



T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ORTAK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

KOLOREKTAL KANSERDE EPIGENETİK BİR ÇALIŞMA: LINE-1 RETROTRANSPOZONUNDA 5' UTR METİLASYON DEĞİŞİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

FATİMATÜZZEHRA ŞİPŞAK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ALİ İRFAN GÜZEL
DR. ÖĞR. ÜYESİ TUBA DİNÇER (İKİNCİ DANIŞMAN)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



14/04/2020

Fatimatüzzehra ŞİPŞAK

***Uyarı:** Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.*

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenerek araştırma konusunun seçimi ve yürütülmesi sırasında değerli bilimsel uyarı ve önerilerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL'e;

Bilgilerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen çok değerli hocalarım, Dr. Öğr. Üyesi Hatice SEVİM NALKIRAN ve Dr. Öğr. Üyesi Faruk SAYDAM'a, kayıtlı olduğum Ortak Yüksek Lisans Programında ikinci danışmanım olan Dr. Öğr. Üyesi Tuba DİNÇER'e ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma;

Patolojik örneklerin temininde yardımcı olan Doç. Dr. Recep BEDİR'e, istatistik çalışmalarında yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Tahsin Gökhan TELATAR'a ve HRM analizi sonuçlarının yorumlanmasında desteği olan Dr. Öğr. Üyesi Ebubekir DİRİCAN'a;

Yüksek lisans dönemim boyunca yanımda olan arkadaşlarım Ayşe Nur AKMEHMET ve Sümeyye DURUR'a;

Her zaman tavsiyeleri, bilgisi ve sevgisiyle yanımda olan, birlikte ağlayıp birlikte güldüğümüz, "en"lerimi paylaştığım dostum Aycan ÇELİK'e;

Yüksek Lisans Tezimi TYL-2018-961 nolu proje ile destekleyen BAP Koordinatörlüğüne;

Hayatım boyunca aldığım her kararda desteklerini hissettiren, her sıkıntıma yardımlarıyla göğüs gerdiğim, üzerimde en büyük emeğe sahip olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fatimatüzzehra ŞİPŞAK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY SAYFASI	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kolorektal Kanser	2
2.1.1. Epidemiyoloji	2
2.1.2. Etiyoloji	2
2.1.3. Histopatolojik Sınıflandırma	4
2.1.4. Evreleme	5
2.1.5. Moleküler Patoloji	7
2.1.5.1. Kromozomal Kararsızlık	7
2.1.5.2. Mikrosatellit Kararsızlık	8
2.1.5.3. CpG Adası Metilatör Fenotipi	9
2.2. Serpiştirilmiş Uzun Nükleer Element-1 (LINE-1)	10
2.2.1. LINE-1'in Yapısı	11
2.2.2. LINE-1'in Hareketliliği	12
2.2.3. Kolorektal Kanserde LINE-1	13
2.3. Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi	14
2.3.1. Veri Analizi	17
2.3.2. HRM Analizinin Klinik Araştırma ve Tanıdaki Rolü	17
2.3.3. HRM Analizi ile Metilasyon Tayini	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Materyal	19

3.1.1. Alet ve Cihazlar	19
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	20
3.1.3. Çözeltiler	21
3.1.4. Primerler	22
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Primer Tasarımı	22
3.2.2. DNA İzolasyonu	24
3.2.3. Bisülfid Dönüşümü	26
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	27
3.2.5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	28
3.2.6. Real Time PCR ve HRM Analizi	30
3.2.7. İstatiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
4.1. PCR Optimizasyon Çalışmaları	34
4.2. Hastalara Ait Klinikopatolojik Özellikler	34
4.3. LINE-1 5' UTR 1. Bölgede Saptanan Bulgular	35
4.4. LINE-1 5' UTR 1. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri	37
4.5. LINE-1 5' UTR 2. Bölgede Saptanan Bulgular	38
4.6. LINE-1 5' UTR 2. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri	40
4.7. LINE-1 5' UTR 3. Bölgede Saptanan Bulgular	41
4.8. LINE-1 5' UTR 3. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri	43
4.9. LINE-1 5' UTR 4. Bölgede Saptanan Bulgular	44
4.10. LINE-1 5' UTR 4. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri	46
4.11. LINE-1 5' UTR 5. Bölgede Saptanan Bulgular	47
4.12. LINE-1 5' UTR 5. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri	49
4.13. LINE-1 5' UTR 6. Bölgede Saptanan Bulgular	50

4.14. LINE-1 5' UTR 6. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri	52
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	58
7. KAYNAKLAR	59
EKLER	68
Ek 1. Hastalara Ait Tüm Bölgelerdeki Metilasyon Seviyeleri	69
Ek 2. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı	70
ÖZGEÇMİŞ	72



TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Kolorektal kanserin histopatolojik sınıflandırılması	4
Tablo 2. Kolorektal kanserin evreleri	6
Tablo 3. TNM sınıflandırılmasına ait ek kategoriler	7
Tablo 4. LINE-1 5' UTR'de belirlenen 6 bölge için tasarlanan primer çiftleri ve CG sayıları	24
Tablo 5. PCR programı	27
Tablo 6. PCR karışımı	28
Tablo 7. Bütün bölgeler için primer koşulları	29
Tablo 8. Real time PCR karışımı	31
Tablo 9. Real time PCR programı	31
Tablo 10. Hastalara ait klinikopatolojik özellikler	34
Tablo 11. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 1. bölgeye ait metilasyon değerleri	37
Tablo 12. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 1. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki	37
Tablo 13. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 2. bölgeye ait metilasyon değerleri	40
Tablo 14. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 2. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki	40
Tablo 15. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 3. bölgeye ait metilasyon değerleri	43
Tablo 16. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 3. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki	43
Tablo 17. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 4. bölgeye ait metilasyon değerleri	46
Tablo 18. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 4. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki	46
Tablo 19. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 5. bölgeye ait metilasyon değerleri	49
Tablo 20. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 5. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki	49

Tablo 21. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 6. bölgeye ait metilasyon değerleri	52
Tablo 22. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 6. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki	52



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. IARC tarafından 185 ülkede 36 kanser türünde gerçekleştirilen kanser görülme sıklığı ve mortalitesi üzerine GLOBOCAN 2018 araştırma verileri	2
Şekil 2. Kolorektal kanserin yaşa özel hızları	3
Şekil 3. LINE-1 hareketliliği	12
Şekil 4. Erime eğrisi analizi	15
Şekil 5. Yüksek çözünürlüklü erime analizi	16
Şekil 6. LINE-1 retrotranspozonuna ait DNA dizisi	22
Şekil 7. LINE-1 retrotranspozonuna ait bisülfid dönüşümü sonrası normal bireylerden beklenen DNA dizisi	23
Şekil 8. LINE-1 5'UTR 1. bölgeye ait standart eğri	36
Şekil 9. LINE-1 5'UTR 2. bölgeye ait standart eğri	39
Şekil 10. LINE-1 5'UTR 3. bölgeye ait standart eğri	42
Şekil 11. LINE-1 5'UTR 4. bölgeye ait standart eğri	45
Şekil 12. LINE-1 5'UTR 5. bölgeye ait standart eğri	48
Şekil 13. LINE-1 5'UTR 6. bölgeye ait standart eğri	51

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. LINE-1 5' UTR'ye ait bölgelerin PCR amplifikasyonlarına ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	34
Resim 2. LINE-1 5' UTR 1. bölgeye ait normalize erime eğrileri	35
Resim 3. LINE-1 5' UTR 1. bölgeye ait fark grafikleri	35
Resim 4. LINE-1 5' UTR 1. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri	36
Resim 5. LINE-1 5' UTR 2. bölgeye ait normalize erime eğrileri	38
Resim 6. LINE-1 5' UTR 2. bölgeye ait fark grafikleri	38
Resim 7. LINE-1 5' UTR 2. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri	39
Resim 8. LINE-1 5' UTR 3. bölgeye ait normalize erime eğrileri	41
Resim 9. LINE-1 5' UTR 3. bölgeye ait fark grafikleri	41
Resim 10. LINE-1 5' UTR 3. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri	42
Resim 11. LINE-1 5' UTR 4. bölgeye ait normalize erime eğrileri	44
Resim 12. LINE-1 5' UTR 4. bölgeye ait fark grafikleri	44
Resim 13. LINE-1 5' UTR 4. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri	45
Resim 14. LINE-1 5' UTR 5. bölgeye ait normalize erime eğrileri	47
Resim 15. LINE-1 5' UTR 5. bölgeye ait fark grafikleri	47
Resim 16. LINE-1 5' UTR 5. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri	48
Resim 17. LINE-1 5' UTR 6. bölgeye ait normalize erime eğrileri	50
Resim 18. LINE-1 5' UTR 6. bölgeye ait fark grafikleri	50
Resim 19. LINE-1 5' UTR 6. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri	51

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APS	Amonyum Persülfat
AQAMA	Absolute Quantitative Analysis Of Methylated Alleles
BAX	Bcl2 Associated X
bç	baz çifti
BRAF	v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B
cDNA	complementary DNA
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CIN	Chromosomal Instability
COBRA	Combined Bisulfite Restriction Analyse
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
dNTP	deoxyribo-Nucleotide Tri-Phosphate
dsDNA	double strand DNA
dsRNA	double Strand RNA
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
FFPE	Formaline Fixed Paraffin Embedded
GLOBOCAN	Global Cancer
HCl	Hydrochloric acid
HNPCC	Hereditary Non Polyposis Colon Cancer
HRM	High Resolution Melting
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBD	Inflammatory Bowel Disease
KRAS	Kristen Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LINE	Long Interspersed Nuclear Element
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MMR	Mismatch Repair
MSI	Microsatellite Instability
MSP	Methylation Spesific PCR
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NOS	Not Otherwise Specified
nt	nükleotit
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
piRNA	piwi interacting RNA
RFU	Relative Fluorescence Units
RNA	Ribonucleic Acid
SINE	Short Interspersed Nuclear Element
siRNA	small interfering RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine
TGFBR2	Transforming Growth Factor β Receptor Type 2
TNM	Tumor/Node/Metastasis
TP53	Tumor Protein 53
UICC	The Union for International Cancer Control
UTR	Untranslated Region
WHO	World Health Organization

Simgeler

°C	Centigrade Degree
Abs	Absorbans
dk	dakika
g	gram
g	gravity
L	litre
mA	miliamper
ml	mililitre
mM	milimolar
mg	miligram

μg	mikrogram
μl	mikrolitre
μM	mikromolar
ng	nanogram
nm	nanometre
pH	power of hydrogen
rpm	revolutions per minute
sn	saniye
Tm	Melting Temperature
U	Unit
UV	Ultraviyole
V	Volt

ÖZET

Kolorektal Kanserde Epigenetik Bir Çalışma: LINE-1 Retrotranspozonunda 5' UTR Metilasyon Değişimlerinin Araştırılması

Dünyada kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biri de kolorektal kanser olup genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu meydana gelmektedir. Epigenetik değişikliklerden biri olan DNA metilasyonu, genomik kararlılık ve gen ifadesinin düzenlenmesinde anahtar bir mekanizma olarak tanımlanmıştır. Genomun çoğunluğunu oluşturan tekrar dizilerinde meydana gelen DNA metilasyon içeriğindeki bir azalma, çeşitli malignansilerin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. İnsan genomunun yaklaşık %17'sini oluşturan LINE-1 tekrar dizileri, DNA metilasyon ölçümü bağlamında en çok ilgililenilen dizidir. Bu çalışmada kolorektal kanserde, LINE-1 5' UTR'sinin metilasyon durumunun incelenmesi amaçlandı. Kolorektal kanser teşhisi konmuş hastalara ait normal ve tümör arşiv dokusundan DNA izolasyonu yapıldı. LINE-1 5' UTR'sinin belirlenen altı farklı bölgesi özel olarak tasarlanmış primer setleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Sonrasında CG dinükleotitlerindeki metilasyon değişimini değerlendirmek amacıyla HRM analizi yapıldı. 1. bölgenin analizinde normal ve tümörlü dokular arasında anlamlı bir fark bulundu ($p<0.001$). Sonuç olarak, bu bölgenin kolorektal kanser olgularında ve kanserleşme sürecinde metilasyon seviyesindeki azalmanın belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: LINE-1, DNA Metilasyonu, Kolorektal Kanser, HRM

ABSTRACT

An Epigenetic Research in Colorectal Cancer: Investigation of 5' UTR Methylation Changes at LINE-1 Retrotransposon

One of the leading causes of cancer deaths in the world is colorectal cancer and occurs as a result of the accumulation of genetic and epigenetic changes. DNA methylation, one of the epigenetic changes, has been described as a key mechanism in regulating genomic stability and gene expression. A decrease in DNA methylation content in the repeated sequences, which constitutes the majority of the genome, has been associated with the formation of various malignancies. The LINE-1 repeated sequences, which account for about 17% of the human genome, are the most interesting sequence in the context of DNA methylation measurement. In this study, it was aimed to investigate the methylation status of LINE-1 5' UTR in colorectal cancer. DNA isolation was performed from normal and tumor archive tissue of patients diagnosed with colorectal cancer. Six different regions of LINE-1 5' UTR were amplified by PCR using specially designed primer sets. HRM analysis was then performed to evaluate the methylation changes in CG dinucleotides. A significant difference was found between normal and tumor tissues in the analysis of the 1st region ($p < 0.001$). As a result, it is thought that this region can be used as a biomarker in determining the decrease of methylation level in colorectal cancer cases and in the cancer process.

Keywords: LINE-1, DNA Methylation, Colorectal Cancer, HRM

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kolorektal kanser histopatolojik olarak heterojenite gösterebildiği gibi moleküler ve genetik seviyede de heterojen bir hastalıktır. Kolorektal karsinogenezin moleküler mekanizmalarını anlamak, kanserin önlenmesi, tanısı, tedavisi ve prognozunun iyileştirilmesi için yeni stratejilerin geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu mekanizmalardan biri de kolorektal kanserde erken dönemde ortaya çıkan epigenetik değişimlerden biri olan DNA hipometilasyonudur. Genom boyunca CG dinükleotitlerindeki (CpG) sitozinler üzerine eklenmiş olan metil gruplarının kaybıyla meydana gelen DNA hipometilasyonu kanserlerde sıklıkla tekrar dizilerinde meydana gelip, kolorektal kanserde kromozomal kararsızlığa ve belirli onkogenlerde aşırı aktivasyona neden olmaktadır (Wolf vd., 2010).

İnsan genomunun %45'i normalde yüksek oranda metillenmiş olan hareketli tekrar dizilerinden oluşmaktadır. Bunlardan biri olan Serpiştirilmiş Uzun Nüklear Element-1 [LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Element-1)] dizisi bir retrotranspozondur ve kolorektal kanserde erken dönemde ortaya çıkan hipometilasyonla karakterizedir. Bu dizilerin promotor bölgesinin hipometilasyonu, genin anormal ekspresyonuna ve genom içi hareketlilik ile de genomik kararsızlığa neden olur. Ayrıca yapılan birçok çalışmada LINE-1 hipometilasyon seviyelerinin kötü hastalık seyri, invazyon ve metastaz ile ilişkili olduğu da belirtilmiştir (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

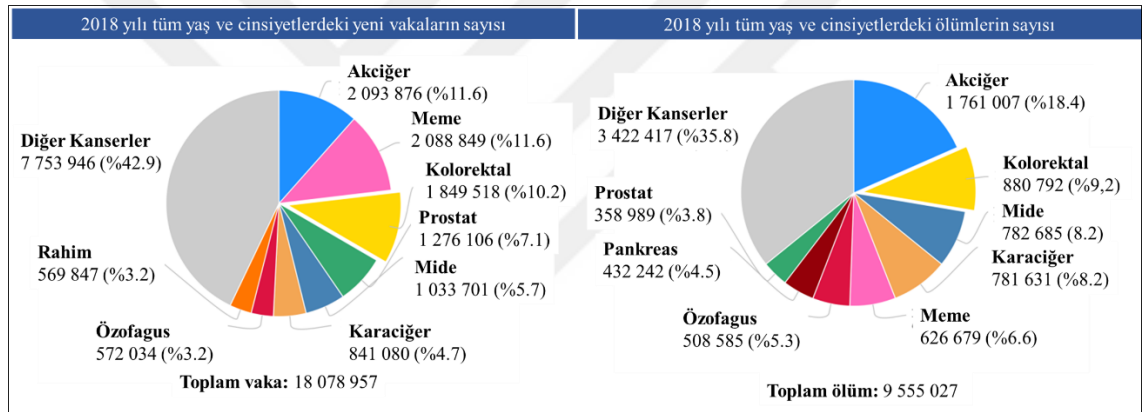
Yapılan bu tez çalışmasında LINE-1 retrotranspozonunun 900 baz çifti (bç) uzunluğundaki promotor bölgesindeki hipometilasyon durumu normal ve tümörlü doku örneklerinde taranarak; hipometilasyonun pratik olarak belirlenebileceği bir yerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu sayede, epigenetik değişikliklerden faydalanarak kolorektal kanserin erken teşhisinin yapılması konusunda literatüre katkı sağlanacağı ve erken tedavi girişimlerine imkan tanınmış olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

2.1.1. Epidemiyoloji

IARC [International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı)] tarafından derlenen ve yayımlanan GLOBOCAN 2018 verilerine göre küresel kanser yükünün, 18.1 milyon yeni vakaya ve 9.6 milyon ölüme ulaştığı tahmin edilmektedir (Şekil 1). Dünya çapında en sık teşhis edilen ilk 3 kanserin sırasıyla akciğer kanseri (%11.6), meme kanseri (%11.6) ve kolorektal kanser (%10.2) olduğu ve kanser kaynaklı ölümlerin başında ilk olarak akciğer kanseri (%18.4) ve sonrasında kolorektal kanser (%9.2) geldiği bildirilmiştir (Bray vd., 2018).



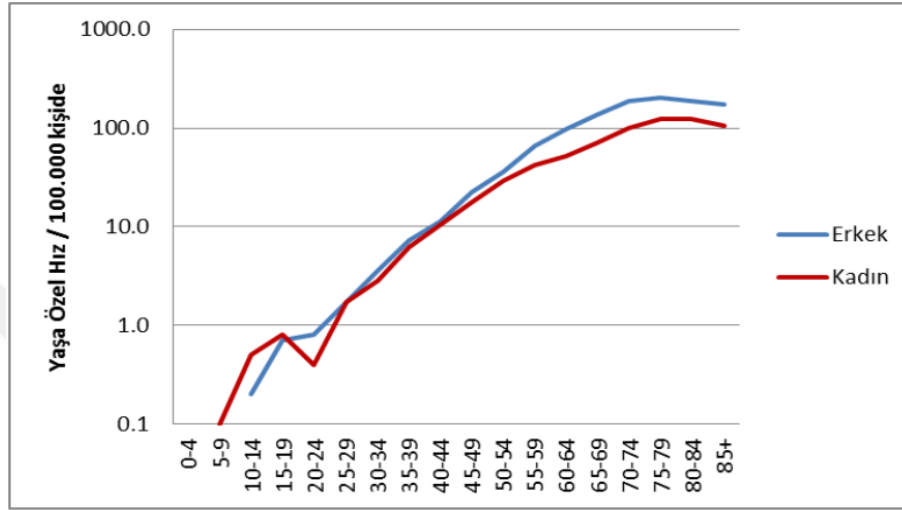
Şekil 1. IARC tarafından 185 ülkede 36 kanser türünde gerçekleştirilen kanser görülme sıklığı ve mortalitesi üzerine GLOBOCAN 2018 araştırma verileri (Bray vd., 2018).

Bu verilere dayanarak dünya genelinde yaşamları boyunca her 5 erkekten 1'inde ve her 6 kadından 1'inde kanser geliştiği ve her 8 erkekten 1'inin ve her 11 kadından 1'inin hastalıktan öldüğü bildirilmiştir. Kolorektal kanser dünya genelinde görülme sıklığı açısından üçüncü sırada ve ölüm oranı açısından ikinci sırada yer alırken, Türkiye genelinde ise yeni vakaların görülmesi açısından üçüncü sırada yer almaktadır (Bray vd., 2018).

2.1.2. Etiyoloji

Çoğu kolorektal kanser vakasında tek bir risk faktörü bulunmaz. Artan yaş, erkek cinsiyeti, aile öyküsü, iltihabi bağırsak hastalığı [IBD (Inflammatory Bowel Disease)],

sigara kullanımı, aşırı alkol tüketimi, kırmızı ve işlenmiş et tüketiminin fazla olması, obezite ve diyabet gibi çeşitli risk faktörleri kolorektal kanserde sıklıkla gözlenmektedir. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2015 yılı kanser istatistikleri raporunda kolorektal kanserin kadınlara oranla erkeklerde daha sık gözleendiği ve artan yaşla birlikte görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir (Şekil 2) (Türkyılmaz vd., 2018).



Şekil 2. Kolorektal kanserin yaşa özel hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015).

60 yaşından küçük birinci dereceden akrabasında ya da herhangi bir yaşta birden fazla birinci dereceden akrabasında kolorektal kanser öyküsü bulunan bireylerin kolorektal kansere yakalanma riski fazladır (Taylor vd., 2010). İltihabi bağırsak hastalığı olan bireylerde kronik iltihap geliştiği için kolorektal kanser riski artmış olur. Dolayısıyla bu kronik iltihabın kolonoskopi ile takibinin yapılması ve iltihap giderici ilaçların kullanılması kolorektal kanser riskinin azaltılabileceğini göstermiştir (Velayos vd., 2006). Aşırı sigara tüketimi artmış kolorektal kanser riski ile ilişkili olup, yaşamının yalnızca belli bir döneminde uzun yıllar boyunca sigara kullanmış olan bireylerde bile sonrasında büyük risk teşkil ettiği bilinmektedir. Bu durum sigaranın etkisinin uzun yıllar sonra bile devam ettiğini göstermektedir (Liang vd., 2006). Aşırı sigara tüketimi erken başlangıçlı kolorektal kanser ile ilişkilendirildiğinde, yoğun tütün tüketimine sahip olan bireylerde daha erken yaşlarda meydana gelmektedir (Buc vd., 2006; Peppone vd., 2008). Aşırı sigara tüketiminin yanı sıra aşırı alkol tüketimi de adenomlara ve ilerleyen dönemlerde kolorektal kansere neden olmaktadır (Botteri vd., 2008a-b; Zisman vd., 2006). Kırmızı ve işlenmiş et tüketim alışkanlığı fazla olan bireylerde kolorektal kanser

riski önemli ölçüde fazladır. Yapılan prospektif çalışmaların sonucu olarak kolorektal kanserin önlenmesinde, kırmızı ve işlenmiş et tüketiminin sınırlandırılması önerilen beslenme tavsiyelerinden biridir (Chan vd., 2011). Belirtilen bu risk faktörlerine ek olarak obezitenin kolorektal kanser ile ilişkilendirildiği ve diyabetik bireylerin, diyabetik olmayan bireylere oranla artmış bir kolorektal kanser riskine sahip olduğu bilinmektedir (Ma vd., 2013; Jiang vd., 2011).

