı. Yapılan analizlere ait dendrogramlar aşağıda verilmiştir.



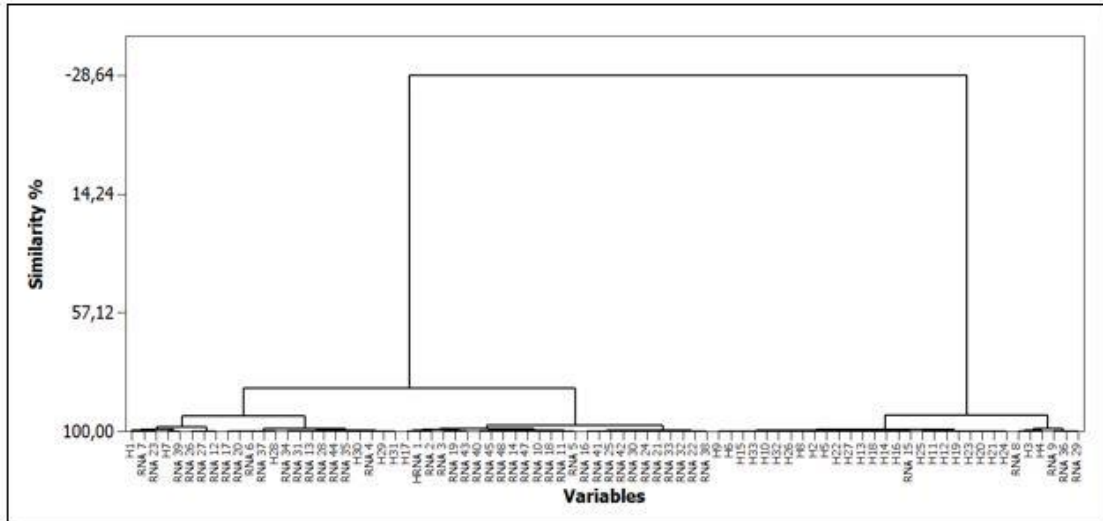
Şekil 3-13: Hasta numunelerinde TXNIP genine yönelik yapılan HRM analizi ile elde edilen dendrogram.

Elde edilen dendrogram ile %99 üzerinde benzerliğe sahip gruplar incelenerek, 7 grup oluşturulmuştur. Bu gruplar daha sonra sekanslanarak aralarında ki farklılıklar bulunmuştur.



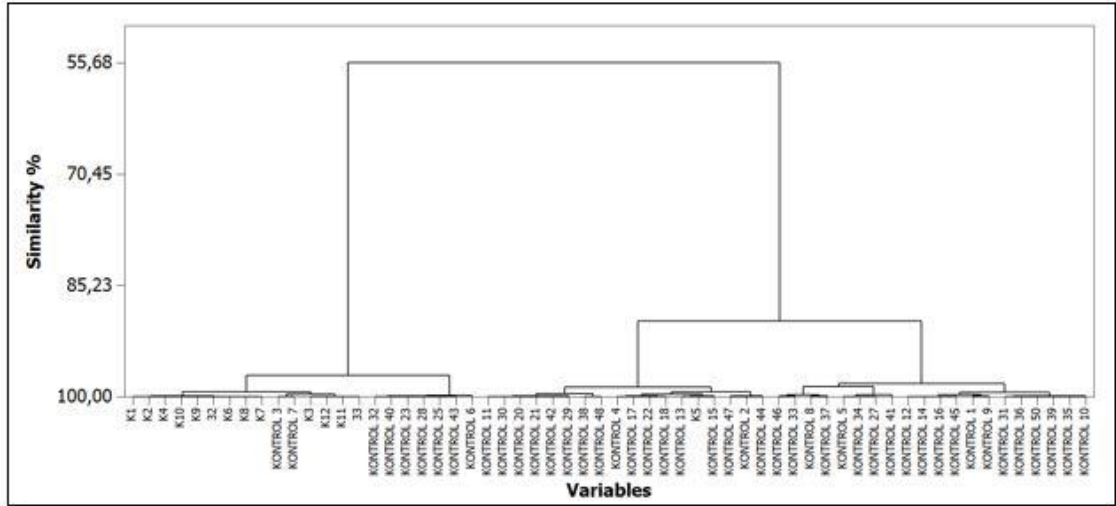
Şekil 3-14: Kontrol numunelerinde TXNIP genine yönelik yapılan HRM analizi ile elde edilen dendrogram.

Elde edilen dendrogram ile %99 üzerinde benzerliğe sahip gruplar incelenerek, 8 grup oluşturulmuştur. Bu gruplar daha sonra sekanslanarak aralarında ki farklılıklar bulunmuştur.



Şekil 3-15: Hasta numunelerinde AKAP12 genine yönelik yapılan HRM analizi ile elde edilen dendrogram.

Elde edilen dendrogram ile %99 üzerinde benzerliğe sahip gruplar incelenerek, 5 grup oluşturulmuştur. Bu gruplar daha sonra sekanslanarak aralarında ki farklılıklar bulunmuştur.



Şekil 3-16: Kontrol numunelerinde AKAP12 genine yönelik yapılan HRM analizi ile elde edilen dendrogram.

Elde edilen dendrogram ile %99 üzerinde benzerliğe sahip gruplar incelenerek, 6 grup oluşturulmuştur. Bu gruplar daha sonra sekanslanarak aralarında ki farklılıklar bulunmuştur.

3.5.6. DNA Dizileme ve Karşılaştırmalar

QPZR sonrasında yapılan standart HRM analizinde sıcaklık 65°C'den 95°C'ye 0.05°C/sn hızla çıkartılmış, bu sırada sürekli floresan okuması alınmıştır (Wittwer 2009). Elde edilen sıcaklık-floresan şiddeti ham verileri, Reja vd. (2010) tarafından tanımlanan istatistiksel yaklaşım temel alınarak analiz edilmiştir.

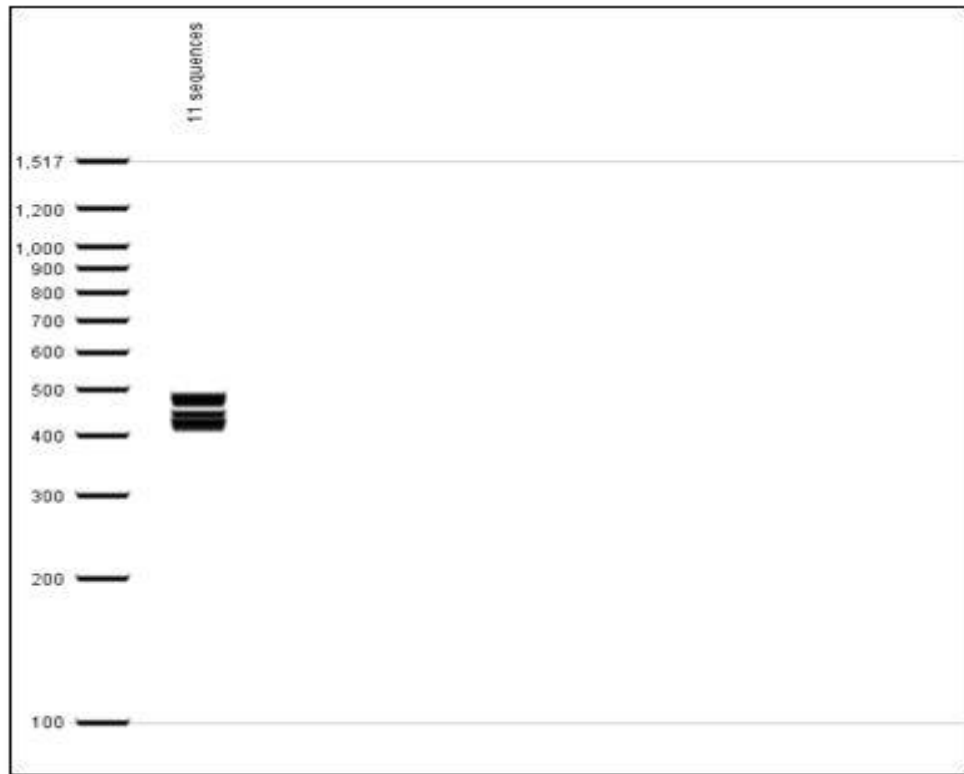
Bu kapsamda kullanılan HRM yazılımı sıcaklık-floresan şiddeti ham verilerini sıcaklık - % floresan değişimi olacak şekilde normalize etmiştir. Elde edilen normalize erime eğrisi profillerinin, numuneler arasından seçilen referans DNA'dan elde edilen erime eğrisi profilinden farkları alınarak farklılık profilleri elde edilmiştir. DNA dizi benzerliğini temsil eden farklılık profilleri gruplandırılmıştır.