2.1.3. Histopatolojik Sınıflandırma

Kolorektal adenokarsinom çoklu tümörogenik yolları içeren bir hastalıktır. Patolojik analiz ile hasta için uygun tedavi, prognoz değerlendirmesi ve aile danışmanlığı için kritik bir öneme sahip olan histolojik ve moleküler bilgiler elde edilmiş olur. Tümörögenizdeki moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, hastalara ve ailelerine fayda sağlayacak yeni hedeflenmiş tedavilerin ve yeni moleküler testlerin gelişmesine katkı sağlayacaktır (Fleming vd., 2012).

2010 yılında WHO [World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)] tarafından yayımlanan “Sindirim Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırılması” adlı kitapta kolorektal kanser histopatolojik olarak 2 ana grup altında incelenmiştir. Kolorektal karsinomların %90’ından fazlası, kolorektal mukozanın epitel hücrelerinden köken alan adenokarsinomlardır (Tablo 1) (Bosman vd., 2010).

Tablo 1. Kolorektal kanserin histopatolojik sınıflandırılması (Bosman vd., 2010).

1. EPİTELYAL TÜMÖRLER
1.1. Premalignant Lezyonlar
1.2. Serrated Lezyonlar
1.3. Karsinomlar
1.3.1. Adenokarsinom, NOS (Not Otherwise Specified/Aksi Belirtilmedikçe)
1.3.1.1. Kribri Komedo-Tip Adenokarsinom
1.3.1.2. Medüller Karsinom, NOS
1.3.1.3. Mikropapiler Karsinom
1.3.1.4. Müsinöz (Kolloid) Karsinom
1.3.1.5. Serrated Adenokarsinom
1.3.1.6. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom
1.3.2. Adenoskuamöz Karsinom
1.3.3. İğsi Hücreli Karsinom, NOS
1.3.4. Skuamöz Hücreli Karsinom, NOS
1.3.5. Farklılaşmamış Karsinom
1.4. Nöroendokrin Neoplaziler

Tablo 1 (devam)

2. MEZENKİMAL TÜMÖRLER
2.1. Leiomyom, NOS
2.2. Lipoma, NOS
2.3. Anjiosarkom
2.4. Gastrointestinal Stromal Tümör, Kötü Huylu (Habis)
2.5. Kaposi Sarkomu
2.6. Leiomyosarkom, NOS
2.7. Schwannoma, NOS
2.8. Perinöroma, NOS
2.9. Ganglioroma
2.10. Granüler Hücreli Tümör, NOS
2.11. Kötü Huylu (Habis) Lenfomalar

2.1.4. Evreleme

Bir kişiye kanser teşhisi konulduktan sonra kanserin hangi aşamada olduğunu, yayılıp yayılmayacağını, eğer yayılacaksa ne kadar uzağa olacağını belirlediği süreç evreleme denir. Bir kanserin evresi, vücutta ne kadar kanser olduğunu tanımlar ve bu sayede kanserin ne kadar ciddi olduğunu ve nasıl en iyi şekilde tedavi edilebileceğini belirlemeye yardımcı olur. Kolorektal kanser için en çok kullanılan evreleme sistemi AJCC [American Joint Committee on Cancer (Amerikan Kanser Ortak Komitesi)] ve UICC [The Union for International Cancer Control (Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği)] tarafından önerilen tümör/nod/metastaz [TNM (tumor/node/metastasis)] sistemidir. TNM sistemi kanserleri; primer tümörün büyüklüğüne ve yayılmasına (T), bölgesel lenf nodu tutulumuna (N) ve uzak metastaz varlığına ya da yokluğuna (M) göre sınıflandırır. En erken aşama 0 olarak adlandırılır ve ardından 1 (I) ile 4 (IV) arasında değişir. Kural olarak, sayı ne kadar düşük olursa, kanser de o kadar az yayılmıştır (Tablo 2-3) (Amin vd., 2018; Brierley vd., 2016).

TNM evreleme sistemi başlangıçta kanserin prognozu için geliştirildiyse de günümüzde işlevi genişleyerek tedavi ve klinik denemelere girişin belirlenmesinde kullanılmaya başlandı. TNM sisteminin amaçları arasında, kanserin prognozu hakkında bilgi vermek ve sürekli araştırılmasına katkıda bulunmak, tedavi planlamasına yardımcı olmak, tedavinin etkilerini değerlendirmede ve tedavi merkezleri arasında bilgi alışverişinde yardımcı olmak yer alır (American Cancer Society, 2019).

Tablo 2. Kolorektal kanserin evreleri (Amin vd., 2018; Brierley vd., 2016).

AJCC Evresi	Gruplandırma	Açıklama
0	Tis N0 M0	İn situ karsinom/intramukozal karsinom olarak da bilinen bu evrede kanser kolon/rektumun iç tabakasında olup en erken aşamadır.
I	T1/T2 N0 M0	Kanser, muskularis mukozasından submukozaya doğru (T1) veya muskularis propriya içinde (T2) büyümüştür ve yakındaki lenf nodlarına veya uzak bölgelere yayılmamıştır.
IIA/IIB	T3/T4a N0 M0	Kanser, kolon veya rektumun en dış katmanlarına doğru (T3) veya duvarı boyunca büyümüştür (T4a) ve yakındaki lenf nodlarına veya uzak bölgelere yayılmamıştır.
IIC	T4b N0 M0	Kanser, kolon veya rektumun duvarı boyunca büyümüştür ve yakınındaki diğer doku/organlara bağlanmıştır/büyümüştür. Henüz yakındaki lenf nodlarına veya uzak bölgelere yayılmamıştır.
IIIA (Grup 1)	T1/T2 N1/N1c M0	Kanser, muskularis mukozasından submukozaya doğru (T1) veya muskularis propriya içinde (T2) büyümüştür ve yakındaki lenf nodlarına (≤ 3) (N1) veya lenf nodu yakınındaki yağ alanlarına yayılmıştır (N1c). Uzak bölgelere yayılmamıştır.
IIIA (Grup 2)	T1 N2a M0	Kanser, muskularis mukozasından submukozaya doğru büyümüştür ve yakındaki lenf nodlarına (4-6) yayılmıştır. Uzak bölgelere yayılmamıştır.
IIIB (Grup 1)	T3/T4a N1/N1c M0	Kanser, kolon veya rektumun en dış katmanlarına (T3) veya viseral peritona doğru büyümüştür (T4a) ve yakındaki lenf nodlarına (≤ 3) (N1) veya lenf nodu yakınındaki yağ alanlarına yayılmıştır (N1c). Uzak bölgelere yayılmamıştır.
IIIB (Grup 2)	T2/T3 N2a M0	Kanser, muskularis propria (T2) ya da kolon veya rektumun en dış katmanlarına doğru büyümüştür (T3) ve yakındaki lenf nodlarına (4-6) yayılmıştır (N2a). Uzak bölgelere yayılmamıştır.
IIIB (Grup 3)	T1/T2 N2b M0	Kanser, muskularis mukozasından submukozaya doğru (T1) veya muskularis propriya içinde (T2) büyümüştür ve yakındaki lenf nodlarına (≥ 7) yayılmıştır (N2b). Uzak bölgelere yayılmamıştır.
IIC (Grup 1)	T4a N2a M0	Kanser, viseral peritona doğru büyümüştür (T4a) ve yakındaki lenf nodlarına (4-6) yayılmıştır (N2a). Uzak bölgelere yayılmamıştır.
IIC (Grup 2)	T3/T4a N2b M0	Kanser, kolon veya rektumun en dış katmanlarına (T3) veya viseral peritona doğru büyümüştür (T4a) ve yakındaki lenf nodlarına (≥ 7) yayılmıştır (N2b). Uzak bölgelere yayılmamıştır.
IIC (Grup 3)	T4b N1/N2 M0	Kanser, kolon veya rektumun duvarı boyunca büyümüştür ve yakınındaki diğer doku/organlara bağlanmıştır/büyümüştür. Yakındaki lenf nodlarına (≤ 3) (N1) veya lenf nodu yakınındaki yağ alanlarına yayılmıştır (N2) ve uzak bölgelere yayılmamıştır (M0).

Tablo 2 (devam)

IVA/IVB	Herhangi T	Kanser, yukarıda bahsedilen herhangi bir T ve N koşulunu sağlayabilir. 1 (M1a)/1'den fazla (M2a) uzak organa (karaciğer veya akciğer gibi) veya uzak lenf nodları kümesine yayılmış, ancak peritonun uzak kısımlarına (M1a) yayılmamıştır.
	Herhangi N M1a/M1a	
IVC	Herhangi T	Kanser, yukarıda bahsedilen herhangi bir T ve N koşulunu sağlayabilir ve peritonun uzak bölgelerine yayılmıştır. Uzak organlara veya lenf düğümlerine yayılmış olabilir veya olmayabilir (M1c).
	Herhangi N M1c	

Tablo 3: TNM sınıflandırılmasına ait ek kategoriler (Amin vd., 2018; Brierley vd., 2016).

TX	Ana tümör bilgi eksikliği nedeniyle değerlendirilemiyor.
T0	Primer tümör kanıtı yok.
NX	Bölgesel lenf nodları bilgi eksikliği nedeniyle değerlendirilemiyor.

2.1.5. Moleküler Patoloji

Moleküler patoloji açısından heterojen bir yapıya sahip olan kolorektal kanserin gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmalar, kolorektal kanserin prognozu ve tedaviye verdiği yanıt ile ilişkili olduğu için klinik olarak oldukça önemlidir. Kolorektal kanser, normal kolon epitel hücrelerinin kolon adenokarsinom hücrelerine dönüşümüne neden olan genetik ve epigenetik değişikliklerin aşamalı birikmesinden kaynaklanır (Bufill vd., 1990; Ogino vd., 2008; Sadanandam vd., 2013; Felipe vd., 2013). Tümörögenез sürecinde erken ortaya çıkan genomik kararsızlık önemli bir moleküler ve patogenik aşama olarak görülmektedir. Ayrıca genomik kararsızlık tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin normal işleyişinde değişiklikler meydana getiren bir ortam oluşmasına neden olur. Bu karakteristik gen mutasyonlarına sıklıkla kromozomlarda meydana gelen sayısal ve yapısal düzensizlikler eşlik eder (Lenguaer vd., 1997). Kolorektal kanserde tümör ilerleyişi ile ilişkili olan moleküler değişikliklere ve somatik anomalilere neden olan genomik kararsızlık, temel olarak 3 farklı moleküler yolla meydana gelir (Rodriguez vd., 2017).

2.1.5.1. Kromozomal Kararsızlık

Kromozom ve genlerin kopya sayılarındaki anormal değişiklikler ile karakterize olan kromozomal kararsızlık [CIN (Chromosomal Instability)], kolorektal kanserin çoğunda sıklıkla gözlenir (TCGA Network, 2012). Kolorektal kanserin kalıtsal alt tiplerinden biri olan Ailesel Adenomatöz Polipozis [FAP (Familial Adenomatous

Polyposis]] oluşumundan sorumlu Adenomatöz Polipozis Koli [*APC* (Adenomatous Polyposis Coli)] geni kromozomal kararsızlıkla ilişkilendirilmiştir (Fodde vd., 2001; Jaspersen vd., 2010; Kinzler vd., 1996; Half vd., 2009). *APC* geni bir tümör baskılayıcı genidir. FAP sendromunda *APC* geninin iki allelinden biri ailevi olarak kalıtılmış bir mutasyona sahiptir. Sonrasında ise ikinci allelde meydana gelen mutasyon *APC* geninde fonksiyon kaybına ve Wnt sinyal yolağının kontrolsüz bir şekilde aktivasyonuna neden olur. *APC* geni düzgün çalışmadığında yolakta bulunan β -katenin fosforillenemez ve daha fazla ubikütinlenemeyen β -katenin proteazom tarafından parçalanamayıp hücre içerisinde birikmeye başlar. Hücre içerisinde biriken fazla β -katenin nükleusa taşıyıp transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek hücre büyümesini destekleyen birçok protoonkogenin ekspresyonunu artırır. Kolorektal kanserin prekürsör lezyonları olan adenomatöz poliplerde gözlenen *APC* geninin mutasyonu çok aşamalı kolorektal kanserin oluşum sürecinde erken dönemde meydana gelen bir olaydır ve kolorektal adenomların %70'inden fazlasında sıklıkla görülmektedir (Kinzler vd., 1996; Powell vd., 1992; Cottrell vd., 1992; Giles vd., 2003; Aoki vd., 2007).

Hücre çoğalmasında rol oynayan MAPK ve PI3K yolakları da kromozomal kararsızlıkla ilişkilendirilmiştir. Bu yolaklarda meydana gelen değişiklikler tümör hücrelerinin çoğalmasına katkıda bulunur. Kolorektal kanserle de ilişkilendirilen bu yolaklarda görevli *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* onkogenlerinde meydana gelen mutasyonlar tümöröenez sürecinde oldukça etkilidir (Fearon, 2011; Tian vd., 2013; Lee vd., 2017; Inamura vd., 2015; Jones vd., 2017). Hücre döngüsünde görevli olan *TP53* tümör baskılayıcı geni, kontrol noktası düzenleyicilerinden biridir (Fearon, 2011; Pino ve Chung, 2010). *TP53* geninin inaktivasyonu hücre döngüsünün kontrolünü baskılayarak aşırı hücre çoğalmasına ve adenomdan karsinomaya geçiş sürecini tetikleyerek tümörün ilerlemesine neden olur (Pino ve Chung, 2010; Vogelstein vd., 1988; Lengauer vd., 1988).

2.1.5.2. Mikrosatellit Kararsızlık

Mikrosatellit Kararsızlık [*MSI* (Microsatellite Instability)], normal DNA ile karşılaştırıldığında tümör DNA'sındaki kısa nükleotit tekrar dizilerinin (mikrosatellit) değişmiş uzunluklarını ifade eder (Thibodeu vd., 1993). *MSI* kromozomal kararsızlığa göre daha az anöploid gösteren yüksek mutasyona sahip karsinomların gelişiminden sorumludur. Lynch Sendromu olarak bilinen Kalıtsal Polipozis Olmayan Kolon Kanserinin [*HNPCC* (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer)] moleküler genetik

temelinin araştırılması mikrosatellit kararsızlığın ilk kez aydınlatılmasını sağlamıştır (Lynch vd., 1991; Roy ve Lynch, 2003). Lynch sendromu DNA Hatalı Eşleşme Tamir [MMR (Mismatch Repair)] proteinlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Nyström vd., 1994). DNA replikasyonu sırasında meydana gelen hatalı eşleşme, delesyon ya da insersiyonlar MMR sistemi tarafından düzeltilmektedir. MMR sistemi yanlış eşleşmeyi tanıyan ve sonrasında hatalı bölgeyi çıkarıp yerini komplementer diziyi kalıp olarak kullanıp dolduran bir protein kompleksinden oluşur. MMR sistemi çalışmadığında, hücreler mikrosatellit dizilerin de dahil olduğu birçok DNA bölgesinde hatalar biriktirir (Mead vd., 2007; Boland ve Goel, 2010; Hampel vd., 2005). MMR proteinleri doku kesitlerinde rutin olarak kolayca tespit edilebildiği için, ilgili proteinlerden birinin (MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2) ekspresyon kaybının immünohistokimyasal olarak belirlenmesi, mikrosatellit kararsızlık ve Lynch sendromunun tespiti için bir tarama aracı olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Shia vd., 2009). *TGFBR2* ve *BAX* gibi tümör baskılayıcı genlerin kodlayıcı bölgelerindeki mononükleotit tekrarlarında meydana gelen mutasyonlarının kolorektal karsinogenezde önemli olduğu gösterilmiştir (Markowitz vd., 1995; Rampino vd., 1997).

2.1.5.3. CpG Adası Metilatör Fenotipi

Hem MSI hem de CIN yolakları tümör baskılayıcı genlerdeki fonksiyon kaybını ve/veya onkogenlerdeki artmış kopya sayısını tanımlayan genetik değişikliklere dayanan kolorektal kanserin patogenezi tarif eder. Kolorektal kanser oluşumunda genetik değişikliklere ek olarak meydana gelen epigenetik değişiklikler son zamanlarda oldukça ilgi görmekte ve kolorektal kanserin neredeyse üçte birinin patogenezinde yer aldığı düşünülmektedir (Snover, 2011). Birçok hastalıkla ilişkilendirilmiş epigenetik değişiklikler DNA dizisine ve yapısına ek olarak, gen ekspresyonunun; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yeniden düzenlenmesi ile kontrol edilmesini kapsar (Portela ve Esteller, 2010). Transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan ve CpG adaları ile ilişkili gen promotorlarının hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin susturulmasından sorumlu olan sıkça karşılaşılan mekanizmadır. Bu olay genom çapında meydana gelirse CpG Adası Metilatör Fenotipi [CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) olarak adlandırılır (Teodoridis vd., 2008).

Kolorektal kanserin oluşumu ile ilişkili en iyi karakterize edilmiş epigenetik modifikasyonlardan biri, promotor bölgelerinin hipermetilasyonu yoluyla genlerin

susturulmasıdır. Özellikle, MMR genlerinden biri olan *MLH1*'in promotor hipermetilasyonu, MSI yolağı ile ya da sporadik olarak gelişmiş kolorektal kanserlerin çoğunda gösterilmiştir (Veigl vd., 1998; Herman vd., 1998; Grady ve Carethers, 2008). Birçok genin promotor bölgesi sitozin ve guanin dinükleotitleri bakımından zengin olduğu için, CpG adalarındaki sitozin dinükleotitlerinin metilasyonu, kromozomal yapının değişmesine ve gen ekspresyonunun baskılanmasına yol açar. Tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğramadan epigenetik olarak susturulması CIMP'e sahip kolorektal kanserde belirgin bir olaydır (Snover, 2011; Jass, 2007). DNA hipermetilasyonun yanı sıra DNA metilasyon içeriğinde meydana gelen bir azalma olan genom geneli hipometilasyon da kromozomal kararsızlığı indükleyerek kolorektal karsinogenezde ilerletici bir etki göstermektedir (Chen vd., 1998). Genomik DNA hipometilasyonunu, LINE ya da Serpiştirilmiş Kısa Nüklear Element [SINE (Short Interspersed Nuclear Element)] gibi hareketli DNA dizilerinin metilasyon içeriği oldukça etkilemektedir. Aktif haldeki LINE-1 retrotranspozonu kromozomal kararsızlığa, yakınındaki genlerin artmış ekspresyonuna veya telomer uzunluğunun korunmasında rol alan gen transkriptlerinin üretilmesine yol açar (Faulkner vd., 2009; Mueller vd., 2018).

2.2. Serpiştirilmiş Uzun Nüklear Element-1 (LINE-1)

Genetik mutasyonlara ek olarak histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve genomik imprinting (damgalanma) kaybı gibi epigenetik değişiklikler; tümör başlangıcı, ilerlemesi ve gelişimi açısından önemli bir faktördür. DNA metilasyonu çoğu durumda genlerin ekspresyon seviyelerini kontrol altında tutan temel bir epigenetik süreçtir. Tümör hücrelerinde gözlenen anormal DNA metilasyonu, bölgeye özgü CpG adası promotor hipermetilasyonu ve global DNA hipometilasyonu olmak üzere iki kategoriye ayrılır (Kerachian ve Kerachian, 2018). Kanserli hücrelerin incelendiği birçok çalışmada bölgeye özgü promotor hipermetilasyonunun tümör baskılayıcı genlerde; global DNA hipometilasyonunun ise tekrarlayan dizilerde meydana geldiği gösterilmiştir (Hernandez-Blazquez vd., 2000; Irizarry vd., 2009). Normal somatik hücrelerdeki LINE'ler yüksek oranda metile halde oldukları için genomik kararsızlığa neden olabilecek retrotranspozisyon yeteneklerini kaybetmişlerdir (Hoffman ve Schulz, 2005; Kazazian, 2004). LINE-1 insan genomunun yaklaşık %17'sini oluşturmakta olup; bu tekrar dizilerinde meydana gelen metilasyon kaybı genom geneli hipometilasyon durumunu

yansıtmaktadır (Rodic ve Burns, 2013; Baba vd., 2014; Cordaux ve Batzer, 2009; Murata vd., 2013; Kazazian, 2000).

2.2.1. LINE-1'in Yapısı

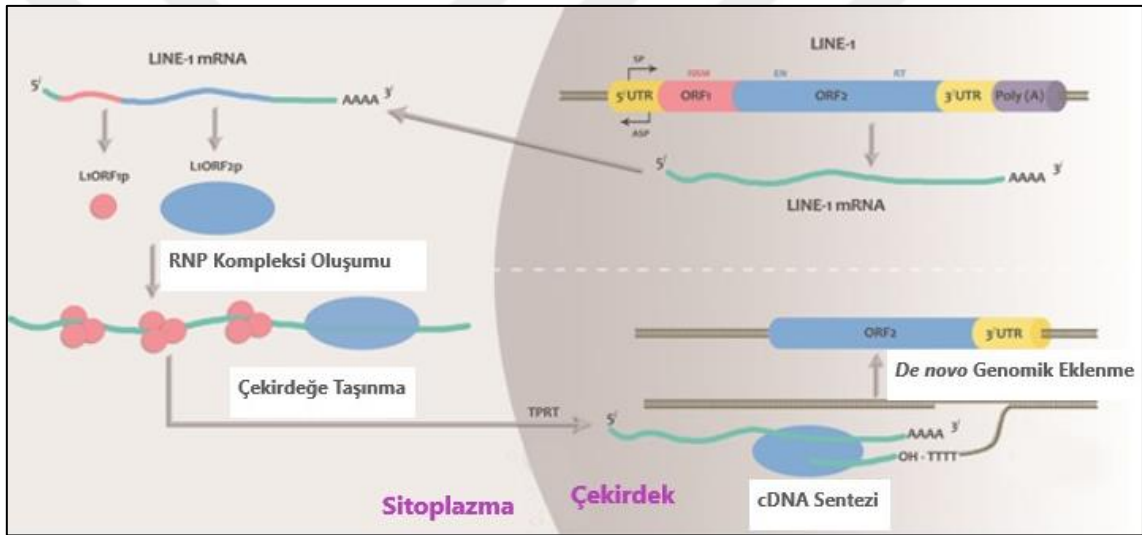
İnsan genomunun yaklaşık olarak yarısını oluşturan tekrar dizileri ardışık (tandem) tekrarlı diziler ve genom boyunca serpiştirilmiş tekrar dizileri olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. İnsan genomu DNA transpozonlarından ve retrotranspozonlardan oluşan sayısız serpiştirilmiş tekrar dizisine sahiptir ve LINE-1, SINE (Alu) ve SVA (SINE/VNTR/Alu) bilinen 3 farklı retrotranspozon grubudur (Kerachian ve Kerachian, 2018). LINE-1 RNA aracılığı ile genom içerisinde kendini çoğaltma yeteneğine sahip olduğu için otonom elementler olarak adlandırılırken; SINE ve SVA elementleri ise genom içerisinde hareket edebilmeleri için LINE-1'e bağımlı olduklarından otonom olmayan elementler olarak adlandırılırlar. Genom boyunca sayısı yaklaşık olarak 500 000 adet olan LINE-1 dizisi zamanla 5' ucundan kesilmeler ile kısalmışken; tam uzunlukta olan LINE-1 sayısı yaklaşık 3 000 ile 5 000 arasındadır (Kazazian, 2000; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

Genel olarak LINE-1'lerin çoğu, 5' ucundaki kesilmeler, ters transkripsiyon sırasında meydana gelen nokta mutasyonları ve replikasyonu sırasında tekrar genoma eklendiğinde meydana gelen kayıplardan dolayı retrotranspozisyon yeteneğini kaybetmiştir. İnsan genomu yüksek oranda aktif, ortalama 50-120 adet arasında LINE-1 içerir (Brouha vd., 2003). Bu aktif LINE-1'ler, kendilerini genom boyunca yerleştirmek için bir "kopyala-yapıştır" mekanizması kullanırlar. Bu nedenle komşu genler veya düzenleyici diziler üzerinde belirgin etkileri vardır. Tam uzunlukta olan LINE-1, 5' Kodlanmayan Bölgesinde [5' UTR (UnTranslated Region)] bir internal promotora sahiptir (Swergold, 1990). Çok sayıda CpG içeren 5' UTR'nin 460 bp uzunluğundaki başlangıç bölgesi yoğun bir şekilde çalışılmış ve normal somatik hücrelerde yüksek oranda metile olduğu gösterilmiştir (Hata ve Sakaki, 1997; Steinhoff ve Schulz, 2004; Thayer vd., 1993). Tam uzunlukta bir LINE-1 5' UTR bölgesinde birbirine ters yönde hizalanmış iki promotor bölgesi içerir. Bu promotorlardan biri "sense" promotor olarak adlandırılır ve retrotranspozisyon ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu düzenler. Bu genler LINE-1 hareketliliği için gerekli olan RNA'ya bağlanan protein, endonükleaz ve ters transkriptaz enzimi kodlar. Ters yönde uzanan ikinci promotor ise "antisense" promotor olarak adlandırılır ve "downstream" genlerin transkripsiyonunun uyarılmasına

yol açan alternatif bir transkripsiyon başlangıç bölgesi oluşturur (Hur vd., 2014; Speek, 2001). Ayrıca LINE-1 retrotranspozonları 5' ve 3' UTR arasında iki adet Açık Okuma Çerçevesi [ORF (Open Reading Frame)] içerirler (Penzkofer vd., 2005).

2.2.2. LINE-1'in Hareketliliği

Embriyogenez boyunca eşey hücrelerinde düşük metilasyon (hipometilasyon) oranı gösteren ve aktif olarak hareket edebilen LINE-1'ler, normalde somatik hücrelerde yüksek oranda metile olduğundan epigenetik olarak susturulmuştur. Ancak somatik hücrelerde bazı LINE-1'ler yeni genomik yerlere hareket edebilme (retrotranspozisyon) kapasitelerini muhafaza etmeye devam ederler (Şekil 3) (Beck vd., 2010).



Şekil 3. LINE-1 hareketliliği (SP; Sense Promotor, ASP; Anti-Sense Promotor, ORF1; Open Reading Frame 1, ORF2; Open reading Frame 2, L1ORF1p; RNA'ya Bağlanan Protein, L1ORF2p; Endonükleaz (EN) ve Ters Transkriptaz (RT) Protein Kompleksi) (Kerachian ve Kerachian, 2018).

Çekirdek içerisinde gerçekleşen LINE-1'in transkripsiyonu sonunda oluşan mRNA sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada mRNA'dan ORF1 ve ORF2'nin translasyonu ve ribonükleoprotein (RNP) kompleksinin oluşumu gerçekleşir. Sonrasında ters transkripsiyon için çekirdeğe geri dönen RNA'dan ORF2p'nin ters transkriptaz aktivitesi ile cDNA oluşumu ve sonrasında endonükleaz aktivitesi ile de DNA'da serbest 3' OH grubu bırakacak şekilde eklenme bölgesi oluşumu gerçekleşir. Sonuç olarak LINE-1 5' ucu kesilmiş bir şekilde kendini çoğaltarak genoma eklenmiş olur (Beck vd., 2010).

Tümör hücrelerinde LINE-1'ler hipometilasyon yoluyla yeniden aktive olurlar ve kanser oluşumu için gerekli patolojik süreçlerde rol oynarlar (Kazazian, 2000; Beck vd., 2010; Xiao-Jie vd., 2016; Hancks ve Kazazian, 2016). Normal dokulardaki LINE-1 metilasyon seviyesi doku tiplerine göre farklılık göstermektedir. LINE-1 metilasyon oranı bazı dokularda (karaciğer, böbrek, meme, akciğer ve mide) birbirine çok yakın iken; bazı dokularda ise (tiroid ve özofagus) oldukça geniş bir oran farkı gözükmektedir (Chalitchagorn vd., 2004).

LINE-1 aktif halde genom içerisinde hareket yeteneğine sahip olduğu durumda genomda farklı bölgelere sürekli transpoze olur. Bu durum çeşitli genlerin ekspresyon düzeyini etkiler ve kanser gibi birçok genetik hastalığın patogeneziinde önemli bir rol oynar (Baba vd., 2014; Chen vd., 2005; Miki vd., 1992; Babushok ve Kazazian, 2007; Iskow vd., 2010; Ostertag ve Kazazian, 2001). Örneğin kanser hücrelerinde LINE-1 retrotranspozonları genomik kararsızlığa neden olan genom içi insersiyonlar, hatalı “splicing (eklenme)” ya da DNA kırıkları yoluyla çevrelerindeki genleri etkileyebilirler (Hancks ve Kazazian, 2016; Schulz, 2006). Ökaryotik hücreler LINE-1 tarafından uyarılmış tümörleşme sürecinde, LINE-1 hareketliliğini engellemek için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. LINE-1 5' UTR içerisinde bulunan birbirine ters yöndeki promotorlar, birbirlerine bağlandıklarında çift iplikli RNA'ları [dsRNA (Double Strand RNA)] oluşturan “sense” ve “antisens” RNA'lar üretirler. Bu dsRNA'lar daha sonra “Dicer” adlı enzim tarafından endojen siRNA (small interfering RNA)'lara bölünürler. Elde edilen endo-siRNA'lar LINE-1 mRNA'sını degrade eder ve RNA interferans mekanizmasını tetikleyerek LINE-1 retrotranspozisyonunu susturmuş olur. Bu sayede geliştirilen kontrol mekanizması ile negatif bir düzenleyici döngü oluşturulmuş olur. siRNA gibi, piRNA (PIWI interacting RNA)'da PIWI proteinleri ile etkileşim RNA-protein kompleksleri oluşturarak LINE-1 üzerinde negatif bir düzenleme etkisi gösterir (Xiao-Jie vd., 2016).

2.2.3. Kolorektal Kanserde LINE-1

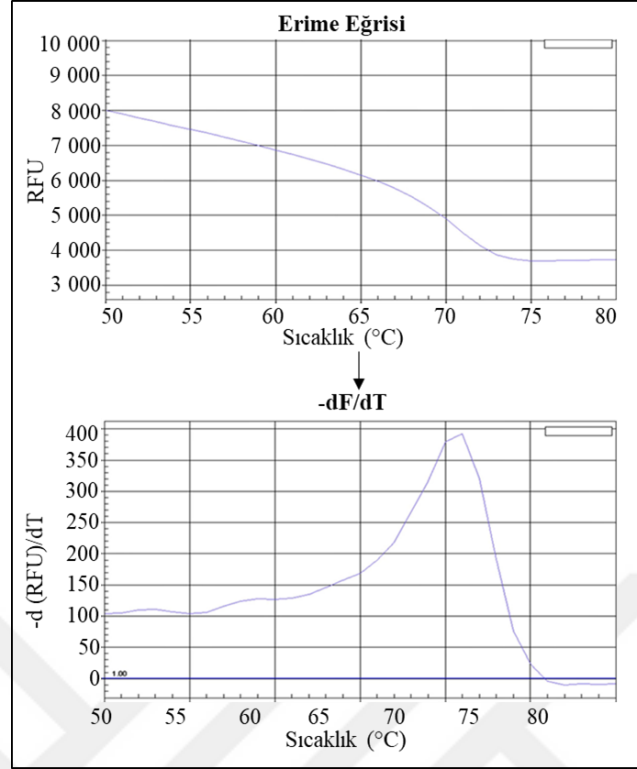
İlk kez 1992 yılında APC genine bir LINE-1 dizisinin eklenmesinin sonucunda, kolorektal kanser örneklerindeki APC geninde fonksiyon kaybına neden olduğu tespit edildiğinde, LINE-1'in kanser ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Miki vd., 1992). Yapılan bir çalışmada da LINE-1 eklenmesinin, prostat ve yumurtalık kanseri gibi çeşitli kanserlerden daha sıklıkla kolorektal kanserde gözlemlendiği rapor edilmiştir (Lee vd.,

2012). 2014 yılında LINE-1 hipometilasyonunun insan kanserindeki rolünü açıklayan bir meta-analiz çalışması yayımlanmıştır. Bu analizde, incelenen birçok kanser dokusundaki LINE-1 metilasyon seviyesinin normal dokular ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşük olduğu gösterilmiştir (Barchitta vd., 2014). Yapılan başka bir meta-analizde, kanser hastalarında LINE hipometilasyonu ile kötü prognoz arasındaki ilişki birbirini destekler yönde bulunmuştur (Li vd., 2014). Ayrıca başka bir çalışmada da, kolorektal kanserdeki LINE-1 hipometilasyonunun, ileri evre ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sunami vd., 2011).

2.3. Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) Analizi

Fizyolojik koşullarda kararlı halde olan çift iplikli DNA (dsDNA) sıcaklığın artmaya başlamasıyla bu kararlı yapısından uzaklaşarak tek iplikli hale gelir. DNA ipliğinin hem uzunluğuna hem de guanin-sitozin (GC) içeriğine bağlı olan erime sıcaklığı (T_m), DNA'nın çift ipliğinin açılarak %50'sinin tek iplikli hale geldiği sıcaklığa denir. GC baz çiftleri üç hidrojen bağı ile bağlandığından, sadece iki hidrojen bağı ile bağlanan adenin-timin (AT) baz çiftlerinden daha kararlı bir yapı gösterirler. Bu sebeple, yüksek GC içeriğine sahip DNA dizileri, düşük sayıda GC içeren DNA dizilerinden daha yüksek bir T_m 'ye sahiptir.

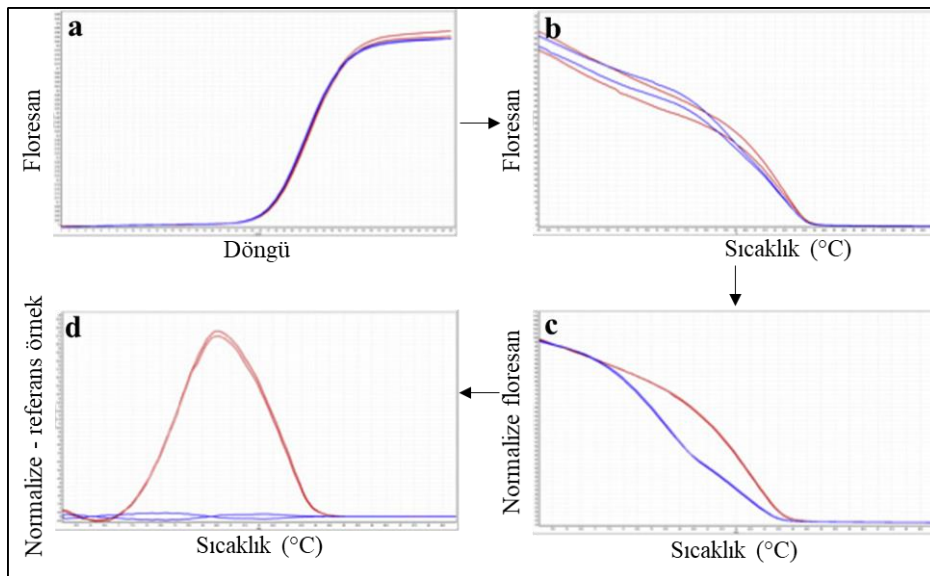
Erime eğrisi analizi, doğru PCR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek için real time PCR'da sıklıkla kullanılan bir metottür. Bunun için gerekli olan çift iplikli DNA'nın küçük oluğuna (minor groove) bağlanan SYBR Green gibi floresan ışımaya yayan bir boya varlığında kalıp dizinin çoğaltılmasıdır. Bağlanmamış (serbest) haldeyken düşük bir floresan ışımaya yayan SYBR Green moleküllerinin dsDNA'ya bağlanmasıyla floresan sinyalinde dikkat çekici bir artış gözlenir. Erime eğrisi analizi son PCR döngüsünden sonra sıcaklığın kademeli olarak artırılması esasına dayanır. PCR sonunda elde edilen çok sayıda çift iplikli amplikon nedeniyle erime analizinin başlangıcında yüksek miktarda floresan sinyali elde edilir. Sıcaklık artmaya başladıkça ayrılan çift iplikten SYBR Green molekülleri kopmaya başlar ve floresan sinyalinde azalma gözlenir. Sonuç olarak amplikonun T_m 'si elde edilen erime eğrisinin bükülme noktasından veya artan sıcaklıkla (T) değişen, floresansın (F) sıcaklığa oranının negatif türevinin ($-dF/dT$) grafiğinden elde edilen erime tepe noktasında belirlenebilir (Şekil 4) (Druml ve Cichna-Markl, 2014).



Şekil 4. Erime eğrisi analizi ($-dF/dT$; artan sıcaklıkla (T) değişen, floresanın (F) sıcaklığa oranını negatif türevi, RFU; Relative Fluorescence Unit) (Druml ve Cichna-Markl, 2014).

SYBR Green, ampliconların saflığını ve uzunluğunu kontrol etmek için PCR sonrası erime eğrisi analizlerinde sıklıkla kullanılmasına rağmen sadece küçük dizi farklılıkları gösteren ampliconlar arasında ayırım yapılmasında tek başına yeterli değildir. Bu nedenle erime eğrisi analizinin daha gelişmiş formu olan; tek baz değişikliklerini, küçük insersiyonları ve delesyonları bile belirleyebilen Yüksek Çözünürlüklü Erime [HRM (High Resolution Melting)] analizi kullanılır (Reed vd., 2007). HRM analizi yüksek çözünürlüklü termal döngü cihazları (yüksek hassasiyetli ısı değişimleri yapabilmeye ve değerlendirebilmeye özelliklerine sahip) ve LC Green PLUS, EvaGreen, SYTO9 ya da ResoLight gibi satürasyon (doyurma) boya kullanılarak gerçekleştirilir. Satürasyon boya yüksek konsantrasyonlarda bile DNA polimerazı inhibe etmez ve PCR ürününün tamamını etiketler (DNA molekülünün tamamına tam doygunlukta bağlanır). Bu sayede tüm erime alanlarının tespitine olanak sağladığı için SYBR Green boyası yerine tercih edilir (Monis, 2005). Yüksek çözünürlüklü cihazlar sayesinde daha hassas sıcaklık kontrolü, daha küçük sıcaklık artışlarının uygulanması (0.01 – 0.2 °C) ve gelişmiş veri toplayabilme sayesinde bir erime profilinin detaylı analizi elde edilebilir (Druml ve Cichna-Markl, 2014).

HRM analizi genel olarak satürasyon boyası varlığında PCR sonrasında oluşan amplikonların erimesi ile elde edilen verilerin analizini ve yorumlanmasını kapsar. HRM analizinde güvenilir ve tekrar üretilebilir erime profilleri elde edebilmek için, kalıp dizinin amplifikasyonunun spesifik ve verimli bir şekilde gerçekleştirilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle PCR koşullarının optimizasyonu ve primer tasarımı HRM analizinde dikkat edilmesi gereken adımlardan biridir. Primer tasarımı sırasında primer dimerleri ve spesifik olmayan ürünlerin oluşumunu engelleyecek hususlara özellikle dikkat edilmelidir. HRM analizinin hassasiyetini etkileyen bir diğer önemli konu amplikon uzunluğudur. Amplikonlar ne kadar uzun olursa küçük bir dizi değişikliğinin neden olduğu erime eğrisindeki fark o kadar küçük olacağından ve karmaşık erime profilleri ile sonuçlanan birden fazla erime alanı içereceğinden, amplikonların 300 bp'nden fazla olmamasına dikkat edilmelidir. Düşük threshold (eşik değeri - Ct) döngüsü ve plato fazına ulaşan amplifikasyon eğrilerinin belirlediği etkili bir amplifikasyon elde edilebilmesi için PCR koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir (Şekil 5). Ayrıca $MgCl_2$ konsantrasyonu, DNA örneğinin saflığı ve miktarı ve örnekler arasında benzer Ct değerleri elde etmek için başlangıç DNA miktarlarının önemli ölçüde farklılık göstermemesi, PCR optimizasyonu için gerekli diğer hususlardır (Reed, 2007; Vossen vd., 2009).



Şekil 5. Yüksek çözünürlüklü erime analizi. (a) Amplifikasyon eğrileri. (b) Normalizasyondan önce erime eğrileri. (c) Normalizasyondan sonra erime eğrileri. (d) Difference plot (fark grafiği) (Druml ve Cichna-Markl, 2014).

2.3.1. Veri Analizi

Amplikonların erimesi (tek iplikli forma dönüşümleri) son PCR döngüsünden sonra sıcaklığın kademeli olarak arttırılması (0.1 °C/2 sn) ile gerçekleştirilir. Erime eğrileri, uygulama sonunda artan sıcaklıkla (T) azalan floresans yoğunluğunun (F) değişim grafiği ile elde edilir. Optimize edilmiş PCR koşullarının uygulanmasına ve başlangıçta aynı miktarda DNA kullanılmasına rağmen, floresan sinyalinde farklılıklar ortaya çıkabilir. Bu farklılıkların ortadan kaldırılması ve bütün örneklerin aynı başlangıç (%100) ve bitiş (%0) floresan sinyali seviyelerine sahip olmaları için erime öncesi ve sonrasında elde edilen mutlak floresan seviyelerine normalleştirme işlemi gerçekleştirilir. Bu sayede elde edilen “normalize eğriler” örneklerin karşılaştırılarak analiz edilmesine imkan tanımış olur. Her bir erime eğrisi arasındaki küçük farklılıkları ayırt etmek ve vurgulamak için, örnek erime eğrisi bir referans numunenin erime eğrisinden çıkartılmasıyla elde edilen fark grafikleri (difference plot) kullanılır (Şekil 5) (Reed vd., 2007).

2.3.2. HRM Analizinin Klinik Araştırma ve Tanıdaki Rolü

Bir PCR ürününün erime profili, CG içeriğine, uzunluğuna, sekansına ve iplik tamamlayıcılığına (heterozigotluk) bağlı olduğundan, HRM analizi; mutasyon taramasına, tek nükleotit polimorfizmlerinin [SNP (Single Nucleotide Polymorphism)] saptanmasına ve metilasyon analizine izin veren klinik araştırma ve teşhislerde yüksek oranda uygulanabilir bir yöntemdir (Vossen vd., 2009). Geleneksel yöntemlerin aksine, HRM analizi amplifikasyon aşaması ile aynı tüpte gerçekleştirilir ve sonrasında amplikonları saflaştırmaya veya ayırmaya gerek kalmaz. Bu durum, HRM analizini jel elektroforezi gibi PCR sonrasında gerek duyulan ek yöntemlere göre daha hızlı, daha az zahmetli ve daha yüksek numune verimi için daha uygun hale getirir. Ayrıca, analizlerin kapalı bir sistemde yapılması, kontaminasyon riskini azaltır. HRM analizi diğer yaklaşımlardan, özellikle de dizileme tekniklerinden daha ucuzdur. Tahribatsız bir yöntem olduğundan, gerektiğinde sonradan (örneğin jel elektroforezi veya dizileme ile) analizinin yapılması mümkündür. Bunun yanı sıra, HRM analiziyle gen taraması ve genotiplendirme çalışmalarında bazı sınırlamalar söz konusudur. Farklı heterozigot örnekler, homozigot varyantlardan açıkça ayırt edilebilen ancak birbirlerinden ayırt edilemeyecek kadar benzer olan erime eğrileri oluşturabilirler. Ayrıca mutasyon taraması sırasında ortak SNP'lerin varlığı, sonuçların yorumlanmasını zorlaştırabilir (Wittwer,

2012). Gen tarama ve genotiplemeye ek olarak, HRM analizi DNA metilasyon analizinde sıklıkla kullanılmaktadır. DNA metilasyonu, gen ekspresyonunu düzenleyen önemli bir epigenetik süreçtir. Tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgesinin metilasyonu kanserleşme sürecinde erken dönemde gerçekleştiğinden, anormal DNA metilasyon paternleri kanser için çok umut verici tanısal ve prognostik biyobelirteçler olarak kabul edilmektedir (Wojdacz, 2012).