Her gruptan 1 adet örnek, Sanger yöntemi ile çift yönlü dizilenmiştir. QPZR sonucunda tüpte bulunan nükleotidler, floresan boyalar vb. PZR bileşenlerinin, çoğaltılmış genlerin dizi analizi öncesi ortamdan uzaklaştırılması için, PCR ürünleri silika DNA kolonları ve DNA bağlama tamponları kullanılarak saflaştırılmıştır. Dizi analizleri ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, ABD) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizilerin kalitesi geneious yazılımı ile kontrol edilmiştir. Dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu diziler NCBI BLAST programı kullanılarak belirlenmiştir.

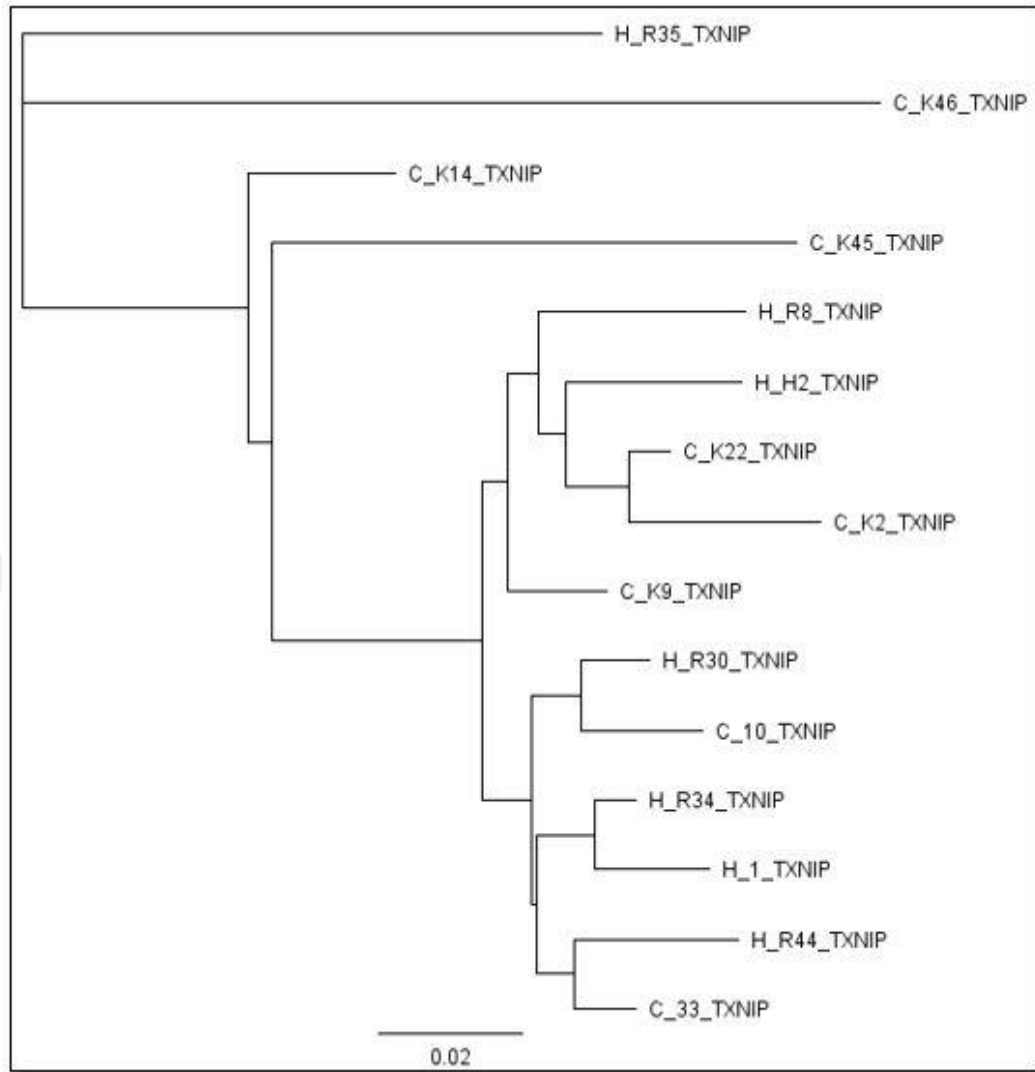
Sekanslanan örneklere, sanal agaroz jel elektroforezi, benzerlik matris analizi ve benzerlik ısı haritası, neighbor-joining algoritması ile oluşturulan dendrogram ve geneious programı içerisinde MAFT algoritması ile oluşturulan hizalama analizleri yapılmıştır.



Şekil 3-17: Sekanslanan TXNIP örneklerine ait sanal agaroz jel elektroforez görüntüsü.



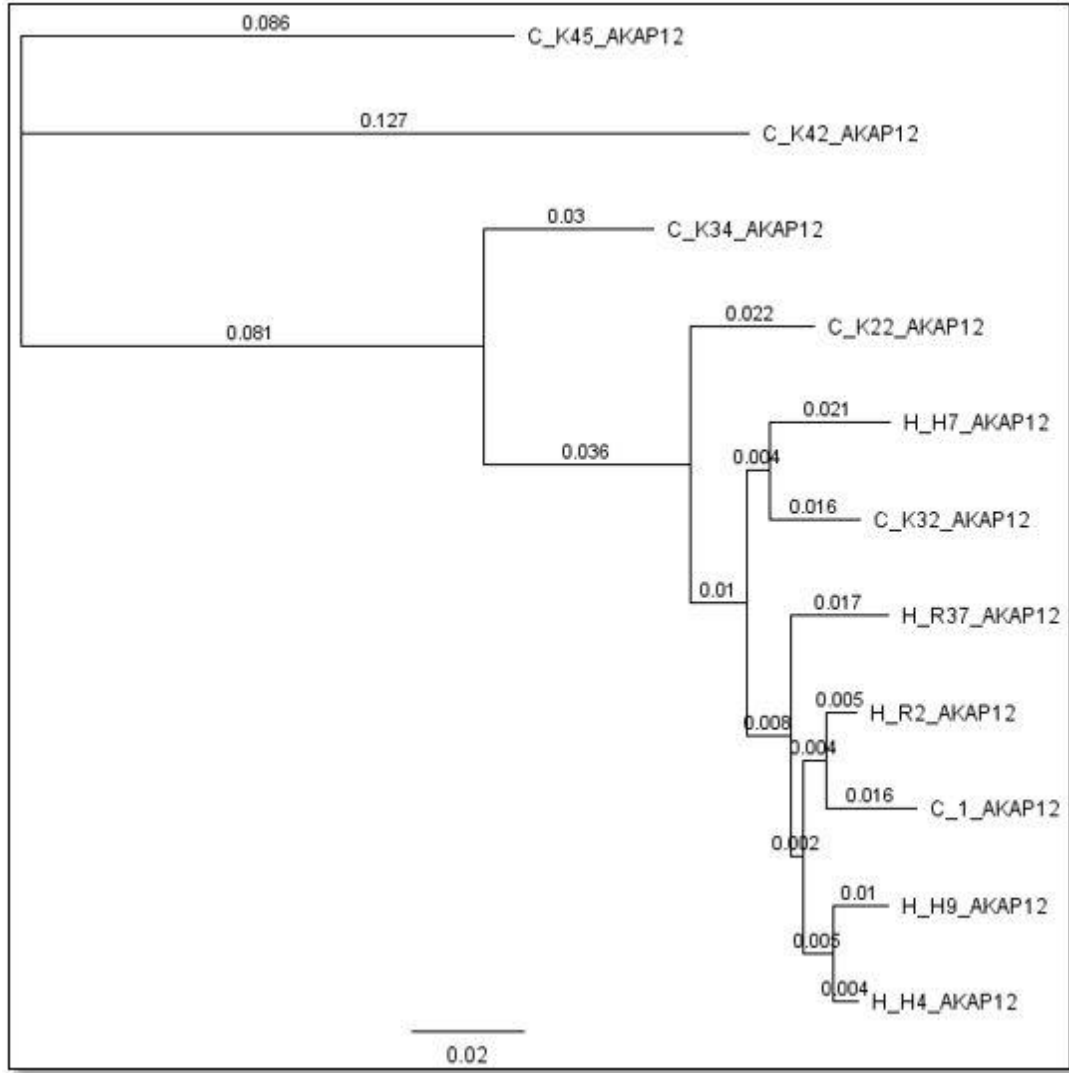
Şekil 3-18: Sekanslanan AKAP12 örneklerine ait sanal agaroz jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 3-19: Geneious program ile oluşturulan TXNIP sekanslarına ait dendrogram.

	H_R44_TXNIP	C_10_TXNIP	H_R34_TXNIP	C_K22_TXNIP	C_K9_TXNIP	C_K2_TXNIP	H_R30_TXNIP	H_1_TXNIP	C_33_TXNIP	H_R8_TXNIP	H_H2_TXNIP	C_K14_TXNIP	C_K45_TXNIP	C_K46_TXNIP	H_R35_TXNIP
H_R44_TXNIP		92.822%	85.789%	86.788%	84.352%	79.357%	89.189%	82.841%	87.469%	80.722%	81.127%	75.586%	73.479%	63.520%	58.186%
C_10_TXNIP	92.822%		83.524%	86.822%	82.144%	75.712%	88.452%	82.482%	78.414%	78.111%	78.811%	71.329%	72.623%	62.944%	58.794%
H_R34_TXNIP	85.789%	83.524%		90.979%	87.529%	83.412%	89.426%	84.158%	84.634%	83.616%	83.424%	76.247%	74.603%	64.377%	58.250%
C_K22_TXNIP	86.788%	86.822%	90.979%		94.301%	94.041%	88.412%	87.371%	84.566%	87.213%	85.294%	78.442%	74.339%	67.534%	59.786%
C_K9_TXNIP	84.352%	82.144%	87.529%	94.301%		89.028%	88.520%	86.811%	78.444%	82.648%	83.902%	73.210%	70.458%	66.162%	57.859%
C_K2_TXNIP	79.357%	75.712%	83.412%	94.041%	89.028%		84.026%	81.357%	76.402%	74.842%	84.841%	65.901%	72.599%	66.076%	60.282%
H_R30_TXNIP	89.189%	88.452%	89.426%	88.412%	88.020%	84.026%		84.314%	86.722%	85.576%	86.964%	77.723%	75.462%	64.557%	58.794%
H_1_TXNIP	82.841%	82.482%	84.158%	87.371%	86.861%	81.357%	84.314%		82.524%	81.295%	80.000%	78.860%	72.895%	62.489%	56.533%
C_33_TXNIP	87.469%	78.414%	84.634%	86.590%	78.140%	78.403%	86.722%	82.524%		71.730%	82.682%	67.094%	73.158%	61.772%	57.533%
H_R8_TXNIP	80.722%	78.111%	83.616%	89.231%	82.088%	74.040%	85.576%	81.295%	71.730%		87.531%	72.664%	73.753%	62.750%	58.438%
H_H2_TXNIP	81.127%	78.811%	83.424%	85.294%	83.902%	84.841%	86.964%	80.000%	82.682%	87.531%		74.321%	68.717%	60.652%	59.149%
C_K14_TXNIP	75.586%	71.329%	76.247%	78.442%	73.210%	65.901%	77.723%	78.860%	87.094%	72.664%	74.321%		68.717%	65.499%	59.586%
C_K45_TXNIP	73.479%	72.623%	74.603%	74.339%	76.608%	72.558%	75.462%	72.895%	73.158%	73.753%	71.279%	68.717%		57.825%	54.592%
C_K46_TXNIP	63.520%	62.944%	64.377%	67.534%	66.162%	66.076%	64.557%	62.489%	61.772%	62.750%	60.652%	65.499%	57.825%		52.764%
H_R35_TXNIP	58.186%	58.794%	58.250%	59.786%	57.859%	60.282%	58.794%	56.533%	57.533%	58.438%	59.149%	59.586%	54.592%	52.764%	

Şekil 3-20: Geneious program ile oluşturulan TXNIP sekanslarına ait benzerlik matrisi ve ısı haritası.



Şekil 3-21: Geneious program ile oluşturulan AKAP12 sekanslarına ait dendrogram.

	H_R37_AKA...	H_R2_AKAP12	H_H9_AKAP12	H_H4_AKAP12	C_1_AKAP12	C_K32_AKA...	C_K22_AKA...	H_H7_AKAP12	C_K34_AKA...	C_K45_AKA...	C_K42_AKA...
H_R37_AKAP12		85.356%	87.553%	91.422%	88.315%	85.681%	81.128%	76.160%	71.759%	49.655%	49.766%
H_R2_AKAP12	85.356%		92.034%	94.357%	93.258%	82.086%	75.314%	77.590%	72.454%	50.231%	51.163%
H_H9_AKAP12	87.553%	92.034%		96.833%	93.468%	83.409%	76.132%	76.695%	73.782%	50.348%	50.930%
H_H4_AKAP12	91.422%	94.357%	96.833%		93.002%	84.773%	81.941%	80.769%	73.550%	50.348%	50.583%
C_1_AKAP12	88.315%	93.258%	93.468%	93.002%		81.448%	80.000%	79.551%	73.210%	49.192%	51.276%
C_K32_AKAP12	85.681%	82.086%	83.409%	84.773%	81.448%		87.442%	82.407%	74.292%	51.991%	51.174%
C_K22_AKAP12	81.128%	75.314%	76.132%	81.941%	80.000%	87.442%		75.966%	73.005%	49.883%	48.244%
H_H7_AKAP12	76.160%	77.590%	76.695%	80.769%	79.551%	82.407%	75.966%		72.222%	52.294%	47.653%
C_K34_AKAP12	71.759%	72.454%	73.782%	73.550%	73.210%	74.292%	73.005%	72.222%		51.054%	44.706%
C_K45_AKAP12	49.655%	50.231%	50.348%	50.348%	49.192%	51.991%	49.883%	52.294%	51.054%		40.000%
C_K42_AKAP12	49.766%	51.163%	50.930%	50.583%	51.276%	51.174%	48.244%	47.653%	44.706%	40.000%	

Şekil 3-22: Geneious program ile oluşturulan AKAP12 sekanslarına ait benzerlik matrisi ve ısı haritası.

3.6. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows) 22.0 programı kullanıldı ve p değeri 0.05' in altında ise anlamlı kabul edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov –Smirnov –Shapiro Wilk testleri ile değerlendirildi. Normal dağılıma uygunluk gösteren bireylerin değerlerinin karşılaştırılmasında Student's t-testi kullanıldı. Tanıtıcı istatistik olarak veriler ortalama±standart sapma ve medyan şeklinde verildi.



4. BULGULAR

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği'nde kolorektal kanser tanısı konulmuş 80 hasta dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak ise 58 sağlıklı ve kolorektal kansere ilişkin herhangi bir patolojik bulgusu bulunmayan örnekler kullanılmıştır.

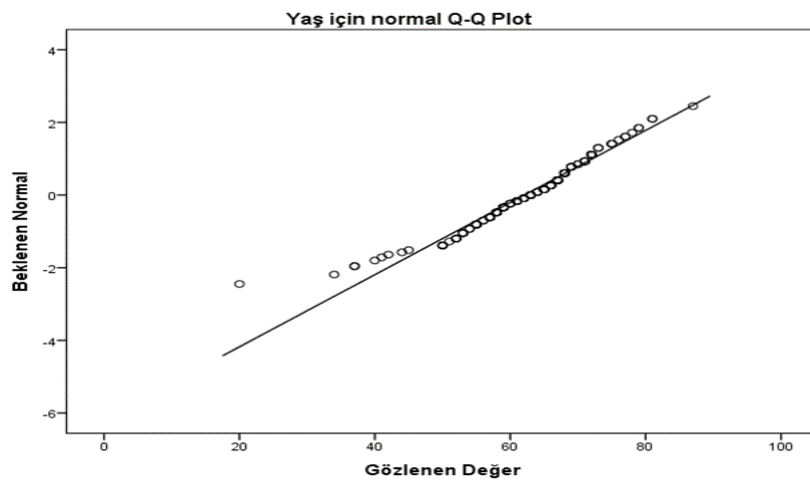
Vaka ve kontrol örnekleri arasında TXNIP ve AKAP12 genlerin varyasyonlarını inceleyip ve kolorektal kanserle herhangi bir ilişkisini bulmaktadır.