2.3.3. HRM Analizi ile Metilasyon Tayini

DNA'nın erime profili kullanarak metilasyon analizi yapılabilmesi için öncelikle PCR amplifikasyonu ile ilgili DNA dizisinin çoğaltılması gerekmektedir. Hücrelerde normal amplifikasyon sırasında yeni sentezlenen ipliğin metillenmesi DNA Metiltransferaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. PCR sırasında ise ilk döngüden sonra yeni sentezlenen ipliğin metillenmesi için ortamda herhangi bir enzim ve metil grubu bulunmadığından metilasyon işaretleri kaybolur. Bu nedenle metilasyon çalışmalarında kalıp DNA'nın PCR ile çoğaltılmasından önce metilasyon işaretlerini koruyabilmesi için sodyum bisülfid kimyasalı ile modifiye edilmesi gerekmektedir. Bisülfid dönüşümü sayesinde metile olmayan sitozinler değişmeden kalırken metile sitozinler urasile (U) dönüşür. Dolayısıyla bisülfid dönüşümü yapılmış DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucunda oluşan ürünlerin nükleotit dizilimi, kalıp DNA'nın metilasyon durumuna göre belirlenir. Sonuç olarak farklı nükleotit dizilimine sahip ürünlerin farklı erime sıcaklıkları olacağından tanımlanmaları sağlanacaktır (Worm ve Guldborg, 2001).

HRM tabanlı metilasyon analizinin ön koşulu hem metillenmiş hemde metile olmayan kalıp dizinin amplifikasyonuna izin veren primer çiftinin kullanılmasıdır. Bu sayede yüksek verim ve hassasiyet ile kalıp dizinin çoğaltılması ve sonrasında HRM analizi ile metilasyon seviyesinin tespiti gerçekleştirilmiş olur (Wojdacz vd., 2008; Wojdacz vd., 2009; Wojdacz ve Lotte Hansen, 2006). HRM analizi ile metilasyon seviyesinin tespiti, metilasyon seviyesi bilinen standartların erime profilleri ile bilinmeyen dizinin erime profillerinin karşılaştırılması prensibine dayanır. Ayrıca HRM analizi düşük kalitede olan veya kimyasal olarak işlem görmüş örneklerden ya da arşiv dokularından elde edilen DNA dizilerinin bile metilasyon seviyesinin tespitine izin verir. Dolayısıyla örnek kalitesinden etkilenmemesi ve PCR ürünlerini tam olarak tanımlayabilmesi sayesinde HRM analizi yüksek özgünlüğe ve doğruluğa sahip bir yöntemdir (Kristensen vd., 2009).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda opere edilmiş ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından kolorektal kanser tanısı konmuş 30 hastanın normal ve tümör dokusu dâhil edildi. Doku örnekleri Formalin ile Fikse Edilmiş Parafine Gömülü Doku [FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissue)] bloklarından alınıp 1.5 ml'lik tüplere konulmuş kesitler halinde temin edildi. Parafine gömülü dokulardan DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra DNA örneklerine bisülfid dönüşümü uygulandı. Sonrasında ise LINE-1'in tasarlanan primerler ile 6 bölgeye ayrılmış olan 5' UTR bölgesi, Real Time PCR ve sonrasında HRM analizi ile metilasyon açısından incelendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilerek bölgeler arası metilasyon dereceleri belirlendi.

3.1. Materyal

3.1.1. Alet ve Cihazlar

- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye/ İstanbul)
- Çalkalamalı Isı Bloğu (Ditabis HLC MHR 13, Almanya/ Pforzheim)
- Dikey Elektroferez Sistemi (BIO-RAD Mini-PROTEAN®, ABD/ Kaliforniya)
- Elektroferez Güç Kaynağı (Consort EV233, ABD/ Cohasset)
- Hassas Terazi (OHAUS Pioneer® Analytical, Filipinler/ Batangas)
- Isı Bloğu (WEALTECH HB-1, ABD / Sparks)
- Jel Dökümantasyon Sistemi (DNR MiniLumi, İsrail/ Neve Yamin)
- Ligh Cycler 480 II Roche (LightCycler® 480 Instrument II, İsviçre/ Basel)
- 96'lık plate (Light Cycler 480 Multiwell Plate 96, İsviçre/ Basel)
- Manyetik Karıştırıcı (Velp® Scientifica are Heating Magnetic Stirrer, İtalya/ Usmate)
- Mikropipet Seti (Eppendorf, Almanya/ Hamburg)
- Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge® 16, ABD/ Kaliforniya)
- Minisantrifüj (ExiSpin™ BIONEER, Güney Kore/ Daejeon)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, ABD/ Massachusetts)
- Otoklav (Nüve OT 40L, Türkiye/ Ankara)
- Saf Su Cihazı (GFL Saf Su Cihazı 2104, Almanya/ Burgwedel)

- Thermal Cycler (Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cycler, ABD/ Kaliforniya)
- Vorteks (ZX3 VELP® SCIENTIFICA, İtalya/ Usmate)

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

- 10X ViBuffer A (- MgCl₂) (vivantis, Malezya/ Selangor, PL1202)
- 25 mM dNTP Mix (Thermo Scientific™, ABD/ Massachusetts, R1121)
- 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific™ GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ABD/ Massachusetts, SM0372)
- 50 mM MgCl₂ (vivantis, Malezya/ Selangor, PL1202)
- Akrilamide (Merck, Almanya/ Darmstadt)
- Amonyum Per Sülfat (Merck, Almanya/ Darmstadt)
- Bisakrilamid (ABCR GmbH & Co. KG, Almanya/ Karlsruhe)
- Bisülfid Dönüşüm Kiti (Thermo Scientific™ EpiJET Bisulfite Conversion Kit, ABD/ Massachusetts, K1461)
- Boric Asit (Merck EMSURE®, Almanya/ Darmstadt)
- DNA İzolasyon Kiti (Thermo Scientific™ GeneJET FFPE DNA Purification Kit, ABD/ Massachusetts, K0702)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Bio Basic Inc., Kanada, 6381-92-6)
- Etil alkol (≥ %99.5 J.T Baker)
- Etidyum Bromür (EtBr) (SIGMA®, ABD/ Missouri, 1239-45-8)
- Gliserol (SIGMA®, Missouri/ ABD)
- HRM Analizi Kiti (LightCycler® 480 High Resolution Melting Master, Roche, İsviçre/ Basel, 04909631001)
- Metile ve Metile olmayan kontrol DNA (Human Methylated & Non-methylated DNA Set, ZYMO RESEARCH, ABD/ Kaliforniya, D5014)
- Primer Çiftleri (Sentegen, Ankara/ Çankaya)
- Taq DNA Polimeraz 5U/µl (vivantis, Malezya/ Selangor, PL1202)
- Tetrametiletildiamin (TEMED) (SIGMA®, ABD/ Missouri)
- Tris Base (Fisher Bioreagents®, ABD, BP152-500)

3.1.3. Çözeltiler

TE-8 Tamponu (pH 8.0)

- 121.5 mg Tris-HCl
- 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda tamamen çözüldükten sonra 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine porsiyonlanarak saklandı.

10X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu

- 108 g Tris Baz
- 55 g Borik Asit
- 42 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) ya da 9.3 g Na₂EDTA, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi.

1X Elektroforez Yürütme Tamponu

Hazırlanan 10X TBE'den 100 ml alınıp, distile su ile 1000ml'ye tamamlandı.

6X Yükleme Tamponu

- %30 (v/v) Gliserol
- %0.25 (w/v) Bromofenol Blue, olacak şekilde hazırlanıp, +4 °C'de saklandı.

%30'luk Poliakrilamid Stok Solüsyonu (29:1)

- 29 g akrilamid
- 1 g bisakrilamid, distile su ile 100 ml'ye tamamlanıp, +4 °C'de saklandı.

%25'lik Amonyum Persülfat (APS)

- 1.25 g Amonyum Persülfat, distile su ile 5 ml ye tamamlanıp porsiyonlara ayrılarak - 20 °C'de saklandı.

%10'luk Poliakrilamid Jel Çözeltisi

15 ml için:

- 8.5 ml distile su
- 5 ml %30'luk Poliakrilamid Stok Solüsyonu
- 1.5 ml 10X TBE
- 50 µl %25'lik APS
- 15 µl TEMED

Jel Boyama Solüsyonu (0.5 µg/ml)

1X TBE içerisinde 0.5 µg/ml olacak şekilde stok (5 mg/ml) etidyum bromür çözeltisinden alınarak hazırlandı.

3.1.4. Primerler

LINE-1 5' UTR bölgesi için hazırlanmış olan primerlerin sentezi ticari olarak yapıldı ve liyofilize halde satın alındı. 100 µM stok solüsyon hazırlamak için liyofilize halde primerlere firmanın belirttiği miktarda TE-8 Tamponu eklenerek iyice çözülmesi için +4 °C'de 1 gün bekletildi. Sonrasında stok solüsyondan 10 µM çalışma solüsyonu hazırlanıp porsiyonlanarak her ikisi birden -20 °C' de saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1 Primer Tasarımı

LINE-1 retrotranspozonuna ait DNA dizisi NCBI GenBank (GenBank: X52235.1) veri tabanından temin edildi (Şekil 6) (National Center for Biotechnology Information, 2019).

1	GAGAGGAGCC	AAGATGGCCG	AATAGCAACA	GCTCCGGTCT	ACAGCTCCCA
51	GCGTGAGCGA	CGCAGAAGAC	GGGTGATTTTC	TGCATTTCCA	TCTGAGGTAC
101	TGGGTTCATC	TCACTAGGGA	GTGCCAGACA	GTGGGCGCAG	GTCAGTGGGT
151	GCGCGCACCG	TGCACGAGCC	GAAGCAGGGC	GAGGCATTGT	CTCACTTGGG
201	AAGCGCAAGG	GGTCAGGGAG	TTCCCTTTCC	GAGTCAAAGA	AAGGGGTGAC
251	GGACGCACCT	GGAAAATCGG	GTCTCTCCCA	CCCGAATATT	GCGCTTTTCG
301	ACCGGCTTAA	AAAAACGGCG	ACCGCGAGAT	TATATCTTGC	ACCTGGCTAG
351	GAGGGTCCTA	CGCCCACGGA	GTCTCGCTGA	TTGCTAGCAC	AGCAGTCTGA
401	GATCAAACCTG	CAAGGCAGCA	GCAAGGCTGG	GGGAGGGGCG	CCCGCCATTG
451	CCCAGGCTTG	CTTGGGTAAA	CAAAGCAGCC	TGGCAGCTCG	AACTGGGTGG
501	AGCCCACCAC	AGCTCAAGGA	GGCCTGCCTG	CCTTTGTAGG	CTCCACCTCT
551	GGGGCAGGG	CACAGACAAA	TAAAAAGACA	GCAGTAACCT	CTGCAGACTT
601	AAATGTCCCT	GTCTGACAGC	TTTGAAGAGA	GCAGTGGTTC	TCCCAGCATG
651	CAGCTGGAGA	TCTGAGAACG	GGCAGACTGC	CTCCTCAAGT	GGGTCCCTGA
701	CCCTGACCC	CGAGCAGCC	TAAC TGGGAG	GCACCCCCA	GCAGGGGCAC
751	ACTGACACCT	CACAAGGCAG	GGTATTCCAA	CAGACCTGCA	GCTGAGGGTC
801	CTGTCTGTTA	GAAGGAAAAC	TAACAAACAG	AAAGGACATC	CACACAAAA
851	ACCCATCTGT	ACATCACCAT	CATCAAAGAT	CAAAAGTAGA	TAAAACCAAG

Şekil 6. LINE-1 retrotranspozonuna ait DNA dizisi (CG: CpG dinükleotitleri, dizi yönü: 5'→3') (National Center for Biotechnology Information, 2019).

LINE-1 geninin 900 bç'lik 5' UTR kısmı üzerinde belirlenen CpG dinükleotitlerini içerecek şekilde 6 bölge tespit edildi. PCR ve sonrasında HRM analizi ile CpG'lerdeki metilasyon durumunu değerlendirmek üzere GeneRunner 6.5.52 programı kullanılarak bu bölgelerden 6 çift primer tasarlandı. Bu işlem yapılırken kalıp olarak ilgili DNA dizisinin bisülfite muamelesiyle dönüşüme uğrayacak olan hali dikkate alındı. Yani kaynak dizideki her C (Sitozin) T (Timin, aslında Urasil) olarak değiştirildi (yalnızca CpG'lerdeki C'ler hariç tutuldu, çünkü buralarda metilasyon durumunda C→T dönüşümü olmayacaktır). Bisülfite dönüşümü sonrası dizi bilgisi Şekil 7'de verilmiştir.

1	GAGAGGAGTT	AAGATGGT CG	AATAGTAATA	GTTT CG GTTT	ATAGTTTTTA
51	GCG TGAG CGA	CG TAGAAGAC	GGGT GATTTT	TGTATTTTTA	TTTGAGGTAT
101	TGGGTTTATT	TTATTAGGGA	GTGTTAGATA	GTGGG CG TAG	GTTAGTGGGT
151	GCGCG TAT CG	TGTAC CG AGTC	GAAG TAGGGC	GAGG TATTGT	TTTATTGGG
201	AAG CG TAAGG	GGTTAGGGAG	TTTTTTTTT C	GAG TAAAGA	AAGGGGT GAC
251	GGACG CATTT	GGAAAAT CGG	GTTTTTTTTA	TT CGA ATATT	GCG TTTT CGG
301	AT CGG TTTAA	AAAA CGGCG T	AT CGCG AGAT	TATATTTTGT	ATTTGGTTAG
351	GAGGTTTTA	CG TTTAC CGA	GTTT CG TTGA	TTGTTAGTAT	AGTAGTTTGA
401	GATTAAATTG	TAAGGT CG TA	GTAAGGTTGG	GGGAGGGG CG	TT CG TTATTG
451	TTTAGGTTTG	TTTGGGTAAA	TAAAGTAGTT	TGGTAGTT CG	AATTGGGTGG
501	AGTTTATTAT	AGTTTAAGGA	GGTTGTTTG	TTTTTGTAGG	TTTTATTTTT
551	GGGGGTAGGG	TATAGATAAA	TAAAAAGATA	GTAGTAATTT	TTGTAGATTT
601	AAATGTTTTT	GTTTGATAGT	TTTGAAGAGA	GTAGTGGTTT	TTTTAGTATG
651	TAGTTGGAGA	TTTGAGAA CG	GGTAGATTGT	TTTTTTAAGT	GGGTTTTTGA
701	TTTTTGATTT	T CG AGTAGTT	TAATTGGGAG	GTATTTTTTA	GTAGGGGTAT
751	ATTGATATTT	TATA CGG TAG	GGTATTTTAA	TAGATTTGTA	GTTGAGGGTT
801	TTGTTTGTTA	GAAGGAAAAT	TAATAAATAG	AAAGGATATT	TATATTAAAA
851	ATTTATTTGT	ATATTATTAT	TATTAAGAT	TAAAAGTAGA	TAAAATT CG

Şekil 7. LINE-1 retrotranspozona ait bisülfite dönüşümü sonrası normal bireylerden beklenen DNA dizisi (CpG dinükleotitlerinin metile olduğu durum, **CG**: CpG dinükleotitleri, dizi yönü: 5'→3').

Primerlerin tasarımı sırasında dikkat edilen hususlardan biri de şudur; bisülfite uygulaması yapıldığında DNA'nın her iki ipliğininde de aynı şekilde C→U dönüşümü gerçekleşecektir ancak buradaki Urasillerin karşısında komplementer olarak hala Guanin (G) bulunacaktır. Bu durumda kalıp olarak DNA ipliklerinden yalnızca biri kullanılacaktır, yani ilk döngüde primerlerden yalnızca biri hibridize olacak diğer primer ise ikinci döngüde bu primerle sentezlenen diziyeye hibridize olacaktır. Bu durumda

çoğalma işlemi 3. döngüden itibaren başlamış olacaktır. Bir iplikte uygun primer bulunamadığında aynı mantıkla diğer iplik kullanıldı. Bu süreçte genel olarak primer çiftlerinin Tm değerleri arasındaki farkın fazla olmamasına, dimer ve hairpin yapıları içermemesine dikkat edildi. Tasarlanan primer çiftleri Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 4. LINE-1 5’ UTR’de belirlenen 6 bölge için tasarlanan primer çiftleri ve CG sayıları (F: Forward, R: Reverse).

Bölge	Primerler (5’ – 3’)	Amplikon Uzunluğu (bç)	CG Sayısı
1	F: GAGAGGAGTTAAGATGGT R: CAAATAAAAATACAAAATCAC	94 (1→94 nt)	6
2	F: TAATTTCTACATTTCCATCT R: GTTTTTTAAGTGAGATAATG	131 (74→204 nt)	7
3	F: CACCTAAAAAATCGAATCTCTCCC R: TAGGATTTTTTTAGTTAGGTGTA	105 (256→360 nt)	9
4	F: TATTTGGTTAGGAGGGTTTTA R: CCCTCCCCAACCTTACT	98 (340→437 nt)	4
5	F: TAGTAAGGTTGGGGGAGG R: CTAAACTATAATAAACTCCAC	100 (419→518 nt)	3
6	F: TGTAGTTGGAGATTTGAGAA R: CCTCAACTACAAATCTATT	149 (649→797 nt)	3

3.2.2. DNA İzolasyonu

FFPE doku örneklerinden genomik DNA izolasyonu ticari kit (GeneJET FFPE DNA Purification Kit, Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirildi. Ticari kitin protokolü üretici firmanın belirttiği şekilde aşağıdaki basamakları kapsamaktadır:

- 4 µm kalınlığında yaklaşık 10 parça parafine gömülü doku içeren tüplere, 200 µl “Digestion Buffer” eklendi ve 90 °C’de 6 dk ısı bloğunda inkübe edildi.

Not: İnkübasyon boyunca tüpler birkaç kez nazikçe vortekslenip doku parçalarının solüsyon içerisinde gömülü halde olduğuna dikkat edildi.

- Isı bloğundan alınan tüplere 20 µl “Proteinaz K solüsyonu” eklendi ve örnekler iyice karışana kadar vortekslendi.

- Örnekler çalkalamalı ısı bloğuna aktarılıp 400 rpm'de 65 °C'de 90 dk boyunca inkübasyona bırakıldı.
 - Sonrasında örnekler ısı bloğuna aktarılıp 90 °C'de 40 dk daha inkübe edildikten sonra 6 000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
 - 200 µl lizat 1.5 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
 - Lizata 10 µl "RNaz A solüsyonu" eklenip vorteks ile iyice karıştırıldı. Ardından karışım 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
 - Örneklerle 200 µl "Binding Buffer" eklendi ve homojen bir karışım elde edilene kadar vorteks ile iyice karıştırıldı.
 - Örneklerle 400 µl "Etanol (%96-100)" eklendi ve homojen bir karışım elde edilene kadar vorteks ile iyice karıştırıldı.
 - Lizatın tamamı toplama tüpüne takılı "GeneJET Purification" kolonuna aktarılıp 6 000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
 - Kolona 500 µl "Wash Buffer 1" eklendi ve 8 000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltılıp kolon toplama tüpüne geri yerleştirildi.
 - Kolona 500 µl "Wash Buffer 2" eklendi ve 12 000 x g'de 3 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltılıp kolon toplama tüpüne geri yerleştirildi ve tekrar 1 dk aynı hızda membranın kuruması için santrifüj edildi.
 - Toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
 - Kolonun tam merkezine gelecek şekilde 60 µl "Elution Buffer" eklendi ve 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8 000 x g'de 1 dk santrifüj edilip kolon atıldı.
- Not: Bu aşama 40 µl "Elution Buffer" ile ikinci kez tekrarlandı.
- 1.5 ml'lik tüp içerisinde elde edilen DNA örnekleri ölçümleri yapılana kadar + 4°C'de saklandı.

Konsantrasyon ölçümü ve saflık belirleme

İzole edilen DNA' ların konsantrasyon ölçümleri spektrofotometre (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer) cihazında gerçekleştirildi. DNA örneklerinden 1'er µl alınıp 260, 280 ve 320 nm dalga boylarında ölçümleri gerçekleştirildi. DNA konsantrasyonlarının hesaplanması için *DNA konsantrasyonu* ($\mu\text{g/ml}$) = $Abs_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times (10 \text{ mm}/0.5 \text{ mm})$ denkleminde kullanıldı. DNA saflığının

(kalitesinin) belirlenmesi için Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ değerinin 1.8-2.0 arasında olmasına ve Abs₂₆₀/Abs₃₂₀ değerinin ise yaklaşık 2.0 olması gerektiğine dikkat edildi.

3.2.3. Bisülfıt Dönüşümü

HRM analizinden önce gerçekleştirilen PCR amplifikasyonu sırasında yeni sentezlenen ipliğin metillenmesi için ortamda metil grubu ve metillenmeyi gerçekleştirecek olan enzim bulunmadığından kalıp DNA'daki metilasyon işaretleri kaybolur. Bu nedenle metilasyon bilgisinin korunması için PCR amplifikasyonu öncesinde kalıp DNA'nın sodyum bisülfıt kimyasalı ile modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu sayede gerçekleştirilen kimyasal modifikasyon ile metil grubu olmayan sitozinler urasile dönüşerek metile sitozinlerden ayrımı gerçekleştirilmiş olur.