4.1. Cinsiyet ve Yaş Faktörlerin Analizi

Toplam 138 olgunun 87'si (%63) erkek ve 51'i (%37) kadınlardan oluşmaktaydı. Yaş ortalaması $62,07 \pm 10,07$ (Minimum: 20, Maksimum: 87)'di. Bahsedilen 138 olgunun 58'i (%42) kontrol grubu ve 80'i (%58) hasta grubunu oluşturmaktaydı.

Kontrol grubundaki 58 olgunun yaş ortalaması $62,05 \pm 7,05$ (Minimum: 45, Maksimum: 81) yaş, hasta grubunda ise yaş ortalaması $62,09 \pm 11,83$ (Minimum: 20, Maksimum: 87) yaş olarak hesaplandı.

Yapılan Kolmogrov-Smyrnov normalite testi sonucunda yaş değişkeninin tüm örneklemeler arasında normal dağılım gösterdiği gözlemlendi. Gruplar arasında yaş farkı değerlendirmesi için 'Bağımsız gruplar arası t-testi' kullanıldı. Kontrol ve hasta grubu arasında yaş açısından farklılık olmadığı saptandı ($p=0.98$, Güven aralığı: %95).



Şekil 4-1: Yaş için normal Q-Q plot.

Kontrol grubun 16'sı (%11,6) kadın ve 42'si (%30,4) erkek idi. Hasta grubunda ise 35'i (%25,4) Kadın, 45'i (%32,6) erkek idi. Yapılan Pearson Ki-Kare testi sonucunda gruplar arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı fark izlenmedi ($p=0,52$).



Şekil 4-2: Gruplar arası cinsiyet dağılımı.

4.2. Gen ekspresyon seviyelerinin bulunması

Çoğalma eğrileri kullanılarak elde edilen bilgilerle ekspresyon seviyeleri hesaplanmıştır. Ekspresyon seviyelerinin karşılaştırmasında amplifikasyon sonucu floresan ışımının ölçülebildiği döngü sayısını gösteren Ct değerleri kullanılmış, Reaksiyon verimi 1,5-2,0 aralığında ve korelasyon faktörü (r^2) sürekli 0.9'un üzerinde olan sonuçlar karşılaştırma analizlerde kullanılmıştır. $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi (Livak ve Schmittgen, 2001) ile hedef genlerin rRNA genine göre rölatif ifade seviyesi hesaplanmıştır.

QPCR sonuçlarına ait Cq değeri, çoğalmanın başladığı döngüyü belirtir ve cihazın belirlediği eşik döngüsünün geçilmesi ile belirlenir. Bu değer gen miktarının rölatif olarak hesaplanması amacıyla kullanılır.

4.2.2. AKAP12 gen ekspresyon seviyesinin hesaplanması

Yapılan hesaplamalar, AKAP12 geninin GAPDH geni referans alındığında hastalarda kontrollere göre gen ekspresyon seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Değişim 0.64 kat olarak bulunmuştur($2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile).

Tablo 4-3: AKAP12 gen ekspresyon seviyesinin hesaplanması ve değişim katının $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile bulunması.

	ORTALAMA HASTA Ct DEĞERİ	ORTALAMA HASTA Ct DEĞERİ	ORTALAMA KONTROL Ct DEĞERİ	ORTALAMA KONTROL Ct DEĞERİ	ΔCt DEĞERİ (HASTA)	ΔCt DEĞERİ (KONTROL)	Delta Delta Ct DEĞERİ	EKSPRESYON DEĞİŞİM KATI
	TE	HE	TC	HC	ΔCTE	ΔCTC	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
GAPDH	-	25.66275	-	27.128667	0.142875	-0.4895	0.632375	0.6451135
AKAP12	25.805625	-	26.639167	-				

Cq değerleri normalize edilerek hesaplamalar yapılmıştır. Normalizasyon sonrası hesaplanan ortalama Cq değerleri ile varyans ve standart sapma hesaplanmış ardından çift yönlü T-testi uygulanmıştır. Bağımsızlık değeri 138 ve p değeri 0.05'ten küçük alındığında T-testi tablosu değeri 1.984 olarak bulunmuş ve bu değer göz önüne alındığında AKAP12 geninin GAPDH geninden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklılaşmadığı bulunmuştur($p>0.05$).

Tablo 4-4: AKAP12 geninin GAPDH genine göre istatistiksel önemini gösteren T-testi.

Ort Hasta	Std Hasta	Var Hasta	Ort Kontrol	Std Kontrol	Varyans Kont	T değeri	T-Table (df=138; p<0.05)
83.522667	161.75502	25837.629	112.40054	243.41101	58261.44	0.7964861	1.984*
*Kontrol ve hasta grubu gen ekspresyon seviyeleri arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (t=0.08; df=138; p<0.05)							

4.3. Değerlendirme

Yapılan çalışma ile Korolektal kanser hastalarında AKAP12 ve TXNIP genlerinin etkisi incelenmiş bu amaçla 80 hasta ve 58 sağlıklı bireyden alınan kolon

örnekleri kullanılmıştır. Hasta ve sağlıklı gruba ait örneklerden RNA izolasyonu yapılmış ve RT-qPZR ile gen ifadelerindeki değişim incelenmiştir. Bulunan sonuçlar T-testi ile incelenmiş ve istatistiksel anlamda önemli bir fark gözlenmemiştir.

Bunun yanı sıra, elde edilen ampliconlar dizilenmiş, hasta ve kontrol grupları arasında ayırma yol açabilecek SNP'ler taranmıştır. Örnek sayılarının dizileme öncesinde, temsil potansiyelini kaybetmeden düşürülmesi amacıyla yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizi gerçekleştirilmiştir. HRM analizi sekans spesifik olarak, ampliconların tek baz değişiminde dahi farklı profiller ortaya koyan fark grafikleri sayesinde aynı diziye sahip numuneleri gruplandırarak analiz işlemlerinin süresini ve maliyetini düşürmüştür. HRM sonuçlarına göre elde edilen grupların içerisinden seçilen numuneler dizilenmiş ve sekanslar incelenmiştir. Aynı şekilde benzerlik matrisi ile kontrol ve hasta grupları arasında belirli bir kümeleşme aranmış fakat örneklerin rastlantısal olarak bir araya geldiği gözlemlenmiştir. Son olarak dendrogramlar oluşturulmuş ve bu şekilde bir ayırmanın olup olmadığı incelenmiş, ayrılan dalların belirli bir grubu diğerlerinden ayıramadığı sonucu ortaya çıkmıştır.

Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında AKAP12 ve TXNIP genlerinin gen ifadesinde ki değişikliğin kolorektal kansere yol açtığı söylenememektedir. Aynı genlerin incelenen ekzonları bağlamında hastalığa yol açan herhangi bir polimorfizm bulunamamıştır. Ancak ileri çalışmalarda bu genlere ait diğer ekzonlarında incelenmesi gerekmektedir.

5. TARTIŞMA

Kolorektal kanserler, dünyada en yaygın kanser ölüm sebeplerinden biridir; Bu nedenle, erken tanı koyma ve uygun tedavi seçimi yapmak hastalığa bağlı ölümlerin azalmasını sağlamaktadır. Kolorektal kanser, en sık görülen gastrointestinal sistem kanser türüdür ve ayrıca cinsiyetlerdeki görülme oranı ise erkeklerde üçüncü sıradayken, bu oran kadınlarda ikinci sıradır[83].

KRK patogenezi farklı bir süreçtir ve değişik faktörden etkilenebilir. Örneğin; yaş, diyet, yaşam tarzı, alkol ve sigara kullanımı, genetik öykü, inflamatuvar bağırsak hastalığı, Crohn ve ülseratif kolit varlığı, yüksek yağlı ve düşük lifli beslenme alışkanlığı ve obezite gibi hastalıklar KRK için etki faktörleri arasındadır[84].

Kanser hücrelerindeki proteinler, genelde onkogenler ve tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanmaktadır. Bu hücrelerin, normal hücrelere göre ekspresyon seviyeleri fazladır. Bu proteinlerin, tümör gelişimi ve metastaz oluşumunda önemli etki sağladıkları düşünülmektedir. Kanserler, genelde büyüme oranları ve saldırganlık dereceleri açısından heterojen özellikler göstermektedir. Bunun nedeni ise mutasyona uğrayan onkogenler ile tümör baskılayıcı genlerin değişik kombinasyonlarının olmasıdır[85].

NADPH, tioredoksin redüktaz (TrxR) ve Trx'den oluşan tioredoksin (Trx) sistemi, hücreleri disülfid redüktaz aktivitesi ile oksidatif strese karşı koruyan önemli bir antioksidan sistemidir. Memeli hücrelerinde, Thioredoxin1 (Trx1) ve Thioredoxin2 (Trx2) izoformu bulunmaktadır[86].

Trx1, genelde sitozolde bulunmaktadır. Fakat aynı zamanda Trx1, çekirdekte yer değiştirir ve belirli şartlar altında hücrelerden salgılanabilir. Buna karşın Trx2 ise sadece mitokondride bulunur [87]. Trx1, disülfid azaltma aktivitesine sahip 12 kDa her yerde bulunan bir proteindir. Tioredoksin (TRX), hem aktif bölge -Cys-Gly-Pro-Cys- de redoks-aktif ditiol içeren bir 12-kDa proteinidir, hem de majör bir tiyol redüksiyon sistemi oluşturmaktadır. TRX genleri hücrelerde koruma görevi görür. Bu genler; hücreleri antioksidan, antiapoptotik ve anti-enflamatuvar etki yoluyla strese bağlı hasarlardan korumaktadır[88].

1999'da tanımlanan Txnip (ayrıca VDUP-1 veya TBP-2 olarak da bilinir), Trx1 bağlayıcı protein, Txnip'in Trx'e bağlanmasını inhibe etmesi nedeniyle, endojen bir Trx inhibitörü olarak rol alan önemli bir Trx bağlayıcı proteindir[89].

TXNIP, ilk olarak HL60 hücrelerinden izole edilmiştir. Çalışmada, vitamin D3 ile muamele edilmiş HL60 hücreleri kullanılmıştır. Daha sonra, çeşitli solid tümörlerde ve hematolojik malignitelerde majör bir redoks regülatörü ve bir Tümör Supresör Gen (TSG) olarak tanımlanmıştır[90].

TXNIP, daha çok sitoplâzma ve mitokondride bulunmaktadır. Txnip'in yoğun ekspresyonu, G0 / G1 fazında hücrelerin büyümesini durdurur. Bu da streslere cevap olarak apoptozu indüklemektedir[91].

TXNIP'in ana görevi ise Tiyoredoksin'in aktif bölgesine bağlanmaktır. Trx-Txnip kompleksinin redoks bağımlı hücre fonksiyonu için önemli olduğunu göstermektedir[92].

Kolorektal kanseri de dahil olmak üzere çeşitli insan kanser türlerinde eksprese edilen ve oksidatif stres dahil olmak üzere çeşitli stres türleriyle indüklenen ve tioredoksin etkileşimli protein (TXNIP), redoks dengesinin önemli bir düzenleyicisi olan negatif bir tioredoksin düzenleyicidir[93].

Txnip, bazı insan kanser hücrelerinde aşağı regüle ederek ve birçok çalışma Txnip'in aşağı regülasyonunun kanserin malignitesine katkıda bulunduğunu göstermiştir[94]. Txnip'in yoğun ekspresyonu, azaltma aktivitesini azaltır ve Trx1'in transkripsiyonunu inhibe eder. Bu da hücre döngüsü durmasını veya apoptozu uyarırken artan ROS ile sonuçlanır.

Bizim yapmış olduğumuz bu çalışmada ise; TXNIP geninin GAPDH geni refrans alındığında hastalarda kontrollere göre gen ekspresyon seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Değişim 0.45 kat olarak bulunmuştur. Normalizasyon sonrası hesaplanan ortalama Cq değerleri ile varyans ve standart sapma hesaplanmış ve çift yönlü T-testi uygulaması sonucu TXNIP geninin GAPDH geninden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklılaşmadığı bulunmuştur($p>0.05$).

Benzer bir çalışmada RT-PCR testini kullanarak Takahashi Y ve arkadaşları, Ülseratif kolit (UC) ve kolorektal kanser üzerinde yaptığı bir araştırmada TXNIP geninin aşağı regüle olduğu gösterilmiştir. UC ve CRC kolon mukoza örneklerinde

ekspresyon seviyeleri, normal dokulardakinden anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir[93].

Ikarashi M ve arkadaşları, gastrointestinal kanser hastalarında yaptıkları bir araştırmada TaqMan RT-PCR testi kullanarak TXNIP geninin ekspresyonunun normal dokulara göre anlamlı bir şekilde azaldığını tespit etmişlerdir[95].

Nishizawa K ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada TXNIP'in insan mesane kanserinde dereceye ve evreye göre aşağı doğru düzenlendiğini ve ayrıca TXNIP ekspresyonunun kaybının, bir fare mesane kanseri modeli kullanılarak mesane kanserogenezini kolaylaştırdığını göstermektedirler[94].

Elisa Frullanti ve arkadaşları akciğer adenokarsinomu çalışmasında, üç akciğer kanseri hücre hattındaki bulgularında TXNIP'in aşağı regüle olduğunu ve TXNIP'in tümör baskılayıcı olarak rolünü desteklemiştir[96].

Farelerde meme kanseri üzerine yapılan bir araştırmada ise Yang X ve arkadaşları TXNIP geninin ekspresyonunun downregüle olduğunu gözlemlemiştirler [97].

Başka bir çalışmada Kwon HJ ve arkadaşları, insan hepatoselüler karsinoma üzerinde yaptıkları bir çalışmada TXNIP ekspresyon seviyelerinin, tümör dokularında önemli ölçüde azaldığını gözlemlemiştir. Araştırmacılar genel olarak, HCC'den elde edilen verilerin TXNIP in hepatik karsinogenez sırasında baskılandığını göstermiştir [98].

Gravin ve SSeCKS olarak bilinen A-kinaz ankraj proteini 12 (AKAP12), protein kinaz C (PKC), PKA, F-aktin gibi birçok anahtar sinyal faktörü için önemli bir yapısal proteindir. AKAP12 ekspresyonu, meme, prostat, mide ve kolon kanserleri dahil olmak üzere birçok insan malignitesinde baskılandığı bilinmektedir[99].

AKAP12'nin promotör hipermetilasyonu, birçok insan kanserinde aşağı doğru düzenlenmesi ya da 6q24-25.2'deki lokusunun kaybı, malignite ve metastaz ilerlemesi ile ilişkilidir[13].

Diferansiyel gen ekspresyonu ve kopya sayısı varyasyonu (CNV) çalışmaları, insan tümörlerinde ve kanser hücre hatlarında birçok kanser tipinde AKAP12 aşağı regülasyonunu göstermektedir[75].

Bizim yaptığımız çalışmada AKAP12 geninin GAPDH geni referans alındığında hastalarda kontrollere göre gen ekspresyon seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Değişim 0.64 kat olarak bulunmuştur. Normalizasyon sonrası hesaplanan ortalama Cq değerleri ile varyans ve standart sapma hesaplanmış ve çift yönlü T-testi uygulaması sonucu AKAP12 geninin GAPDH geninden istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır($p>0.05$).

SOH RYZ ve arkadaşları, yaptıkları bir araştırmada normal MCF10A meme hücre hattında ve altı farklı meme kanseri hücre hattında (AU565, Hs578T, MCF7, MDA-MB-231, T47D ve ZR751) AKAP12'nin ekspresyon düzeylerini inceledikleri çalışma sonucu bu dokulardaki gen ifadesinin azaldığını gözlemlemişlerdir[99].

Goeppert ve arkadaşları, insan HCC'sindeki AKAP12 ekspresyonunun aşağı regülasyonunu vurgulamışlar ve ileri kanserdeki AKAP12 azalmasının, kromozomal kaybı ve promotör hipermetilasyonu ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir[100].

Hye Shin Lee ve arkadaşları, hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu için pozitif olan insan HCC dokularında AKAP12 geninin ekspresyonunu incelemişler ve tümörlerde AKAP12a geninin ekspresyonundaki azalmanın oldukça anlamlı olduğunu göstererek, AKAP12 β gen ekspresyonunda anlamlı bir azalma olmadığını bildirmişlerdir[101].

Bozdoğan ve arkadaşları, metastaz baskılayıcı proteinlerin ekspresyon modellerini tespit etmek amacıyla için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) kullanarak bazal hücreli karsinomlar (BCC'ler) üzerinde yaptıkları bir çalışmada AKAP12'nin azaldığı gözlemlemişlerdir [102].