Ticari kit (EpiJET Bisulfite Conversion Kit, Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirilen bisülfıt dönüşümü için üretici firmanın önerdiği protokol uygulandı:

- Toz halde olan 10 örneklik "Modification Reagent" tüpüne sırasıyla 900 µl "Saf Su", 200 µl "Modification Solution 1" ve 60 µl "Modification Solution 2" eklendi. Hazırlanan "Modification Reagent" 10 dk boyunca iyice karıştırılarak, tamamen homojen olması sağlandı.
- 200 µl'lik PCR tüpüne 20 µl 500 ng DNA örneği eklendi.
Not: DNA örneğinin hacmi 20 µl'den az olduğu durumda hacim saf su ile 20 µl'ye tamamlandı.
- DNA örneğinin üzerine 120 µl "Modification Reagent" eklendi ve pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandı.
- Sonrasında DNA'nın denatürasyonunun ve bisülfıt dönüşümünün gerçekleşmesi için thermal cycler cihazında "Protokol A" uygulandı (Döngü Şartları: 98 °C' de 10 dk 60 °C' de 150 dk)
- Toplama tüpüne takılı "DNA Purification Micro" kolona 400 µl "Binding Buffer" eklendi.
- Protokol A uygulanmış DNA örneğinin tamamı kolona aktarıldı ve pipetaj yapılarak "Binding Buffer" ile tamamen karışması sağlandı.
- Örnekler 12 000 rpm'de 30 sn santrifüj edildikten sonra toplama tüpü boşaltıldı ve kolon aynı toplama tüpüne geri yerleştirildi.
- Kolona 200 µl "Wash Buffer" eklendi ve 12 000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Sonrasında toplama tüpü boşaltıldı ve kolon aynı toplama tüpüne geri yerleştirildi.

- Kolona 200 µl “Desulfonation Buffer” eklendi ve oda sıcaklığında 20 dk bekletildi. Sonrasında 12.000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi ve toplama tüpü boşaltıldı. Kolon aynı toplama tüpüne geri yerleştirildi.
- Kolona 200 µl “Wash Buffer” eklendi ve 12 000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi. Sonrasında toplama tüpü boşaltıldı ve kolon aynı toplama tüpüne geri yerleştirildi.
- Son olarak kolona 200 µl daha “Wash Buffer” eklendi ve 12 000 rpm’de 60 sn santrifüj edildi.
- Kolon steril 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne takılıp kolonun tam merkezine gelecek şekilde 30 µl “Elution Buffer” eklendi ve 12 000 rpm’de 60 sn santrifüj edildi.
- 1.5 ml’lik tüp içerisinde elde edilen DNA örnekleri ölçümleri yapılabildiği kadar + 4 °C’de saklandı.
- Bütün örneklerin konsantrasyonları yukarıda belirtildiği şekilde ölçülerek 4 ng/µl olacak şekilde eşitlendi (bkz. Konsantrasyon ölçümü ve saflık belirleme). Farklı olarak DNA konsantrasyonlarının hesaplanması için $DNA\ konsantrasyonu\ (\mu g/ml) = Abs_{260} \times 33\ \mu g/ml \times (10\ mm/0.5\ mm)$ denklemi kullanıldı.

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Primerlerin bağlanma sıcaklıkları ile MgCl₂, primer ve DNA konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için PCR optimizasyonları yapıldı. Tablo 5’te verilen PCR programı kullanılarak bütün bileşenler için gerekli optimum koşullar ve konsantrasyonlar belirlendi.

Tablo 5. PCR programı

PCR Karışımı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	45 sn	
Bağlanma	*	30 sn	40
Uzama	72	30 sn	
Son Uzama	72	7 dk	1
İnkübasyon	4	∞	1

*: Her bir primer çifti için farklı bağlanma sıcaklığı denendi.

Her bir bölge için Tablo 6’da verilen reaksiyon içeriği, çeşitli DNA ve MgCl₂ konsantrasyonları ile farklı bağlanma sıcaklıklarında denendi.

Tablo 6. PCR karışımı

PCR Karışımı	Hacim (µl)	Final Konsantrasyonu
Tampon A (10 X)	2.5	1 X
Forward Primer (10 µM)	0.3	(5-20 pmol) 0.2 µM
Reverse Primer (10 µM)	0.3	(5-20 pmol) 0.2 µM
dNTP (25 mM)	0.4	0.4 mM
Taq Polimeraz (5 U/ µl)	0.5	2.5 U
MgCl ₂ (50 mM)	*	1-4.5 mM
DNA (10 ng/ µl)	1	5-50 ng
Su	**	-
Toplam Hacim	25 µl	

* : Her bir bölge için farklı MgCl₂ konsantrasyonu denendi.
** : Son hacim 25 µl olacak şekilde su eklendi.

3.2.5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Yapılan PCR optimizasyonlarının değerlendirilmesi ve PCR ürünlerinin beklenen büyüklükte olup olmadığının kontrolü için Poliakrilamid Jel Elektroforezi yapıldı.

Dikey Elektroforez Aparatlarının Hazırlanması

- Saf sudan geçirilip temizlenen cam plakalar kurutma kağıdı üzerinde dik bir şekilde bırakılarak kurutulması sağlandı.
- Kalın ve ince cam plakalar ortasında boşluk kalacak şekilde birleştirilip, sıkıştırma aparatı yardımıyla jel dökme standına yerleştirildi.

%10'luk Poliakrilamid Jelin Hazırlanması (2 Jel için)

- Su: 8.5 ml
Poliakrilamid (% 30): 5 ml
TBE (10 X): 1.5 ml
APS (% 25): 50 µl, alınarak beher içerisinde karıştırıldı.
- Hazırlanan karışımdan 1 ml alınarak 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Sonrasında üzerine 6 µl TEMED eklenerek karıştırıldı.
- Hazırlanan 1 ml'lik karışım hızlı bir şekilde plakaların arasına 0.5 ml olarak paylaştırıldı.

Not: Bu işlemin amacı hızlı donması sayesinde tabandan jel sızıntısını önlemektir.

- Cam plakaların tabanındaki jel polimerize olduğunda geriye kalan karışımın üzerine 15 µl TEMED ilave edildi ve homojen bir şekilde karışması sağlandı.
- Hızlı bir şekilde karışım enjektöre çekildi ve plakalar arasındaki boşluğa dolduruldu.
- Sonrasında taraklar kuyucuklarda kabarcık kalmamasına dikkat edilerek yerleştirildi.
- Jel donduktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılarak, cam plakalar 1 X elektroforez tamponu içerisine yerleştirildi.

PCR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi

- Örnekler 6X yükleme tamponu ile 5:1 (örnek:yükleme tamponu) oranında karıştırılıp jele yüklendi.

Örneklerin Jelde Yürütülmesi

- Örnekler 1 X TBE tamponu varlığında 100 V, 80 mA'de 50 dk süreyle yürütüldü.

Jelin Boyanması

- Elektroforez işlemi bittikten sonra cam plakalar arasından çıkarılan jel, boyama solüsyonu içerisinde 5 dk bekletildi. Sonrasında jel boyama solüsyonu içerisinden çıkartılıp fazla EtBr'ün uzaklaştırılması için 5 dk da saf su içerisinde bekletildi.

Jelin Görüntülenmesi

- Jel UV altında Jel dökümantasyon sisteminde görüntüledi.

Yapılan PCR optimizasyonlarının poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrollerinin sağlanmasından sonra her bir bölge için belirlenen bağlanma sıcaklığı ve MgCl₂ konsantrasyonları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Bütün bölgeler için primer koşulları

LINE-1 5' UTR Bölgesi	MgCl ₂ (mM)	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
1	4	52
2	3	50
3	3	58
4	3.5	56
5	2.25	50
6	3	54

3.2.6. Real Time PCR ve HRM Analizi

Primerlerin bağlanma sıcaklıklarının ve reaksiyon için gerekli $MgCl_2$ konsantrasyonlarının belirlenmesi sonrasında HRM analizi yapıldı. 6 bölgeye ayrılan LINE-1 geni 5' UTR kısmının metilasyon durumunun incelenmesi için öncelikle bu bölgeler Light Cycler 480 II (Roche) cihazında gerçek zamanlı PCR yapılarak çoğaltıldı. Sonrasında yüksek çözünürlüklü erime reaksiyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin erime eğrileri LightCycler 480 II SW 1.5.1 programı üzerinde "Gene Scanning" analiz metodu ile değerlendirildi.

Kontrol DNA'larının hazırlanması

Metilasyon durumu bilinmeyen örneklerin değerlendirilmesinin yapılabilmesi için metillenmiş DNA ve metile olmayan DNA örnekleri kontrol DNA olarak kullanıldı. Metile olmayan DNA, kültür ortamında DNMT1 (-/-) ve DNMT3b (-/-) DNA metiltransferazlarının genetik olarak mutasyona uğratıldığı insan HCT 116 DKO (kolon kanseri hücre hattı double knockout) hücrelerinden izole edilmiştir. Dolayısıyla bu hücrelerden elde edilen DNA CG dinükleotitlerinin hiç birinde metilasyon işareti bulundurmaz. Metile DNA ise kültür ortamında M.SssI metiltransferaz tarafından CG dinükleotitlerin hepsinin enzimatik olarak metillendiği insan HCT 1165 DKO hücrelerinden izole edilmiştir.

Yapılan bu çalışmada metile HCT 116 DKO DNA %100 metile kontrol ve metile olmayan HCT 116 DKO DNA ise %0 metile kontrol olarak kullanıldı. Bisüfit dönüşümü sonrasında bu DNA örnekleri belirli oranlarda karıştırılıp aşağıda verilen yüzdelik skala oluşturuldu. Sonrasında hazırlanan bu kontrol grupları her bir bölge için yapılan HRM analizi sırasında metilasyon durumu bilinmeyen örnekler ile birlikte analiz edildi.

%0 Metile DNA

%20 Metile DNA (1 birim %100 Metile DNA + 4 birim %0 Metile DNA)

%40 Metile DNA (2 birim %100 Metile DNA + 3 birim %0 Metile DNA)

%50 Metile DNA (1 birim %100 Metile DNA + 1 birim %0 Metile DNA)

%60 Metile DNA (3 birim %100 Metile DNA + 2 birim %0 Metile DNA)

%80 Metile DNA (4 birim %100 Metile DNA + 1 birim %0 Metile DNA)

%100 Metile DNA

Örneklerin Cihaza Yüklemesi ve Reaksiyonun Başlatılması

Metilasyon durumları bilinmeyen örnekler ile kontrol gruplarının gerçek zamanlı PCR ile çoğaltılması için Tablo 8’de verilen reaksiyon içeriği örnek sayısına göre hazırlanıp 96 Multiwell plate üzerindeki her bir kuyucuğa eşit hacimde dağıtıldı. Ardından örnekler, kontrol DNA’ları ve negatif kontrol (reaksiyon karışımı + su) plate üzerinde farklı kuyucuklara eklenerek cihaza yüklendi.

Tablo 8. Real time PCR karışımı

PCR Karışımı	Hacim (µl)	Final Konsantrasyonu
Master Mix (2X)	7.5	1 X
Forward Primer (10 µM)	0.3	0.2 µM
Reverse Primer (10 µM)	0.3	0.2 µM
MgCl ₂ (25 µM)	*	*
Su	**	**
DNA (4 ng/ µl)	1	4 ng
Toplam Hacim	15 µl	

* : Her bir bölge için Tablo 7’de verilen MgCl₂ konsantrasyonu kullanıldı.
** : Son hacim 15 µl olacak şekilde su eklendi.

Örnekler cihaza yüklendikten sonra LightCycler 480 SW 1.5.1 programına Tablo 9’da verilen değerler girilerek reaksiyon başlatıldı.

Tablo 9. Real time PCR programı (*)

Analiz Modu	Hedef (°C)	Süre	Döngü
İlk İnkübasyon	95	10 dk	1
Amplifikasyon	95	10 sn	40
	*	15 sn	
	72	10 sn	
Erime Eğrisi	95	1 dk	1
	40	1 dk	
	65	1 sn	
	95	-	
Soğutma	40	30 sn	1

*: Her bir primer çiftine ait bağlanma sıcaklığı Tablo 7’de verilmiştir.

Veri Analizi

Çalışma tamamlandığında, erime eğrilerinin analizi, LightCycler 480 II SW 1.5.1 programı üzerinde analiz metodların biri olan “Gene Scanning” modülü ile gerçekleştirildi. Sırasıyla aşağıdaki basamaklar her bir bölge için tekrarlanarak, referans eğriler (kontrol grubu) ile metilasyon seviyesi bilinmeyen örneklerin erime eğrileri karşılaştırılarak değerlendirildi.

- HRM analizi ile ilk olarak elde edilen ham veriler “Normalization” kısmında denatürasyonun başladığı ve bittiği sıcaklıkların manuel olarak belirlenmesi ile normalize eğrilere dönüştürüldü.
- Bu aşamada ilk olarak kontrol gruplarının eğrileri normalize edildi ve yüzde metilasyon değerine göre beklenen T_m (denatürasyon fazının orta noktası) sıcaklığında olup olmadıkları kontrol edildi.
- Sonrasında kontrol gruplarının eğrileri “Difference Plot” kısmında %0 metile kontrol, taban eğri (base curve) seçilerek incelendi. Bu kısımda elde edilen piklerin yüzde metilasyon değerine göre doğru sıralamada yer alıp almadıkları kontrol edildi.
- Daha sonra bütün örneklerin eğrileri ortaya çıkarılıp metilasyon seviyelerine göre kontrol grupları aralarına düştüğü gözlemlendi.
- Metilasyon seviyeleri bilinmeyen örneklerin yüzde metilasyon değerlerine ulaşmak için “Difference Plot” kısmındaki veriler Excel’e aktarıldı.
- Yüzde metilasyon değerleri bilinen kontrol gruplarına ait eğrilerin tepe noktasına denk gelen sıcaklık değeri belirlendi. Sonrasında belirlenen sıcaklığa karşılık gelen bağıl sinyal farkı (relative signal difference) kontrol grubundaki her bir örnek için belirlenip pik yüksekliği olarak not edildi.
- Metilasyon değeri bilinmeyen örneklerin yüzde metilasyon değerlerini belirleyebilmek için “Linear Regression” analizi ile standart eğri oluşturuldu. Bunun için kontrol grubundaki her bir örneğin metilasyon değeri (%0-20-40-50-60-80-100) yatay eksen koordinatı için ve bu değerlere karşılık gelen pik yüksekliği ise dikey eksen koordinatı için kullanıldı (x: metilasyon değeri, y: pik yüksekliği).
- Lineer regresyon analizi sonucunda elde edilen Determinasyon (belirlilik) Katsayısı (R^2), deneysel verilerin doğrusal bir eğriye ne kadar iyi uyduğunun göstergesi olduğundan metilasyon değerleri hesaplanmadan önce 1’e eşit veya yakın değerde olup olmadığı kontrol edildi.

- Sonrasında elde edilen grafiğin eğim denklemleri kullanılarak her bir örneğe ait pik yüksekliğinin standart eğri ile karşılaştırıldığı noktaya denk gelen yüzde oran, metilasyon değeri olarak kabul edildi.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

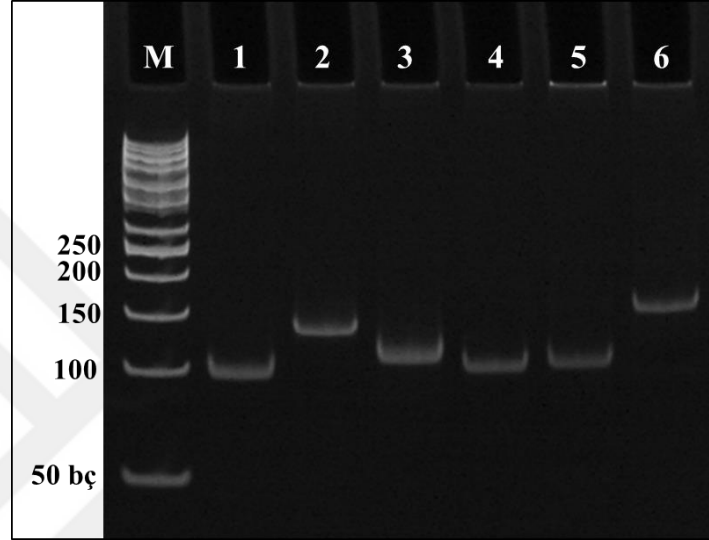
Elde edilen verilerin analizleri SPSS 25.0 programı kullanılarak yapıldı. LINE-1 metilasyon seviyesi bakımından oluşturulan iki grup arasındaki farklılıkların karşılaştırılması için Student T veya Mann-Whitney U Testi kullanıldı. $p < 0.05$ olduğunda farklılık istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. PCR Optimizasyon Çalışmaları

Yapılan PCR denemeleri sonucunda her bir bölgede kullanılan primerler için optimum koşullar belirlendi. Bu koşullarda her bir bölge için gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen ürünlerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü Resim 1’de gösterilmiştir.



Resim 1. LINE-1 5’ UTR’ye ait bölgelerin PCR amplifikasyonlarına ait poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü (M; 50 bç DNA Ladder, 1; 1. bölge (94 bç), 2; 2. bölge (131 bç), 3; 3. bölge (105 bç), 4; 4. bölge (98 bç), 5; 5. bölge (100), 6; 6. bölge (149 bç)).

4.2. Hastalara Ait Klinikopatolojik Özellikler

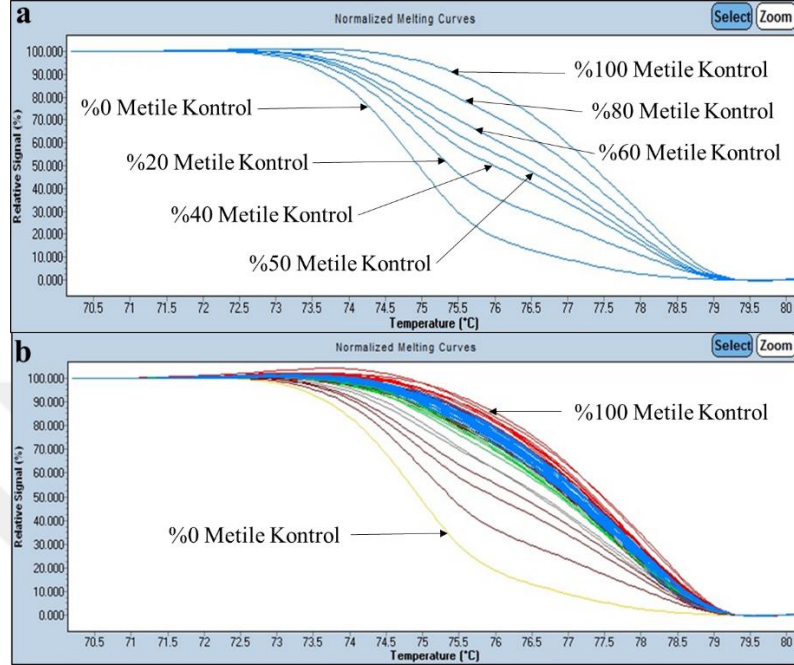
Kolorektal kanserde LINE-1 5’ UTR hipometilasyonunun incelendiği bu çalışmada 30 hastaya ait klinikopatolojik özellikler Tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 10. Hastalara ait klinikopatolojik özellikler

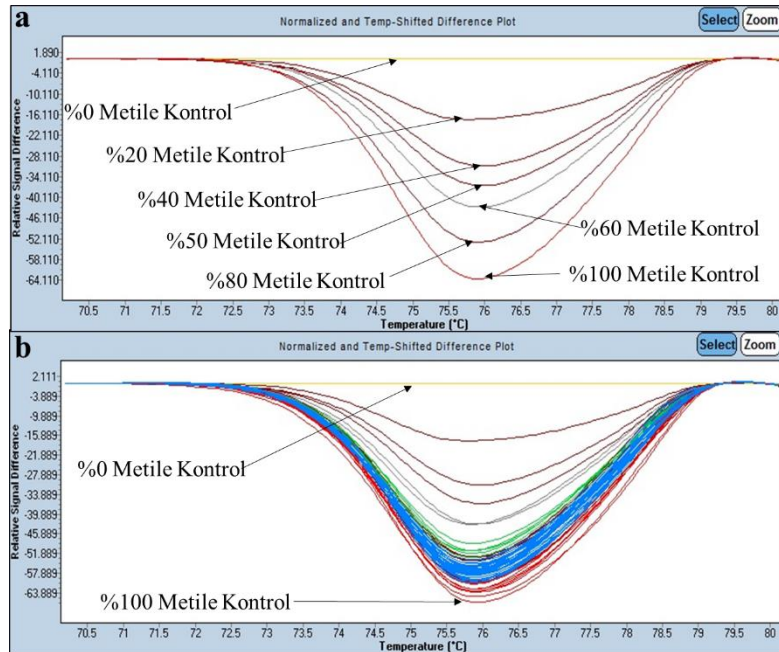
Özellikler	Hasta Sayısı	
Yaş	<65	15
	≥65	15
Cinsiyet	Kadın	16
	Erkek	14
Tümör Evresi	Evre II	17
	Evre III	13
Tümör Lokalizasyonu	Sağ Kolon	13
	Sol Kolon	17

4.3. LINE-1 5' UTR 1. Bölgede Saptanan Bulgular

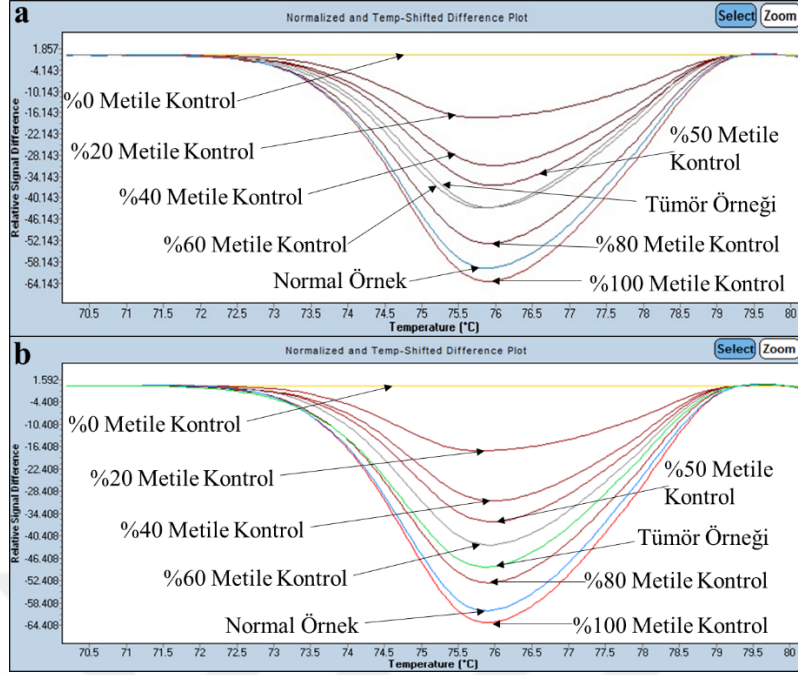
Veri analizi sırasında elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir (Resim 2-4).