Choi MC ve arkadaşları, AKAP12'nin insan mide kanserinde önemli bir negatif düzenleyicisi olarak işlev görebileceğini göstermişlerdir [103].

Çalışmamız, TXNIP ve AKAP12 genlerine ait ekspresyon düzeylerinin kolorektal kanseri dokularında normal dokularla karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşük olduğunu doğrulayan bulgular ortaya koymaktadır. Ayrıca TXNIP ve AKAP12 genlerinin KRK de dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde ekspresyonları belirgin şekilde azalmış, bilinen güçlü bir tümör baskılayıcı olabileceği ifade edebilir.

TXNIP ve AKAP12, kolorektal kanseri için umut verici prognostik belirteçler olup, ayrıca TXNIP ve AKAP12 ekspresyon seviyelerine dayalı kişiselleştirilmiş adjuvan KRK tedavisinde etkili bir uygulama olarak düşünülebilir. Sonuçlar

değerlendirildiğinde istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık tespit edilememiştir. Ancak elde ettiğimiz bu sonuçların daha iyi değerlendirilebilmesi için hasta örneklem genişliğinin arttırılarak çalışmaya devam edilmesi gerekmektedir. Aynı genlerin incelenen ekzonları bağlamında hastalığa yol açan herhangi bir polimorfizm bulunamamıştır. Gelecek çalışmalarda bu genlere ait diğer ekzonlar da incelenerek hastalık için yeni bir belirteç bulunması hedeflenebilir.



KAYNAKLAR

- [1] D. Colussi, G. Brandi, F. Bazzoli, and L. Ricciardiello, "Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 8, pp. 16365–16385, Aug. 2013.
- [2] D. Cunningham *et al.*, "Colorectal cancer.," *Lancet (London, England)*, vol. 375, no. 9719, pp. 1030–1047, Mar. 2010.
- [3] H. Brody, "Colorectal cancer.," *Nature*, vol. 521, no. 7551, England, p. S1, May-2015.
- [4] E. R. Fearon and B. Vogelstein, "A genetic model for colorectal tumorigenesis.," *Cell*, vol. 61, no. 5, pp. 759–767, Jun. 1990.
- [5] C. S. Fuchs, E. L. Giovannucci, G. A. Colditz, D. J. Hunter, F. E. Speizer, and W. C. Willett, "A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, no. 25, pp. 1669–1674, Dec. 1994.
- [6] P. J. Morin, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler, "Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 15, pp. 7950–7954, Jul. 1996.
- [7] D. Cruz-Bustillo Clarens, "Molecular genetics of colorectal cancer.," *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, vol. 96, no. 1, pp. 48–59, Jan. 2004.
- [8] P. M. Calvert and H. Frucht, "The genetics of colorectal cancer.," *Ann. Intern. Med.*, vol. 137, no. 7, pp. 603–612, Oct. 2002.
- [9] J. T. Dong *et al.*, "KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2.," *Science*, vol. 268, no. 5212, pp. 884–886, May 1995.
- [10] L. R. Zarour *et al.*, "Colorectal Cancer Liver Metastasis: Evolving Paradigms and Future Directions.," *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 3, no. 2, pp. 163–173, Mar. 2017.
- [11] V. L. Robinson, E. C. Kauffman, M. H. Sokoloff, and C. W. Rinker-Schaeffer, "The basic biology of metastasis.," *Cancer Treat. Res.*, vol. 118, pp. 1–21, 2004.
- [12] G. C. Cheng, P. C. Schulze, R. T. Lee, J. Sylvan, B. R. Zetter, and H. Huang, "Oxidative stress and thioredoxin-interacting protein promote intravasation of melanoma cells.," *Exp. Cell Res.*, vol. 300, no. 2, pp. 297–307, Nov. 2004.
- [13] I. H. Gelman, "Suppression of tumor and metastasis progression through the

- scaffolding functions of SSeCKS/Gravin/AKAP12.,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 31, no. 3–4, pp. 493–500, Dec. 2012.
- [14] C. W. Rinker-Schaeffer, J. P. O’Keefe, D. R. Welch, and D. Theodorescu, “Metastasis suppressor proteins: discovery, molecular mechanisms, and clinical application.,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 13, pp. 3882–3889, Jul. 2006.
- [15] E. A. Arıncı K, *Anatomi*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2014.
- [16] R. Buğra D. Kolon, “Anal Bölge Anatomisi,” *Türkiye Klin. J. Surg.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, 2004.
- [17] 9. Buğra D, “Kolon, Rektum, Anal Bölge Anatomisi,” *Kolor. Özel Sayısı. Türkiye Klin. J. Surg.*, vol. 9, pp. 1–9, 2004.
- [18] G. Bengi *et al.*, “Does glucagon like peptide-2 receptor expression have any effect on the development of human colorectal cancer?,” *Turk. J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 4, pp. 388–394, Aug. 2011.
- [19] D. Aune *et al.*, “Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies.,” *BMJ*, vol. 343, p. d6617, Nov. 2011.
- [20] A. E. Noffsinger, “Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy.,” *Annu. Rev. Pathol.*, vol. 4, pp. 343–364, 2009.
- [21] M. E. Martinez and W. C. Willett, “Calcium, vitamin D, and colorectal cancer: a review of the epidemiologic evidence.,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 7, no. 2, pp. 163–168, Feb. 1998.
- [22] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, “Global cancer statistics.,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 61, no. 2, pp. 69–90, 2011.
- [23] B. K. Edwards *et al.*, “Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1999, featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden.,” *Cancer*, vol. 94, no. 10, pp. 2766–2792, May 2002.
- [24] Murat TÜRKYILMAZ Ezgi HACIKAMILOĞLU, “TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ 2015,” 2018.
- [25] C. DeSantis, D. Naishadham, and A. Jemal, “Cancer statistics for African Americans, 2013.,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 63, no. 3, pp. 151–166, May 2013.
- [26] J. Ferlay *et al.*, “Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012.,” *Eur. J. Cancer*, vol. 49, no. 6, pp. 1374–1403, Apr. 2013.
- [27] H. T. Lynch *et al.*, “Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review.,”

- Gastroenterology*, vol. 104, no. 5, pp. 1535–1549, May 1993.
- [28] H. T. Lynch *et al.*, “A founder mutation of the MSH2 gene and hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States.,” *JAMA*, vol. 291, no. 6, pp. 718–724, Feb. 2004.
 - [29] R. W. Burt, J. A. DiSario, and L. Cannon-Albright, “Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk.,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 46, pp. 371–379, 1995.
 - [30] J. Fischer, L. C. Walker, B. A. Robinson, F. A. Frizelle, J. M. Church, and T. W. Eglinton, “Clinical implications of the genetics of sporadic colorectal cancer.,” *ANZ J. Surg.*, Mar. 2019.
 - [31] A. Umar *et al.*, “Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability.,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 96, no. 4, United States, pp. 261–268, Feb-2004.
 - [32] E. M. Stoffel and F. Kastrinos, “Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome.,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 12, no. 7, pp. 1059–1068, Jul. 2014.
 - [33] M. Song, W. S. Garrett, and A. T. Chan, “Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention.,” *Gastroenterology*, vol. 148, no. 6, p. 1244–60.e16, May 2015.
 - [34] R. L. Santarelli, F. Pierre, and D. E. Corpet, “Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence.,” *Nutr. Cancer*, vol. 60, no. 2, pp. 131–144, 2008.
 - [35] W. Willett, “Nutrition and cancer: the search continues.,” *Nutr. Cancer*, vol. 60, no. 5, pp. 557–559, 2008.
 - [36] H. Bartsch, J. Nair, and R. W. Owen, “Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers.,” *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 12, pp. 2209–2218, Dec. 1999.
 - [37] B. Levin, “Nutrition and colorectal cancer.,” *Cancer*, vol. 70, no. 6 Suppl, pp. 1723–1726, Sep. 1992.
 - [38] T. J. Key, A. Schatzkin, W. C. Willett, N. E. Allen, E. A. Spencer, and R. C. Travis, “Diet, nutrition and the prevention of cancer.,” *Public Health Nutr.*, vol. 7, no. 1A, pp. 187–200, Feb. 2004.
 - [39] R. Baena and P. Salinas, “Diet and colorectal cancer.,” *Maturitas*, vol. 80, no. 3, pp. 258–264, Mar. 2015.

- [40] L. A. Davidson, J. R. Lupton, Y. H. Jiang, W. C. Chang, H. M. Aukema, and R. S. Chapkin, "Dietary fat and fiber alter rat colonic protein kinase C isozyme expression.," *J. Nutr.*, vol. 125, no. 1, pp. 49–56, Jan. 1995.
- [41] Z. Herceg, "Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors.," *Mutagenesis*, vol. 22, no. 2, pp. 91–103, Mar. 2007.
- [42] E. Giovannucci *et al.*, "A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U.S. women.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 86, no. 3, pp. 192–199, Feb. 1994.
- [43] M. L. Slattery, J. D. Potter, G. D. Friedman, K. N. Ma, and S. Edwards, "Tobacco use and colon cancer.," *Int. J. cancer*, vol. 70, no. 3, pp. 259–264, Jan. 1997.
- [44] A. L. Zisman, A. Nickolov, R. E. Brand, A. Gorchow, and H. K. Roy, "Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening.," *Arch. Intern. Med.*, vol. 166, no. 6, pp. 629–634, Mar. 2006.
- [45] E. Giovannucci, "An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer.," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 10, no. 7, pp. 725–731, Jul. 2001.
- [46] F. A. Hagggar and R. P. Boushey, "Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors.," *Clin. Colon Rectal Surg.*, vol. 22, no. 4, pp. 191–197, Nov. 2009.
- [47] M. Kemppainen, I. Raiha, T. Rajala, and L. Sourander, "Characteristics of colorectal cancer in elderly patients.," *Gerontology*, vol. 39, no. 4, pp. 222–227, 1993.
- [48] R. Siegel, D. Naishadham, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2012.," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 62, no. 1, pp. 10–29, 2012.
- [49] A. Ekblom, C. Helmick, M. Zack, and H. O. Adami, "Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 323, no. 18, pp. 1228–1233, Nov. 1990.
- [50] E. Short and J. Sampson, "The role of inherited genetic variants in colorectal polyposis syndromes.," *Adv. Genet.*, vol. 103, pp. 183–217, 2019.
- [51] F. Pouya *et al.*, "A novel large germ line deletion in adenomatous polyposis coli (APC) gene associated with familial adenomatous polyposis.," *Mol. Genet.*

genomic Med., Sep. 2018.

- [52] H. Ma, L. A. A. Brosens, G. J. A. Offerhaus, F. M. Giardiello, W. W. J. de Leng, and E. A. Montgomery, "Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer.," *Pathology*, vol. 50, no. 1, pp. 49–59, Jan. 2018.
- [53] H. T. Lynch and A. de la Chapelle, "Hereditary colorectal cancer.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 10, pp. 919–932, Mar. 2003.
- [54] D. C. Mauchley, D. C. Lynge, L. A. Langdale, M. G. Stelzner, C. N. Mock, and K. G. Billingsley, "Clinical utility and cost-effectiveness of routine preoperative computed tomography scanning in patients with colon cancer.," *Am. J. Surg.*, vol. 189, no. 5, p. 512–7; discussion 517, May 2005.
- [55] J. B. O'Connell, M. A. Maggard, and C. Y. Ko, "Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 96, no. 19, pp. 1420–1425, Oct. 2004.
- [56] D. Ty. T, "Molecular Biology of Human Cancers," *Dordr. Springer*, pp. 19–22, 2005.
- [57] B. Han, W. J. Poppinga, and M. Schmidt, "Scaffolding during the cell cycle by A-kinase anchoring proteins.," *Pflugers Arch.*, vol. 467, no. 12, pp. 2401–2411, Dec. 2015.
- [58] S. D. Markowitz and M. M. Bertagnolli, "Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, no. 25, pp. 2449–2460, Dec. 2009.
- [59] J. Perea, M. Lomas, and M. Hidalgo, "Molecular basis of colorrectal cancer: towards an individualized management?," *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, vol. 103, no. 1, pp. 29–35, Jan. 2011.
- [60] S. Haraldsdottir, H. M. Einarsdottir, A. Smaradottir, A. Gunnlaugsson, and T. R. Halfdanarson, "[Colorectal cancer - review].," *Laeknabladid*, vol. 100, no. 2, pp. 75–82, Feb. 2014.
- [61] L. G. T. Morris and T. A. Chan, "Therapeutic targeting of tumor suppressor genes.," *Cancer*, vol. 121, no. 9, pp. 1357–1368, May 2015.
- [62] B. Zhang, X. Pan, G. P. Cobb, and T. A. Anderson, "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors.," *Dev. Biol.*, vol. 302, no. 1, pp. 1–12, Feb. 2007.
- [63] L. R. Ferguson *et al.*, "Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition.," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 35 Suppl, pp. S5–S24, Dec. 2015.

- [64] K. S. Chen and H. F. DeLuca, "Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1219, no. 1, pp. 26–32, Sep. 1994.
- [65] J. S. Ungerstedt *et al.*, "Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 3, pp. 673–678, Jan. 2005.
- [66] A. M. Kaimul, H. Nakamura, H. Masutani, and J. Yodoi, "Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 6, pp. 861–868, Sep. 2007.
- [67] P. Patwari, L. J. Higgins, W. A. Chutkow, J. Yoshioka, and R. T. Lee, "The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 31, pp. 21884–21891, Aug. 2006.
- [68] E. Junn *et al.*, "Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function.," *J. Immunol.*, vol. 164, no. 12, pp. 6287–6295, Jun. 2000.
- [69] P. G. Corn and W. S. El-Deiry, "Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis.," *Bioessays*, vol. 24, no. 1, pp. 83–90, Jan. 2002.
- [70] J.-H. Jeon, K.-N. Lee, C. Y. Hwang, K.-S. Kwon, K.-H. You, and I. Choi, "Tumor suppressor VDUP1 increases p27(kip1) stability by inhibiting JAB1.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 11, pp. 4485–4489, Jun. 2005.
- [71] M. K. Ahsan *et al.*, "Loss of interleukin-2-dependency in HTLV-I-infected T cells on gene silencing of thioredoxin-binding protein-2.," *Oncogene*, vol. 25, no. 15, pp. 2181–2191, Apr. 2006.
- [72] K. K. Dutta *et al.*, "Two distinct mechanisms for loss of thioredoxin-binding protein-2 in oxidative stress-induced renal carcinogenesis.," *Lab. Invest.*, vol. 85, no. 6, pp. 798–807, Jun. 2005.
- [73] J.-C. Chambard, R. Lefloch, J. Pouyssegur, and P. Lenormand, "ERK implication in cell cycle regulation.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1773, no. 8, pp. 1299–1310, Aug. 2007.
- [74] V. A. Deak and E. Klussmann, "Pharmacological Interference With Protein-protein Interactions of Akinase Anchoring Proteins as a Strategy for the Treatment of Disease.," *Curr. Drug Targets*, vol. 17, no. 10, pp. 1147–1171, 2016.

- [75] I. H. Gelman, "Emerging Roles for SSeCKS/Gravin/AKAP12 in the Control of Cell Proliferation, Cancer Malignancy, and Barrierogenesis.," *Genes Cancer*, vol. 1, no. 11, pp. 1147–1156, Nov. 2010.
- [76] T. Gordon *et al.*, "Molecular cloning and preliminary characterization of a novel cytoplasmic antigen recognized by myasthenia gravis sera.," *J. Clin. Invest.*, vol. 90, no. 3, pp. 992–999, Sep. 1992.
- [77] J. W. Streb, C. M. Kitchen, I. H. Gelman, and J. M. Miano, "Multiple promoters direct expression of three AKAP12 isoforms with distinct subcellular and tissue distribution profiles.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 53, pp. 56014–56023, Dec. 2004.
- [78] S. Akakura, C. Huang, P. J. Nelson, B. Foster, and I. H. Gelman, "Loss of the SSeCKS/Gravin/AKAP12 gene results in prostatic hyperplasia.," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 13, pp. 5096–5103, Jul. 2008.
- [79] X. Yan, M. Walkiewicz, J. Carlson, L. Leiphon, and B. Grove, "Gravin dynamics regulates the subcellular distribution of PKA.," *Exp. Cell Res.*, vol. 315, no. 7, pp. 1247–1259, Apr. 2009.
- [80] D. C. Weiser, U. J. Pyati, and D. Kimelman, "Gravin regulates mesodermal cell behavior changes required for axis elongation during zebrafish gastrulation.," *Genes Dev.*, vol. 21, no. 12, pp. 1559–1571, Jun. 2007.
- [81] S. Akakura and I. H. Gelman, "Pivotal Role of AKAP12 in the Regulation of Cellular Adhesion Dynamics: Control of Cytoskeletal Architecture, Cell Migration, and Mitogenic Signaling.," *J. Signal Transduct.*, vol. 2012, p. 529179, 2012.
- [82] C. C. Malbon, J. Tao, and H. Wang, "AKAPs (A-kinase anchoring proteins) and molecules that compose their G-protein-coupled receptor signalling complexes.," *Biochem. J.*, vol. 379, no. Pt 1, pp. 1–9, Apr. 2004.
- [83] P. Aghagolzadeh and R. Radpour, "New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer.," *World J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 25, pp. 5678–5693, Jul. 2016.
- [84] J. Xie and S. H. Itzkowitz, "Cancer in inflammatory bowel disease.," *World J. Gastroenterol.*, vol. 14, no. 3, pp. 378–389, Jan. 2008.
- [85] G. S. Charames and B. Bapat, "Genomic instability and cancer.," *Curr. Mol. Med.*, vol. 3, no. 7, pp. 589–596, Nov. 2003.
- [86] T. Tanaka *et al.*, "Redox regulation by thioredoxin superfamily; protection