Resim 2. LINE-1 5' UTR 1. bölgeye ait normalize erime eğrileri. (a) Kontrol grubuna ait normalize erime eğrileri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örneklere ait normalize erime eğrileri.

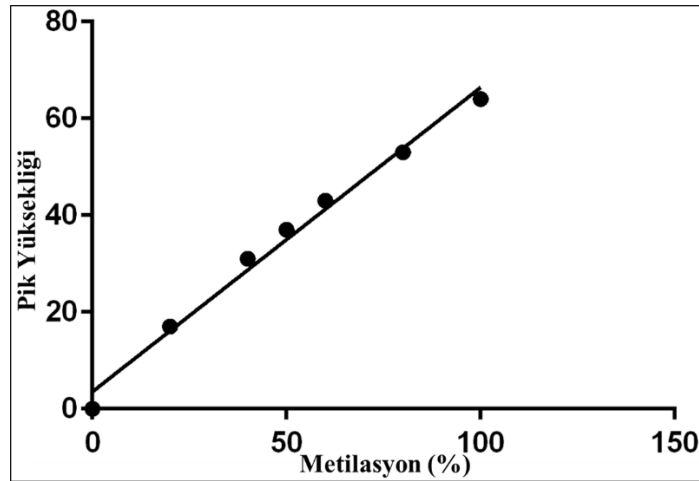


Resim 3. LINE-1 5' UTR 1. bölgeye ait fark grafikleri. (a) Kontrol grubuna ait fark grafikleri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örneklere ait fark grafikleri.



Resim 4. LINE-1 5' UTR 1. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri. (a) 19 numaralı hastaya ait fark grafikleri. (b) 6 numaralı hastaya ait fark grafikleri.

“Difference plot” kısmından Excel’e aktarılan veriler kullanılarak yapılan Lineer Regresyon analizi sonucu elde edilen standart eğri Şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8. LINE-1 5' UTR 1. bölgeye ait standart eğri ($Y = 0.2613X + 0.7927$, X:Metilasyon (%), Y: Pik Yüksekliği, $R^2 = 0.994$).

4.4. LINE-1 5' UTR 1. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri

30 hastaya ait normal ve tümörlü dokuların metilasyon seviyeleri Tablo 11'de gösterilmiştir. Tümörlü dokular normal dokulara göre daha düşük bir metilasyon seviyesi göstermiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 11. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 1. bölgeye ait metilasyon değerleri

	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri
Normal	30	89.70 ± 5.02	<0.0001
Tümör	30	81.53 ± 7.61	

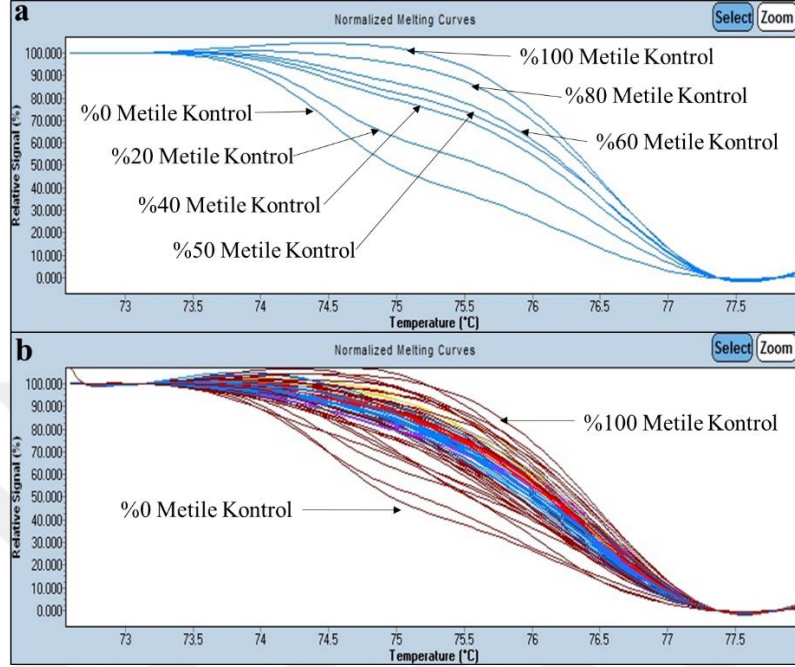
30 hastaya ait tümörlü dokulardaki metilasyon seviyeleri ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki Tablo 12'de gösterilmiştir. Hastaların yaşı, cinsiyeti, tümör evresi ve tümör lokalizasyonu ile LINE-1 1. bölge arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 12. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 1. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki

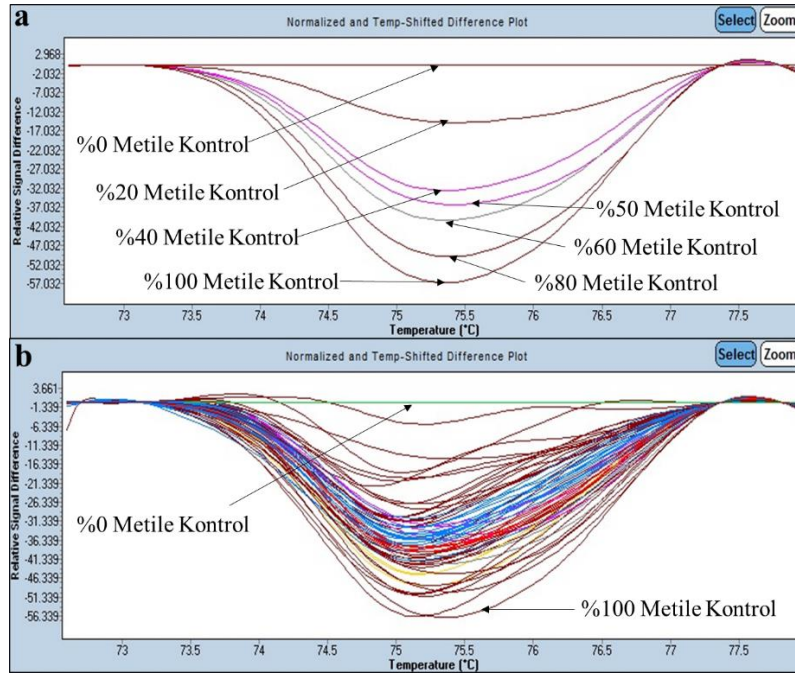
Özellikler	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri	
Yaş	<65	15	79.93 ± 5.94	0.256
	≥65	15	83.13 ± 8.89	
Cinsiyet	Kadın	16	83.44 ± 6.41	0.145
	Erkek	14	79.36 ± 8.49	
Tümör Evresi	Evre II	17	81.76 ± 7.31	0.852
	Evre III	13	81.23 ± 8.26	
Tümör Lokalizasyonu	Sağ Kolon	13	83.38 ± 8.30	0.250
	Sol Kolon	17	80.12 ± 6.95	

4.5. LINE-1 5' UTR 2. Bölgede Saptanan Bulgular

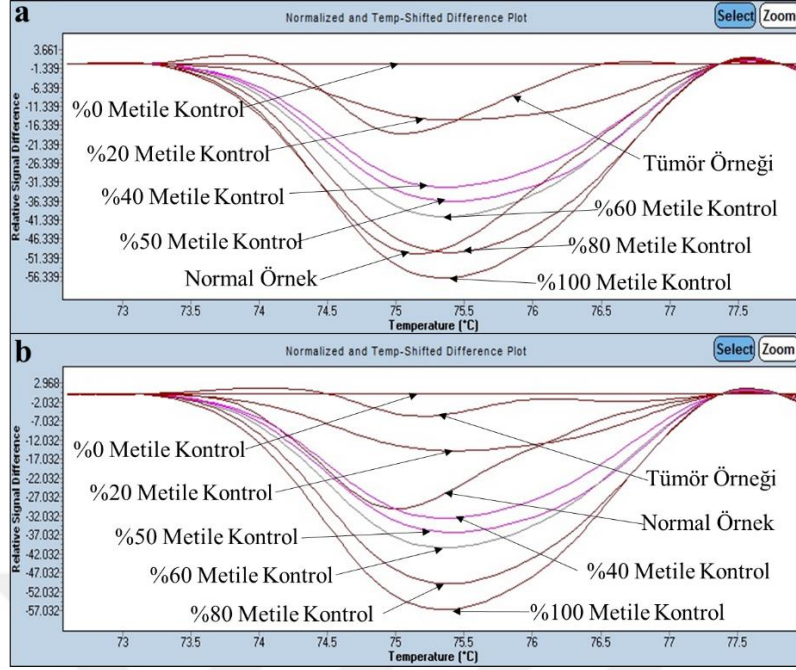
Veri analizi sırasında elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir (Resim 5-7).



Resim 5. LINE-1 5' UTR 2. bölgeye ait normalize erime eğrileri. (a) Kontrol grubuna ait normalize erime eğrileri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örneklerle ait normalize erime eğrileri.

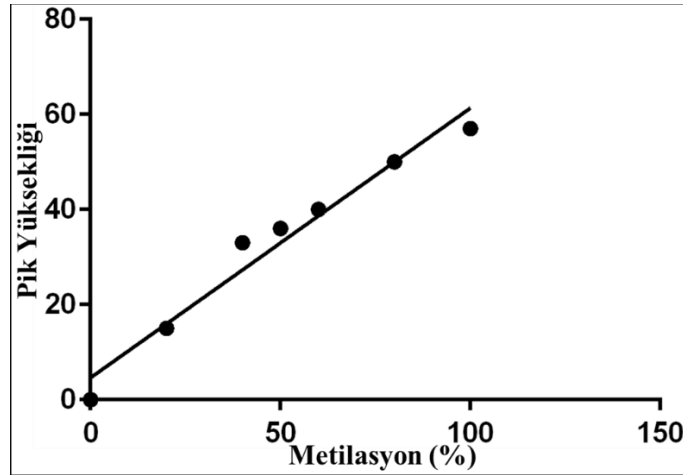


Resim 6. LINE-1 5' UTR 2. bölgeye ait fark grafikleri. (a) Kontrol grubuna ait fark grafikleri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örneklerle ait fark grafikleri.



Resim 7. LINE-1 5' UTR 2. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri. (a) 29 numaralı hastaya ait fark grafikleri. (b) 19 numaralı hastaya ait fark grafikleri.

Difference plot kısmından Excel'e aktarılan veriler kullanılarak yapılan Lineer Regresyon Analizi sonucu elde edilen standart eğri Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. LINE-1 5' UTR 2. bölgeye ait standart eğri ($Y = 0.5671X + 4.6429$, X: Metilasyon (%), Y: Pik Yüksekliği, $R^2 = 0.9639$).

4.6. LINE-1 5' UTR 2. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri

30 hastaya ait normal ve tümörlü dokuların metilasyon seviyeleri Tablo 13'te gösterilmiştir. Tümörlü dokular normal dokulara göre daha düşük bir metilasyon seviyesi göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 13. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 2. bölgeye ait metilasyon değerleri

	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri
Normal	30	58.30 ± 13.99	0.213
Tümör	30	52.77 ± 19.59	

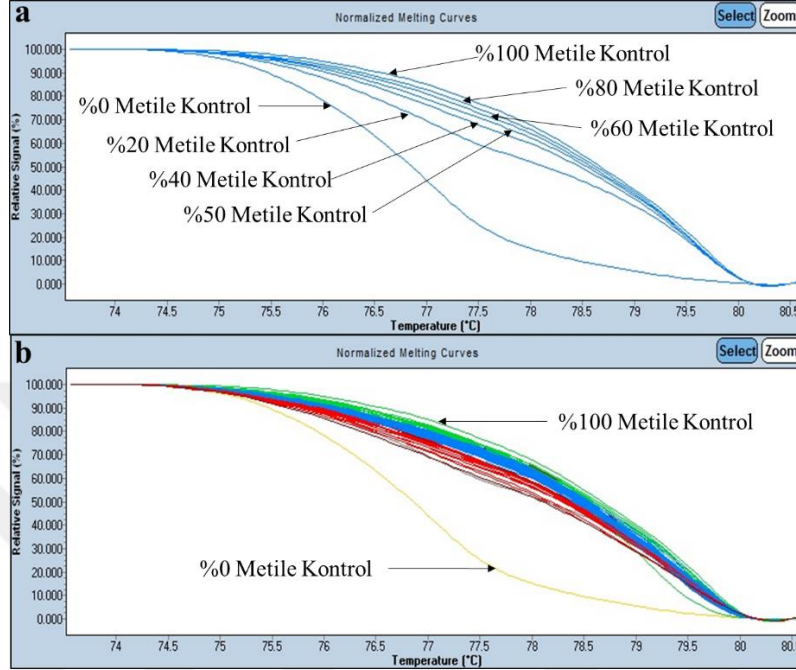
30 hastaya ait tümörlü dokulardaki metilasyon seviyeleri ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki Tablo 14'te gösterilmiştir. Hastaların yaşı, cinsiyeti, tümör evresi ve tümör lokalizasyonu ile LINE-1 2. bölge arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 14. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 2. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki

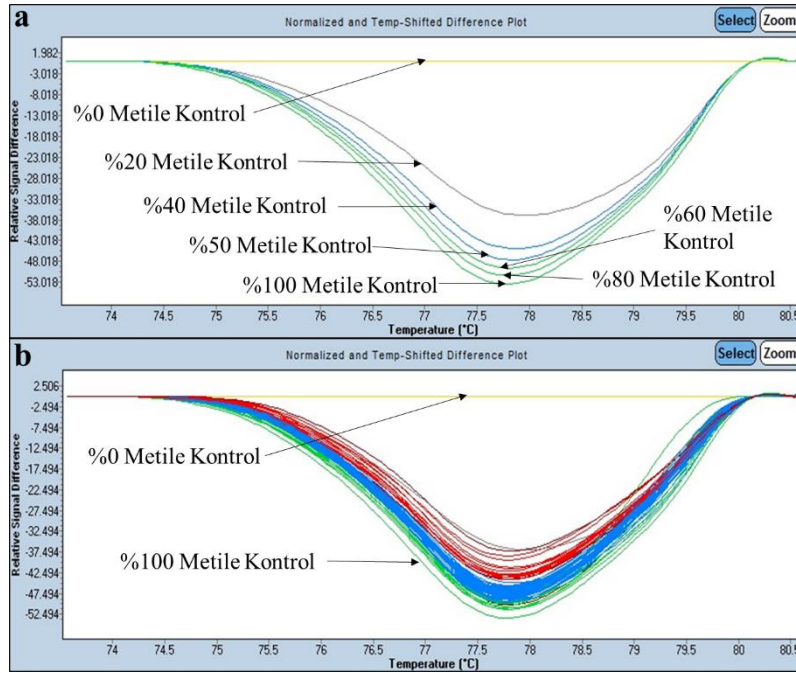
Özellikler	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri	
Yaş	<65	15	56.67 ± 20.59	0.283
	≥65	15	48.87 ± 18.40	
Cinsiyet	Kadın	16	56.56 ± 21.04	0.263
	Erkek	14	48.43 ± 17.54	
Tümör Evresi	Evre II	17	53.35 ± 19.58	0.855
	Evre III	13	52.00 ± 20.38	
Tümör Lokalizasyonu	Sağ Kolon	13	50.92 ± 16.05	0.660
	Sol Kolon	17	54.18 ± 22.31	

4.7. LINE-1 5' UTR 3. Bölgede Saptanan Bulgular

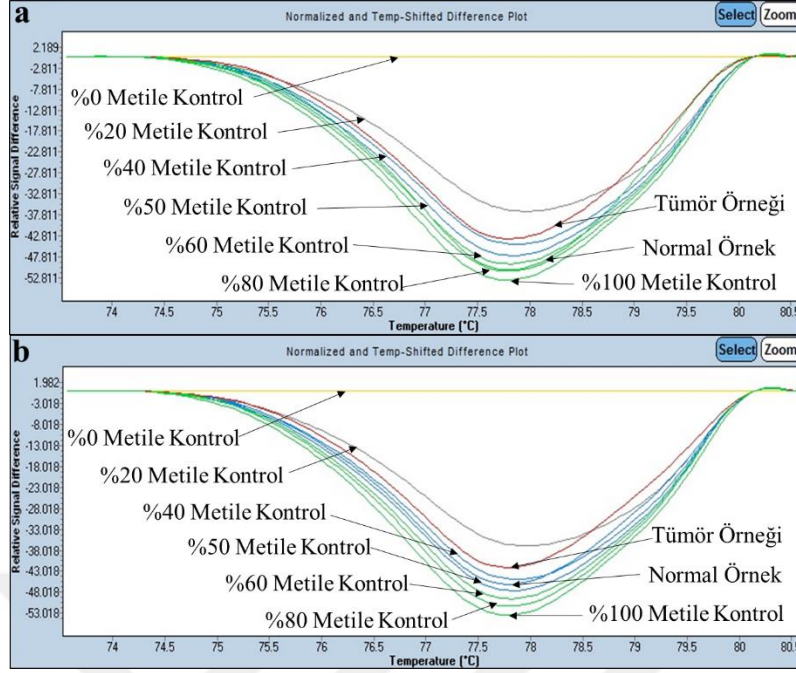
Veri analizi sırasında elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir (Resim 8-10).



Resim 8. LINE-1 5' UTR 3. bölgeye ait normalize erime eğrileri. (a) Kontrol grubuna ait normalize erime eğrileri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örnekler için normalize erime eğrileri.

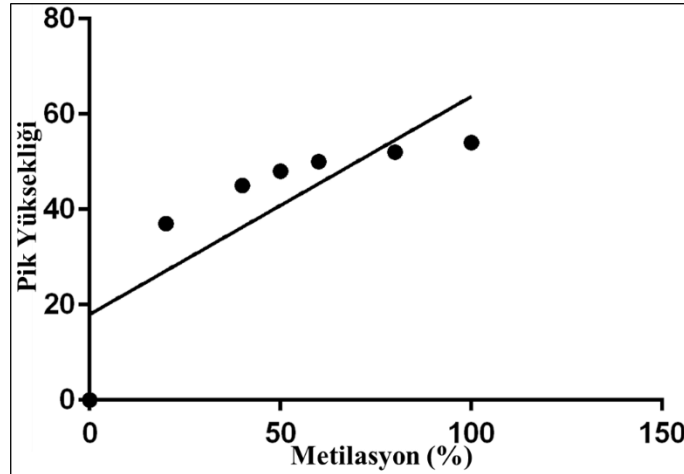


Resim 9. LINE-1 5' UTR 3. bölgeye ait fark grafikleri. (a) Kontrol grubuna ait fark grafikleri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örnekler için fark grafikleri.



Resim 10. LINE-1 5' UTR 3. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri. **(a)** 19 numaralı hastaya ait fark grafikleri. **(b)** 28 numaralı hastaya ait fark grafikleri.

Difference plot kısmından Excel'e aktarılan veriler kullanılarak yapılan Lineer Regresyon Analizi sonucu elde edilen standart eğri Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. LINE-1 5' UTR 3. bölgeye ait standart eğri ($Y = 0.4571X + 18$, X: Metilasyon (%), Y: Pik Yüksekliği, $R^2 = 0.6859$).