- against oxidative stress and aging.,” *Free Radic. Res.*, vol. 33, no. 6, pp. 851–855, Dec. 2000.
- [87] Y. Matsuo and J. Yodoi, “Extracellular thioredoxin: a therapeutic tool to combat inflammation.,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 24, no. 4, pp. 345–353, Aug. 2013.
- [88] H. Okuyama, A. Son, M. K. Ahsan, H. Masutani, H. Nakamura, and J. Yodoi, “Thioredoxin and thioredoxin binding protein 2 in the liver.,” *IUBMB Life*, vol. 60, no. 10, pp. 656–660, Oct. 2008.
- [89] A. Nishiyama *et al.*, “Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 31, pp. 21645–21650, Jul. 1999.
- [90] J. Zhou, Q. Yu, and W.-J. Chng, “TXNIP (VDUP-1, TBP-2): a major redox regulator commonly suppressed in cancer by epigenetic mechanisms.,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 43, no. 12, pp. 1668–1673, Dec. 2011.
- [91] Z. Chen *et al.*, “Thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2/VDUP1/TXNIP) regulates T-cell sensitivity to glucocorticoid during HTLV-I-induced transformation.,” *Leukemia*, vol. 25, no. 3, pp. 440–448, Mar. 2011.
- [92] H. Masutani, E. Yoshihara, S. Masaki, Z. Chen, and J. Yodoi, “Thioredoxin binding protein (TBP)-2/Txnip and alpha-arrestin proteins in cancer and diabetes mellitus.,” *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 50, no. 1, pp. 23–34, Jan. 2012.
- [93] Y. Takahashi, H. Masuda, Y. Ishii, Y. Nishida, M. Kobayashi, and S. Asai, “Decreased expression of thioredoxin interacting protein mRNA in inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis.,” *Oncol. Rep.*, vol. 18, no. 3, pp. 531–535, Sep. 2007.
- [94] K. Nishizawa *et al.*, “Thioredoxin-interacting protein suppresses bladder carcinogenesis.,” *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 10, pp. 1459–1466, Oct. 2011.
- [95] M. Ikarashi, Y. Takahashi, Y. Ishii, T. Nagata, S. Asai, and K. Ishikawa, “Vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1) expression in gastrointestinal cancer and its relation to stage of disease.,” *Anticancer Res.*, vol. 22, no. 6C, pp. 4045–4048, 2002.
- [96] E. Frullanti *et al.*, “Association of lung adenocarcinoma clinical stage with gene expression pattern in noninvolved lung tissue.,” *Int. J. cancer*, vol. 131, no. 5, pp. E643-8, Sep. 2012.
- [97] X. Yang, L. H. Young, and J. M. Voigt, “Expression of a vitamin D-regulated

- gene (VDUP-1) in untreated- and MNU-treated rat mammary tissue.,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 48, no. 1, pp. 33–44, Mar. 1998.
- [98] H.-J. Kwon *et al.*, “Vitamin D3 upregulated protein 1 suppresses TNF-alpha-induced NF-kappaB activation in hepatocarcinogenesis.,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 7, pp. 3980–3989, Oct. 2010.
- [99] R. Y. Z. Soh, J. P. Lim, R. P. Samy, P. J. Chua, and B. H. Bay, “A-kinase anchor protein 12 (AKAP12) inhibits cell migration in breast cancer.,” *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 105, no. 3, pp. 364–370, Dec. 2018.
- [100] B. Goeppert *et al.*, “Down-regulation of tumor suppressor A kinase anchor protein 12 in human hepatocarcinogenesis by epigenetic mechanisms.,” *Hepatology*, vol. 52, no. 6, pp. 2023–2033, Dec. 2010.
- [101] H. S. Lee *et al.*, “A-kinase anchoring protein 12 is downregulated in human hepatocellular carcinoma and its deficiency in mice aggravates thioacetamide-induced liver injury.,” *Oncol. Lett.*, vol. 16, no. 5, pp. 5907–5915, Nov. 2018.
- [102] O. Bozdogan *et al.*, “Differential expression patterns of metastasis suppressor proteins in basal cell carcinoma.,” *Int. J. Dermatol.*, vol. 54, no. 8, pp. 905–915, Aug. 2015.
- [103] M.-C. Choi *et al.*, “AKAP12/Gravin is inactivated by epigenetic mechanism in human gastric carcinoma and shows growth suppressor activity.,” *Oncogene*, vol. 23, no. 42, pp. 7095–7103, Sep. 2004.

ETİK KURUL KARARI

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

**Sayı : 1139****Tarih : 17.10.2017****Konu: Prof. Dr. Ümit ZEYBEK hk.**

**Sayın Prof. Dr. Ümit ZEYBEK
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü**

İlgili : Moleküler Tıp Anabilim Dalının 03/10/2017 gün ve 366284 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Msc. Arezoo GHEYBI' nin yürüteceği 2017/1112 dosya numaralı "Kolorektal Kanseri Hastalarda Tümör Süpresor Genlerinin, Genetik Varyasyonlarının İncelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 13/10/2017 tarih ve 16 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

**İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı**

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Kolorektal Kanserli Hastalarda Tümör Süpresor Genlerinin, Genetik Varyasyonlarının İncelenmesi"
-----------------------	--

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama			
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐			
	SİGORTA	☐			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒			
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐			
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐			
	İLAN	☐			
	YILLIK BİLDİRİM	☐			
	SONUÇ RAPORU	☐			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐			
KARAR BİLGİLERİ	DİĞER:	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD		
	Karar No:16	Tarih: 13/10/2017			
İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Ümit ZEYBEK'in sorumluluğunda ve Msc. Arezo GHEYBI'nin yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLI
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	İZİNLI
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLI
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	İZİNLI
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	İZİNLI

* :Araştırma ile ilişkisi
 ** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA TÜMÖR SÜPRESOR GENLERİNİN, GENETİK VARYASYONLARININ İNCELENMESİ

Yazar Arezoo Gheybi

Gönderim Tarihi: 10-Nis-2019 09:28AM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 1113452148

Dosya adı: t_mor_s_presor_genlerin_genetik_varyasyonlar_n_incelenmesi.docx (183.65K)

Kelime sayısı: 10448

Karakter sayısı: 70900

KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA TÜMÖR SÜPRESOR GENLERİNİN, GENETİK VARYASYONLARININ İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

% **10**

BENZERLİK İNDEKSİ

% **6**

İNTERNET
KAYNAKLARI

% **2**

YAYINLAR

% **6**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

ORJİNCİL KAYNAKLAR

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	AREZOO	Soyadı	GHEYBI
Doğ.Yeri	İRAN	Doğ.Tar.	23.03.1983
Email	arezoo.gh_62@yahoo.com	Uyruğu	İRAN

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	Zancan üniversitesi Mikrobiyoloji(yüksek lisans)	13.08.2011
Lisans	Urumiye üniversitesi Biyoloji bölümü(lisans)	04.02.2007
Lise	Niyayeş	

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	iyi	iyi		72,5
Azeri	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
spss	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):