4.8. LINE-1 5' UTR 3. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri

30 hastaya ait normal ve tümörlü dokuların metilasyon seviyeleri Tablo 15'te gösterilmiştir. Tümörlü dokular normal dokulara göre daha düşük bir metilasyon seviyesi göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 15. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 3. bölgeye ait metilasyon değerleri

	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri
Normal	30	64.27 ± 6.21	0.063
Tümör	30	60.87 ± 7.63	

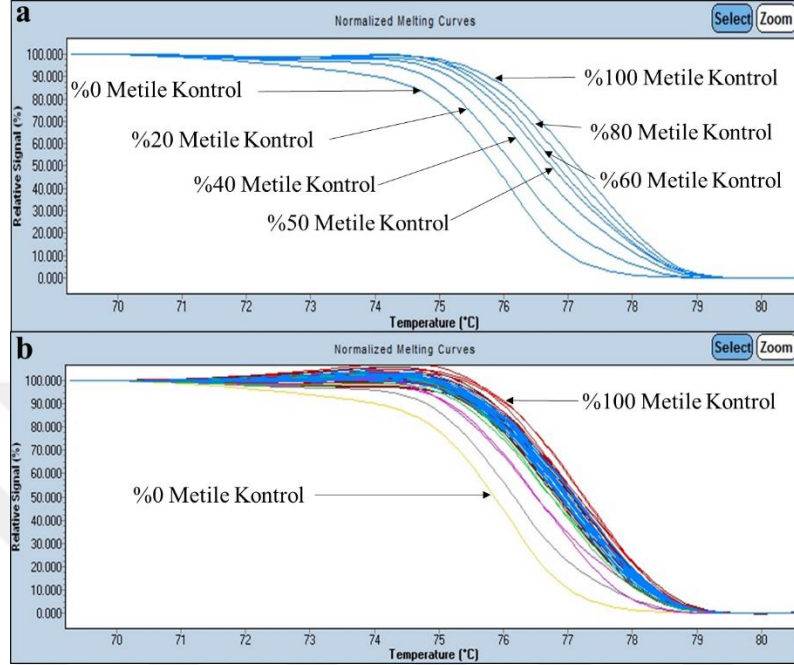
30 hastaya ait tümörlü dokulardaki metilasyon seviyeleri ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki Tablo 16'da gösterilmiştir. Hastaların yaşı, cinsiyeti, tümör evresi ve tümör lokalizasyonu ile LINE-1 3. bölge arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 16. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 3. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki

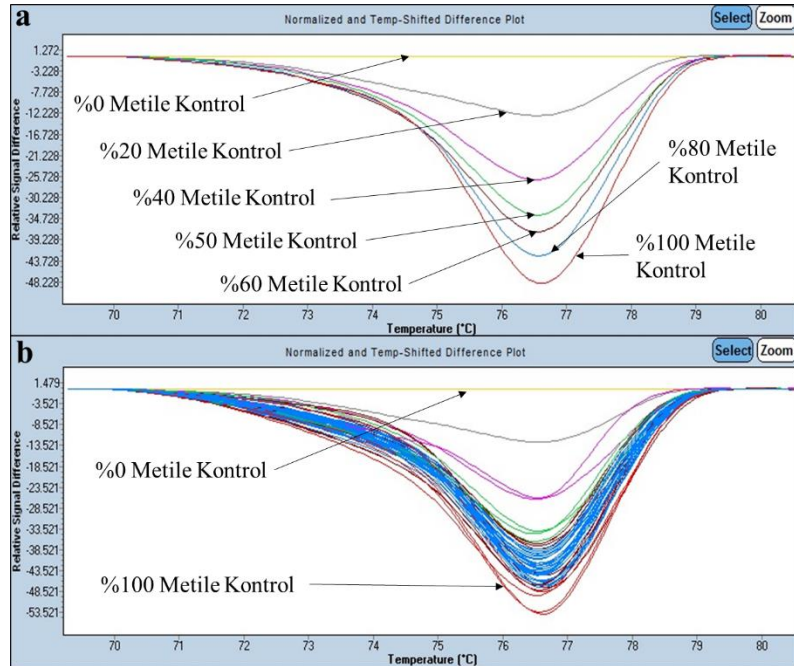
Özellikler	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri	
Yaş	<65	15	58.53 ± 7.53	0.094
	≥65	15	63.20 ± 7.22	
Cinsiyet	Kadın	16	60.69 ± 7.50	0.893
	Erkek	14	61.07 ± 8.05	
Tümör Evresi	Evre II	17	61.35 ± 8.23	0.697
	Evre III	13	60.23 ± 7.03	
Tümör Lokalizasyonu	Sağ Kolon	13	62.15 ± 7.29	0.428
	Sol Kolon	17	59.88 ± 7.96	

4.9. LINE-1 5' UTR 4. Bölgede Saptanan Bulgular

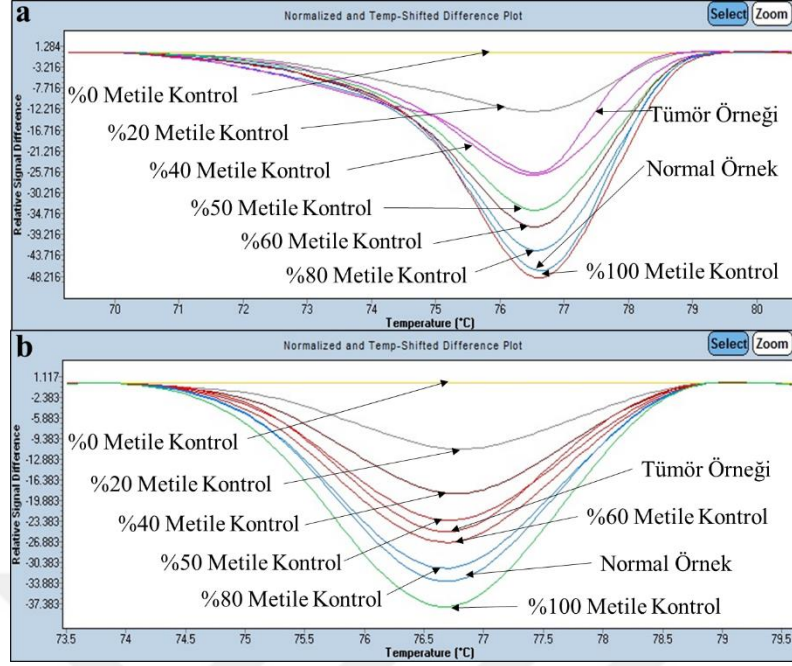
Veri analizi sırasında elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir (Resim 11-13).



Resim 11. LINE-1 5' UTR 4. bölgeye ait normalize erime eğrileri. (a) Kontrol grubuna ait normalize erime eğrileri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örneklerle ait normalize erime eğrileri.

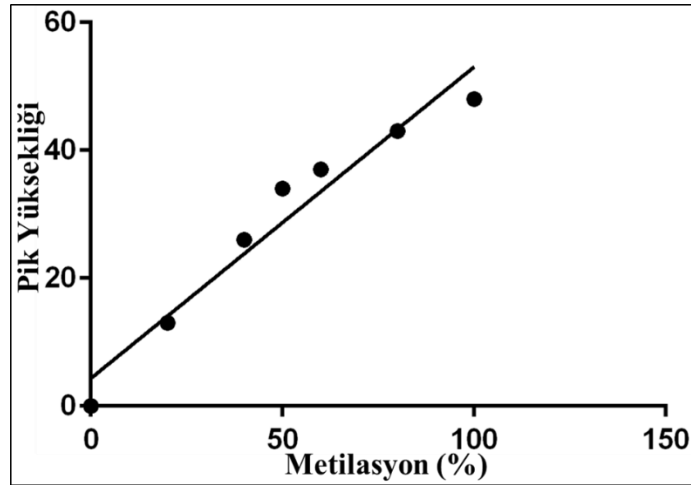


Resim 12. LINE-1 5' UTR 4. bölgeye ait fark grafikleri. (a) Kontrol grubuna ait fark grafikleri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örneklerle ait fark grafikleri.



Resim 13. LINE-1 5' UTR 4. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri. **(a)** 28 numaralı hastaya ait fark grafikleri. **(b)** 6 numaralı hastaya ait fark grafikleri.

Difference plot kısmından Excel'e aktarılan veriler kullanılarak yapılan Lineer Regresyon Analizi sonucu elde edilen standart eğri Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. LINE-1 5' UTR 4. bölgeye ait standart eğri ($Y = 0.4871X + 4.3571$, X: Metilasyon (%), Y: Pik Yüksekliği, $R^2 = 0.9485$).

4.10. LINE-1 5' UTR 4. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri

30 hastaya ait normal ve tümörlü dokuların metilasyon seviyeleri Tablo 17'de gösterilmiştir. Tümörlü dokular normal dokulara göre daha düşük bir metilasyon seviyesi göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 17. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 4. bölgeye ait metilasyon değerleri

	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri
Normal	30	81.57 ± 8.68	0.054
Tümör	30	76.27 ± 11.92	

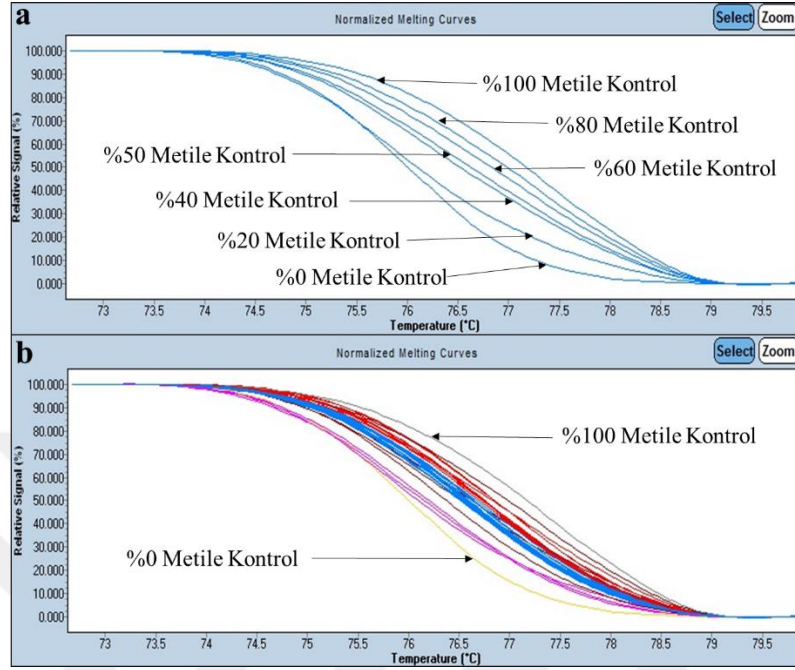
30 hastaya ait tümörlü dokulardaki metilasyon seviyeleri ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki Tablo 18'de gösterilmiştir. Hastaların yaşı, cinsiyeti, tümör evresi ve tümör lokalizasyonu ile LINE-1 4. bölge arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 18. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 4. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki

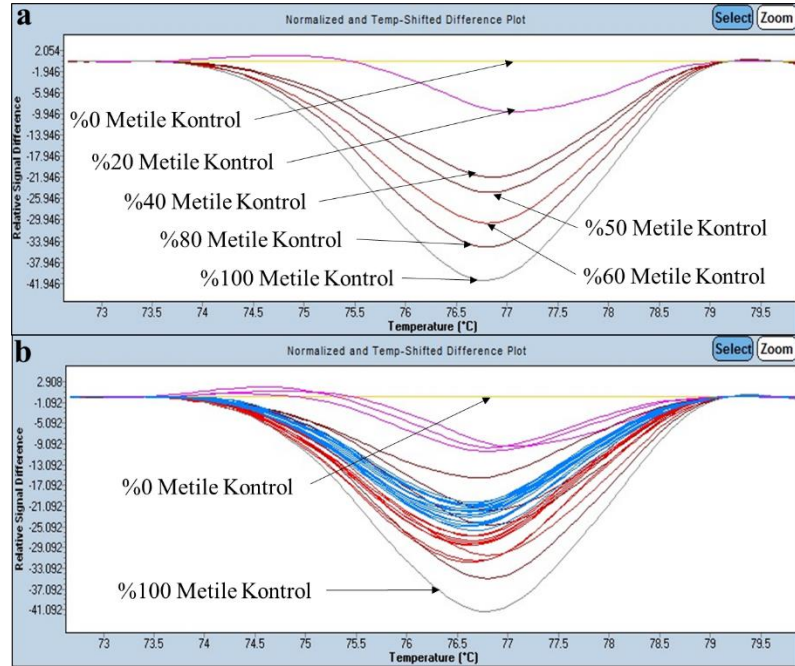
Özellikler	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri	
Yaş	<65	15	75.47 ± 11.57	0.720
	≥65	15	77.07 ± 12.61	
Cinsiyet	Kadın	16	78.31 ± 13.90	0.323
	Erkek	14	73.93 ± 9.11	
Tümör Evresi	Evre II	17	75.35 ± 10.42	0.640
	Evre III	13	77.46 ± 14.00	
Tümör Lokalizasyonu	Sağ Kolon	13	77.46 ± 7.62	0.640
	Sol Kolon	17	75.35 ± 14.56	

4.11. LINE-1 5' UTR 5. Bölgede Saptanan Bulgular

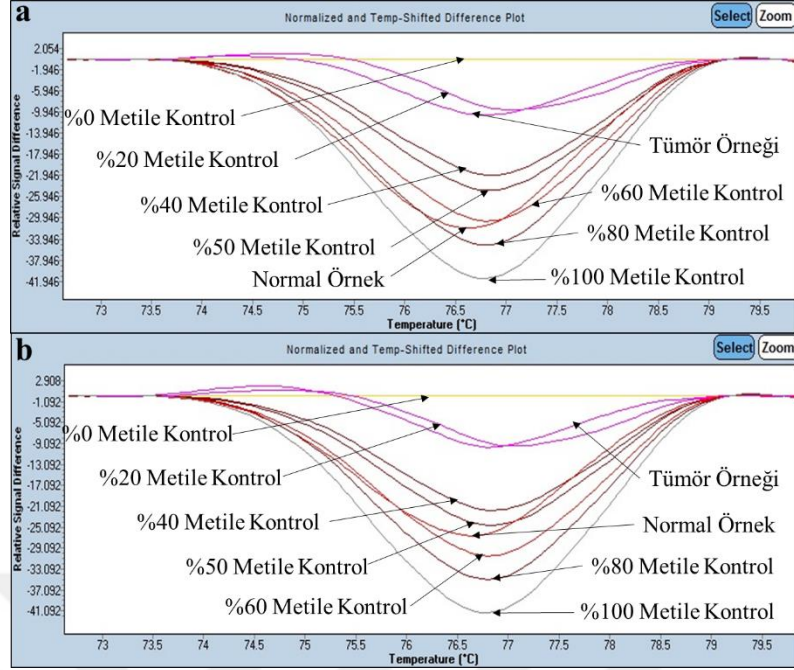
Veri analizi sırasında elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir (Resim 14-16).



Resim 14. LINE-1 5' UTR 5. bölgeye ait normalize erime eğrileri. (a) Kontrol grubuna ait normalize erime eğrileri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örneklerle ait normalize erime eğrileri.

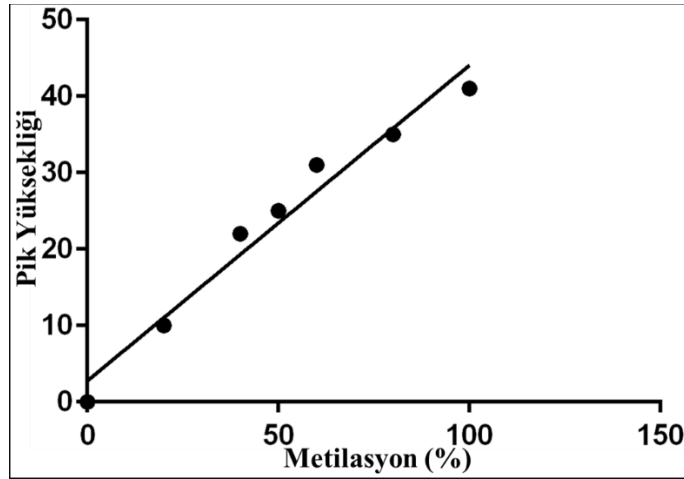


Resim 15. LINE-1 5' UTR 5. bölgeye ait fark grafikleri. (a) Kontrol grubuna ait fark grafikleri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örneklerle ait fark grafikleri.



Resim 16. LINE-1 5' UTR 5. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri. **(a)** 28 numaralı hastaya ait fark grafikleri. **(b)** 29 numaralı hastaya ait fark grafikleri.

Difference plot kısmından Excel'e aktarılan veriler kullanılarak yapılan Lineer Regresyon Analizi sonucu elde edilen standart eğri Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. LINE-1 5' UTR 5. bölgeye ait standart eğri ($Y = 0.4129X + 2.7857$, X:Metilasyon (%), Y: Pik Yüksekliği, $R^2 = 0.9671$).

4.12. LINE-1 5' UTR 5. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri

30 hastaya ait normal ve tümörlü dokuların metilasyon seviyeleri Tablo 19'da gösterilmiştir. Tümörlü dokular normal dokulara göre daha düşük bir metilasyon seviyesi göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 19. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 5. bölgeye ait metilasyon değerleri

	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri
Normal	30	66.93 ± 15.84	0.078
Tümör	30	59.53 ± 16.09	

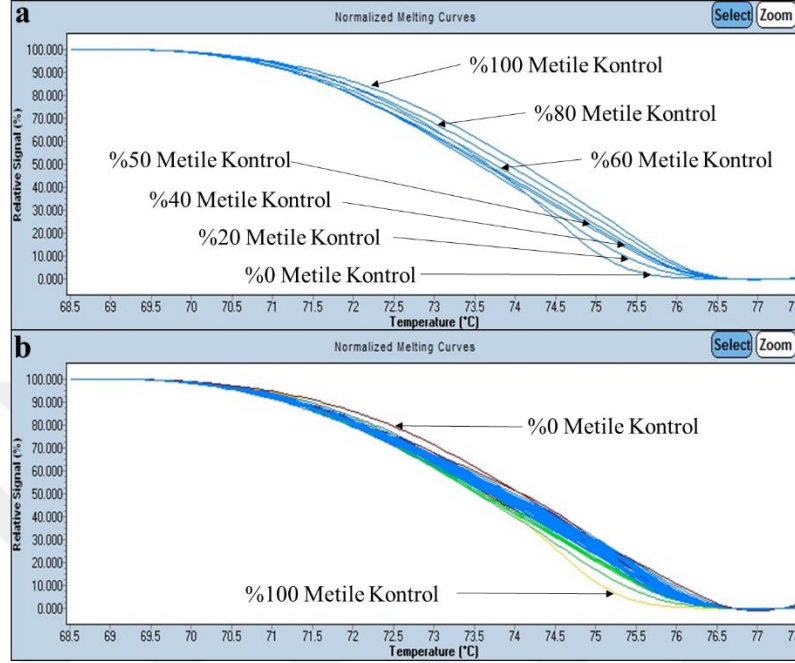
30 hastaya ait tümörlü dokulardaki metilasyon seviyeleri ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki Tablo 20'de gösterilmiştir. Hastaların yaşı, cinsiyeti, tümör evresi ve tümör lokalizasyonu ile LINE-1 5. bölge arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 20. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 5. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki

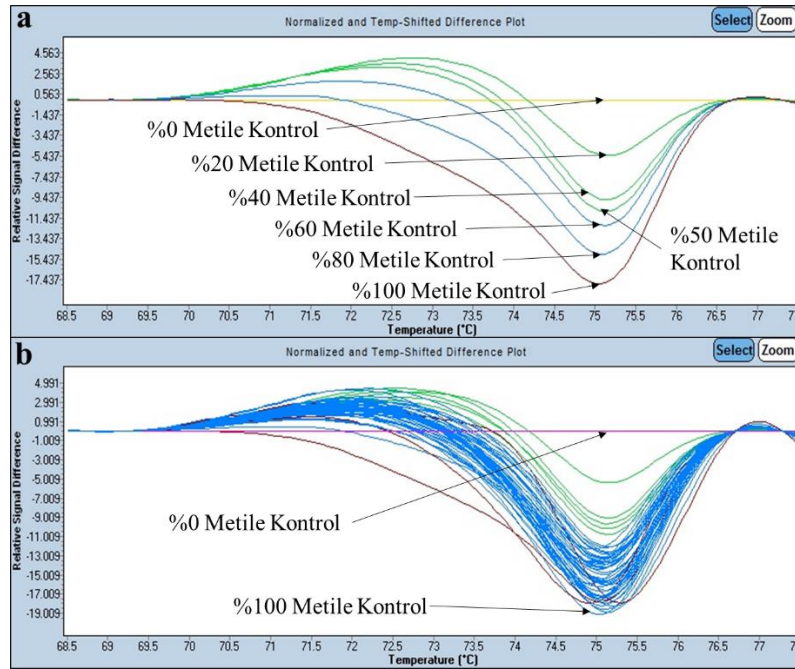
Özellikler	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri	
Yaş	<65	15	55.33 ± 14.57	0.156
	≥65	15	63.73 ± 16.91	
Cinsiyet	Kadın	16	62.88 ± 18.51	0.230
	Erkek	14	55.71 ± 12.34	
Tümör Evresi	Evre II	17	59.65 ± 11.65	0.965
	Evre III	13	59.38 ± 21.08	
Tümör Lokalizasyonu	Sağ Kolon	13	63.00 ± 13.83	0.310
	Sol Kolon	17	56.88 ± 17.56	

4.13. LINE-1 5' UTR 6. Bölgede Saptanan Bulgular

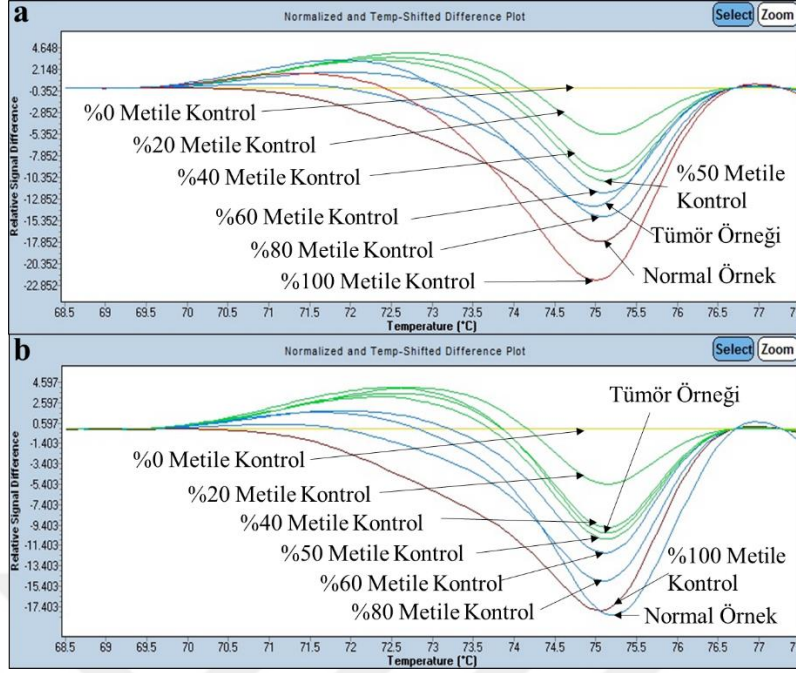
Veri analizi sırasında elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir (Resim 17-19).



Resim 17. LINE-1 5' UTR 6. bölgeye ait normalize erime eğrileri. (a) Kontrol grubuna ait normalize erime eğrileri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örneklerle ait normalize erime eğrileri.

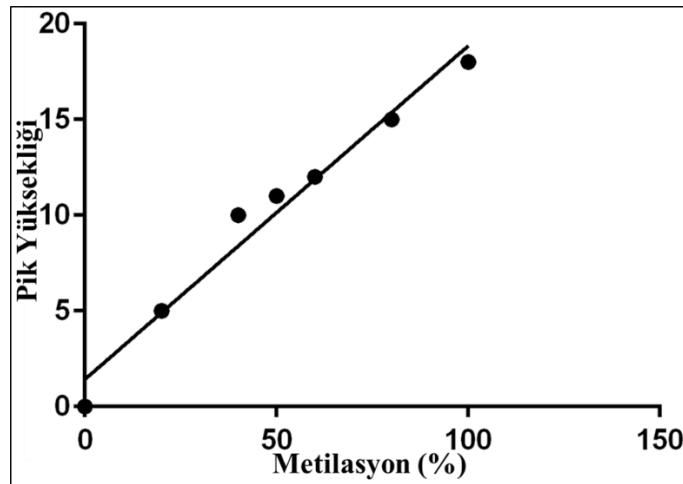


Resim 18. LINE-1 5' UTR 6. bölgeye ait fark grafikleri. (a) Kontrol grubuna ait fark grafikleri. (b) Kontrol grubuna ve bütün örneklerle ait fark grafikleri.



Resim 19. LINE-1 5' UTR 6. bölgedeki kontrol grubu ile bir hastaya ait normal ve tümör örneğinin fark grafikleri. (a) 19 numaralı hastaya ait fark grafikleri. (b) 7 numaralı hastaya ait fark grafikleri.

Difference plot kısmından Excel'e aktarılan veriler kullanılarak yapılan Lineer Regresyon Analizi sonucu elde edilen standart eğri Şekil 13'de gösterilmiştir.



Şekil 13. LINE-1 5' UTR 6. bölgeye ait standart eğri ($Y = 0.1743X + 1.4286$, X: Metilasyon (%), Y: Pik Yüksekliği, $R^2 = 0.9715$).

4.14. LINE-1 5' UTR 6. Bölgedeki Metilasyon Seviyelerinin İstatistiksel Verileri

30 hastaya ait normal ve tümörlü dokuların metilasyon seviyeleri Tablo 21'de gösterilmiştir. Tümörlü dokular normal dokulara göre daha düşük bir metilasyon seviyesi göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 21. Normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 6. bölgeye ait metilasyon değerleri

	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri
Normal	30	84.23 ± 12.90	0.136
Tümör	30	78.37 ± 16.90	

30 hastaya ait tümörlü dokulardaki metilasyon seviyeleri ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki Tablo 22'de gösterilmiştir. Hastaların yaşı, cinsiyeti, tümör evresi ve tümör lokalizasyonu ile LINE-1 6. bölge arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 22. Tümörlü dokulardaki LINE-1 5' UTR 6. bölgeye ait metilasyon seviyesi ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki

Özellikler	Örnek Sayısı	% Metilasyon Ortalaması	<i>p</i> değeri	
Yaş	<65	15	75.13 ± 15.33	0.303
	≥65	15	81.60 ± 18.27	
Cinsiyet	Kadın	16	79.44 ± 18.78	0.715
	Erkek	14	77.14 ± 15.07	
Tümör Evresi	Evre II	17	77.76 ± 19.55	0.828
	Evre III	13	79.15 ± 13.38	
Tümör Lokalizasyonu	Sağ Kolon	13	84.46 ± 14.12	0.084
	Sol Kolon	17	73.71 ± 17.74	

5. TARTIŞMA

Dünya çapında görülme sıklığı açısından üçüncü sırada ve kanser kaynaklı ölümlerde ikinci sırada yer alan kolorektal kanser, genetik ve epigenetik değişikliklerin aşamalı olarak birikmesi sonucu meydana gelmektedir (Ogino vd., 2008; Sadanandam vd., 2013). Bu epigenetik değişikliklerden biri olan DNA hipometilasyonu, çoğunlukla genom içinde hareket edebilen tekrar dizilerinde meydana gelmektedir. Genomun yaklaşık %17'sini oluşturan LINE-1 tekrar dizileri normalde hareket yeteneğini kısıtlayan promotor bölgesi metilasyonlarına sahiptir. Hipometilasyon durumunda promotor bölgesinin aktif hale gelmesi ile LINE-1 dizileri hareket yeteneği kazanıp genom içerisinde farklı bölgelere yerleşirler. Bu durum onkogenlerin ekspresyon düzeyinde artışa ve tümör baskılayıcı genlerde inaktivasyona neden olarak kanser gibi birçok genetik hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynayan genomik kararsızlığa neden olur (Babushok ve Kazazian, 2007; Iskow vd., 2010; Ostertag ve Kazazian, 2001; Wolf vd., 2010).

Günümüzde metilasyon analizi için MSP (Methylation Specific PCR), COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analyse), MethyLight, Pirosekanslama gibi birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Son zamanlarda geliştirilmiş olan HRM analizinde ise amplifikasyon ile erime eğrisi aynı tüp içerisinde gerçekleştirildiğinden sonrasında amplikonları saflaştırmaya veya ayırmaya gerek kalmaz. Böylece jel elektroforezi gibi PCR sonrasındaki ek yöntemlere gerek duyulmadan daha ucuz, hızlı, az zahmetli ve yüksek numune verimi ile sonuç alınır. Ayrıca, analizlerin kapalı bir sistemde yapılması, kontaminasyon ve tahribat riskini azaltır; gerek duyulduğunda örneğin jel elektroforezi veya dizileme ile sonradan analizinin yapılmasına olanak sağlar (Vossen vd., 2009).

Yapılan bu çalışmada, 37 adet CG dinükleotidi içeren yaklaşık 900 nükleotit uzunluğundaki LINE-1 5' UTR kısmının, kolorektal kanserli hastaların kanserli ve sağlıklı dokularından elde edilen DNA örneklerinde HRM analizi yapılarak metilasyon değişimlerinin ve kolorektal kanserin tespitinde kullanılabilecek uygun LINE-1 bölgesini/bölgelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla 6 bölgeye ayrılan LINE-1 5' UTR içerisindeki CG dinüklotit bölgelerini amplifiye edecek 6 çift primer tasarlanıp PCR optimizasyonları yapıldı. Her bir hastaya ait normal kolon dokusundan ve tümörlü dokudan izole edilen DNA örnekleri ve kontrol DNA'ları kullanılarak, hedeflenen 6 bölge için LightCycler 480 II cihazında tasarlanan primerler yardımı ile önce

amplifikasyon işlemi gerçekleştirilip sonrasında ise HRM analizi yapıldı. Gene Scanning programı üzerinde elde edilen hastalara ait erime eğrileri, kontrol DNA'larının erime eğrileri ile kıyaslanarak hastalara ait normal ve tümörlü dokunun metilasyon değerleri belirlendi. Belirlenen metilasyon değerleri istatistiksel olarak değerlendirilerek anlamlı sonuç veren bölge/bölgelerin tespit edilmesi hedeflendi.

Literatür taraması yapıldığında, LINE-1 5' UTR kısmının farklı CG dinükleotit bölgelerindeki metilasyon değişimlerinin, kolorektal kanser dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde farklı yöntemler kullanılarak incelendiği birçok çalışmada genom geneli metilasyon analizi için özellikle belirlenmiş bir bölgesi olmadığı görülmüştür.

Bunlardan biri olan Stanzer vd. (2010) tarafından genom geneli hipometilasyon durumunun belirlenmesinde LINE-1 tekrar dizilerinin kullanılabilirliğini test ettikleri bir çalışmada, farklı kanser hücre hatları ve FFPE prostat kanser dokusunda MethylLight, Pirosekanslama ve HRM analizleri kullanılmıştır. Kullanılan bu 3 yöntemde sonuçlar birbirleriyle tutarlı bulunmuştur. Dolayısıyla diğer yöntemlere kıyasla HRM analizinin uygulama kolaylığı, maliyeti ve tekrarlanabilirliği açısından daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmayı referans alan Tse vd. (2011) HRM yöntemini geliştirerek benzer sonuçlara ulaşmış metilasyon çalışmalarında kullanılabilirliğini teyit etmişlerdir.

Matsunoki vd. (2012) yaptıkları bir çalışmada kolorektal kanserde LINE-1 metilasyonunun heterojenitesini değerlendirmek; invazyon ve metastazdaki biyolojik ilişkisini anlamak için çoklu tümör bölgeleri incelemişlerdir. LINE-1 5' UTR kısmındaki 90 bp uzunluğundaki bölgeyi (117→236 nt), MethylLight yöntemi kullanılarak değerlendirmişlerdir. Bu amaçla, 48 kolorektal kanser hastasından elde ettikleri FPPE primer tümör dokularını normal kolon dokusu ile karşılaştırdıklarında normal dokuya oranla tümör dokusunda LINE-1 metilasyon seviyesinin anlamlı olarak daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca primer tümör, lenf nodu ve uzak metastaz arasında metilasyon derecesi bakımından bir fark bulamamışlardır. Bu sonuçlar ile kolorektal kanserin gelişimi sırasında LINE-1 metilasyon seviyesinin sabit kaldığını dolayısıyla da kolorektal kanserlerde moleküler tanı için potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini düşünmüşlerdir. Ek olarak primer tümör dokudaki LINE-1 metilasyon seviyesini yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu ve evresi gibi klinikopatolojik özelliklere göre kıyasladıklarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamamışlardır ($p>0.05$).

Literatüre bakıldığında LINE-1 5' UTR kısmının 160 bç uzunluğundaki bölgesinin (203→364 nt) COBRA PCR ile incelendiği iki adet çalışma görülmüştür. Bu çalışmalardan ilkinde Matsuzoki vd. (2005) genom geneli metilasyon durumu ile kromozomal ve mikrosatellit kararsızlık arasındaki ilişkiyi araştırmak için 80 adet kolorektal kanser dokusu ve bu hastalardan alınan 51 adet yakın çevre doku ve 20 adet normal doku incelemişlerdir. Çalışma sonucunda normal dokuların (%54.3 ± 6.5) yakın çevre dokulara kıyasla (%46.2 ± 8) daha yüksek oranda metile olduğunu görmüşlerdir ($p<0.05$). Kanserli dokuların ise (%41.0 ± 9.7) normal ya da yakın çevre dokularına kıyasla anlamlı derecede ($p>0.05$) daha düşük metilasyona sahip olduğunu görmüşler ancak yaşa, cinsiyete ve evreye göre belirgin bir farklılık görememişlerdir ($p>0.05$). İkinci çalışmada ise Chalitchagorn vd. (2004) meme, kolon, akciğer, baş ve boyun, mesane, özofagus, karaciğer, prostat ve mide karsinomlarında, metilasyon durumunu incelediklerinde kanser dokularının normal dokulara kıyasla yüksek oranda LINE-1 hipometilasyonu içerdiğini tespit etmişlerdir ($p<0.05$). Ayrıca kanserli hastaların serumlarından elde edilen DNA örneklerinde de sağlıklı bireylerin DNA örneklerinden daha fazla LINE-1 hipometilasyonu tespit etmişlerdir ($p<0.05$).

Antelo vd. (2012) erken başlangıçlı kolorektal kanser ile genom geneli hipometilasyon arasındaki ilişkiyi inceledikleri bir çalışmada LINE-1 5' UTR kısmındaki 145 bç uzunluğundaki bölgeyi (209→353 nt) pirosekanslama yöntemi kullanarak değerlendirmişlerdir. Normal doku (76.5 ± 1.5) ile tümörlü doku arasında (56.6 ± 8.6) anlamlı bir farklılık belirlemişlerdir ancak klinikopatolojik özellikler açısından anlamlı bir fark bulamamışlardır. LINE-1 metilasyonunu erken yaşlarda başlayan kolorektal kanserlerde, ileri yaşlarda başlayan kolorektal kanserlere oranla anlamlı olarak daha düşük bulmuşlardır ve bunun sonucu olarak da LINE-1 metilasyonunun kolorektal kanserli genç hastalarda prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Sunami vd. (2011) genom geneli hipometilasyonun kolorektal kanserin patolojik evresi ile ilişkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla LINE-1 5' UTR kısmındaki 148 bç uzunluğundaki bölgeyi (102→249 nt) AQAMA(Absolute Quantitative Analysis Of Methylated Alleles) yöntemi ile incelemişlerdir. TisN0M0 evresinde 25 hastadan ve çeşitli evrelerdeki kolorektal kanser hastalarından alınan normal, adenom ve kanser dokusunu incelediklerinde, LINE-1 hipometilasyonunun normal kolon mukozasının

adenomaya dönüştüğü erken aşamada ortaya çıktığını ve kolorektal kanserin ilerlemesiyle daha da azaldığını ortaya koymuşlardır.

King vd. (2014) genom geneli hipometilasyonun, kolorektal adenom riski ile ilişkili olabileceğini belirlemek amacıyla LINE-1 5' UTR kısmındaki 141 bç uzunluğundaki bölgeyi (179→313 nt) HRM analizi ile incelemişlerdir. Patolojik olarak adenom riski taşıyan 108 hastaya ait dokuların, 209 hastadan alınan biyopsi materyaline göre anlamlı olarak daha düşük LINE-1 metilasyon seviyesine sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Yapılan bu tez çalışmasında LINE-1 5' UTR 1. bölgeden elde edilen sonuçlar yukarıda bahsedilen çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. İki, üç, dört, beş ve altıncı bölgelerin metilasyon seviyelerine bakıldığında (Tablo 13, 15, 17, 19 ve 21) normal dokular ile tümör dokuları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir. Buna rağmen her bir hasta bireysel olarak değerlendirildiğinde (Ek 1) hastanın normal dokusunun tümörlü dokusuna oranla daha yüksek bir metilasyona sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca bu tez çalışmasında LINE-1 5' UTR kısmını bölgelere ayırarak analiz etmekteki amaç, bölgelerin amplifikasyon verimi ve özgünlüğüne bağlı olarak kolorektal kanserin tespitinde biyobelirteç olarak kullanılacak en uygun bölgeyi belirlemektir.

Bunlara ek olarak LINE-1 transpozonuna ait 5' UTR için belirlenen tüm bölgelerde bireylerin normal ve tümörlü dokuları arasındaki metilasyon farklarının beklenen düzeyde anlamlı olarak bulunamamış olması aşağıda sıralanmış olan nedenlere bağlı olabilir:

1-) Kullanılan tümör dokusunun heterojen bir yapıya sahip olmasından dolayı yalnızca saf tümör hücresinden değil aynı zamanda doku içerisinde yer alan normal hücrelerden (tümör doku içerisinde yer alan endotel hücreleri) de DNA elde edilmiştir. Dolayısıyla analiz sırasında elde edilen erime eğrileri tüm amplifikasyonların ortalaması olduğundan normal hücrelerdeki DNA'ların amplifikasyonu ortalama metilasyon seviyesini etkileyecektir.

2-) LINE-1 genom içerisinde ortalama 500 000 kopya sayına sahip olan bir retrotranspozondur (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Aktif halde hareket edebilen LINE-1 kopya sayısı ve gen bütünlüğü bireyler arasında farklılık

gösterebildiğinden çoğaltılan bölgenin amplifikasyon verimi açısından bireyler arasında heterojeniteye neden olacaktır.

3-) Hastalara ait dokuların arşiv materyalleri olması formaline bağlı DNA hasarları (kırıklar) açısından ayrı bir sorun olarak düşünülebilir.

4-) Amplifiye edilen bölgeler arasındaki özgünlük ve verime bağlı farklılıklar da analiz sonuçlarını etkileyecektir.

Yapılan bu çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre kolorektal kanser dokusu ile normal doku arasında LINE-1 metilasyonu açısından 1. bölgede (1→94 nt) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.0001$). Literatüre bakıldığında ise kolorektal kanserde 1. bölgenin çalışılmadığı ancak prostat kanserinde çalışılıp anlamlı bir sonuç verdiği görülmektedir (Stanzer vd., 2010). Buna ek olarak diğer 5 bölgede normal ve tümör dokusu arasında LINE-1 metilasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmemiş olsa da ($p > 0.05$) bu durumun yukarıda basedilen nedenden/nedenlerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca literatürde çalışılan ve anlamlı sonuçlar elde edilen bölgeler yapılan bu tez çalışmasında belirlenen bölgeler ile tam olarak eşleşme sağlamamaktadır. İstatistiksel olarak anlamlı farkların bulunmadığı bölgelerdeki bazı örneklerde normal doku ve tümör dokusu bireysel olarak değerlendirildiğinde, tümör dokusunun normal dokuya oranla daha düşük metilasyona sahip olduğu görülmüştür (Ek 1). Ayrıca literatürle uyumlu olarak yaş, cinsiyet, tümör evresi ve tümör lokalizasyonu gibi klinikopatolojik parametreler açısından normal ve tümörlü dokulardaki LINE-1 metilasyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak bu tez kapsamında çalışılan bölgeler içinde 1.bölgenin kolorektal kanserde (literatürdeki diğer kanser türleri ile yapılan çalışmalar da dikkate alındığında tüm kanser olgularında) LINE-1 5' UTR kısmında oluşan hipometilasyon tespitinde ve buna bağlı kanserleşmede biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. LINE-1 5' UTR 1.bölgede normal ve tümörlü dokular arasında CG dinükleitlerindeki metilasyon farkı anlamlı bulunmuş olup ($p<0.0001$) bu bölgenin kolorektal kanserde hipometilasyon tespiti için biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.
2. Tüm örneklerde ve çalışılan tüm bölgelerde yaş, cinsiyet, tümör evresi ve tümör lokalizasyonu açısından normal ve tümörlü dokularda LINE-1 5' UTR'deki metilasyon seviyesi bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır.
3. Hastalara ait normal ve tümörlü doku tek başına değerlendirildiğinde, tümör dokusunun normal dokuya oranla daha düşük metilasyona sahip olduğu görüldüğünden diğer 5 bölgeninde hasta sayısı artırılarak çalışıldığında anlamlı sonuç verebileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

American Cancer Society (2019). Cancer A-Z, Colorectal Cancer Stages [online]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html> (Accessed 17 May 2019).

Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR (2018). AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. Springer International Publishing, Almanya, 251-274.

Antelo M, Balaguer F, Shia J, Shen Y, Hur K, Moreira L, Cuatrecasas M, Bujanda L, Giraldez MD, Takahashi M, et al. (2012). A High Degree of LINE-1 Hypomethylation Is a Unique Feature of Early-Onset Colorectal Cancer. PLoS ONE 7(9).

Aoki K, Taketo MM (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): A multi-functional tumor suppressor gene. Journal of Cell Science 120(19): 3327-3335.

Baba Y, Murata A, Watanabe M, Baba H (2014). Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer. Surgery Today 44(10): 1807-1816.

Babushok DV, Kazazian HH (2007). Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. Human Mutation 28(6): 527-539.

Barchitta M, Quattrocchi A, Maugeri A, Vinciguerra M, Agodi A (2014). LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: A systematic review and meta-analysis. PLoS ONE 9(10).

Beck CR, Collier P, Macfarlane C, Malig M, Kidd JM, Eichler EE, Badge RM, Moran J V. (2010). LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. Cell 141(7): 1159-1170.

Boland CR, Goel A (2010). Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. Gastroenterology 138(6): 2073-2087.

Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N (2010). WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 4th ed. Lyon: International Agency for research on cancer, Lyon (France): 417.

Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P (2008). Smoking and colorectal cancer: A meta-analysis. JAMA - Journal of the American Medical Association 300(23): 2765-2778.

Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB (2008). Cigarette Smoking and Adenomatous Polyps: A Meta-analysis. Gastroenterology 134(2): 388-395.

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68(6): 394-424.
- Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C (2017). *TNM classification of malignant tumours*. 8th ed. Union for International Cancer Control, John Wiley and Sons, New Jersey: 84-88.
- Brouha B, Schustak J, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Morant J V, Kazazian HH (2003). Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9): 5280-5285.
- Buc E, Kwiatkowski F, Alves A, Panis Y, Manton G, Slim K (2006). Tobacco smoking: A factor of early onset of colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum* 49(12): 1893-1896.
- Bufl JA (1990). Colorectal cancer: Evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Annals of Internal Medicine* 113(10): 779-788.
- Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thong-ngam D, Voravud N, Sriuranpong V, Mutirangura A (2004). Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* 23(54): 8841.
- Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: Meta-analysis of prospective studies. *PLoS ONE* 6(6).
- Chen JM, Stenson PD, Cooper DN, Férec C (2005). A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. *Human Genetics* 117(5): 411-427.
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R (1998). DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395(6697): 89.
- Cordaux R, Batzer MA (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Reviews Genetics* 10(10): 691.
- Cottrell S, Bodmer WF, Bicknell D, Kaklamanis L (1992). Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *The Lancet* 340(8820): 626-630.
- De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, De Rooij LPMH, De Jong JH, De Boer OJ, Van Leersum R, Bijlsma MF, et al. (2013). Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nature Medicine* 19(5): 614.

- Druml B, Cichna-Markl M (2014). High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry* 158: 245-254.
- Faulkner GJ, Kimura Y, Daub CO, Wani S, Plessy C, Irvine KM, Schroder K, Cloonan N, Steptoe AL, Lassmann T (2009). The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nature Genetics* 41(5): 563.
- Fearon ER., 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6: 479-507.
- Fearon, E. R., 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6: 479-507.
- Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 3(3): 153.
- Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, Van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nature Cell Biology* 3(4): 433.
- Giles RH, Van Es JH, Clevers H (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1653(1): 1-24.
- Grady WM, Carethers JM (2008). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 135(4): 1079-1099.
- Half E, Bercovich D, Rozen P (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 4(1): 22.
- Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Nakagawa H, Sotamaa K, Prior TW, Westman J (2005). Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *New England Journal of Medicine* 352(18): 1851-1860.
- Hancks DC, Kazazian HH (2016). Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mobile DNA* 7(1): 9.
- Hata K, Sakaki Y (1997). Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene* 189(2): 227-234.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JPI, Markowitz S, Willson JKV, Hamilton SR, Kinzler KW (1998). Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(12): 6870-6875.
- Hernandez-Blazquez FJ, Habib M, Dumollard JM, Barthelemy C, Benchaib M, De Capoa A, Niveleau A (2000). Evaluation of global DNA hypomethylation in human colon cancer tissues by immunohistochemistry and image analysis. *Gut* 47(5): 689-693.

Hoffmann MJ, Schulz WA (2005). Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochemistry and Cell Biology* 83(3): 296-321.

Hur K, Cejas P, Feliu J, Moreno-Rubio J, Burgos E, Boland CR, Goel A (2014). Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of protooncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut* 63(4): 635-646.

Inamura K, Yamauchi M, Nishihara R, Kim SA, Mima K, Sukawa Y, Li T, Yasunari M, Zhang X, Wu K, et al. (2015). Prognostic Significance and Molecular Features of Signet-Ring Cell and Mucinous Components in Colorectal Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology* 22(4): 1226-1235.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, et al. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature Genetics* 41(2): 178.

Iskow RC, McCabe MT, Mills RE, Torene S, Pittard WS, Neuwald AF, Van Meir EG, Vertino PM, Devine SE (2010). Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell* 141(7): 1253-1261.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 138(6): 2044-2058.

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

Jiang Y, Ben Q, Shen H, Lu W, Zhang Y, Zhu J (2011). Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Epidemiology* 26(11): 863-876.

Jones RP, Sutton PA, Evans JP, Clifford R, McAvoy A, Lewis J, Rousseau A, Mountford R, McWhirter D, Malik HZ (2017). Specific mutations in KRAS codon 12 are associated with worse overall survival in patients with advanced and recurrent colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 116(7): 923.

Kazazian HH (2004). Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science* 289(5482): 1152-1153.

Kazazian J (2000). L1 retrotransposons shape the mammalian genome. *Science* 303(5664): 1626-1632.

Kerachian MA, Kerachian M (2019). Long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) methylation in colorectal cancer. *Clinica Chimica Acta* 488 (2019): 209-214.

King WD, Ashbury JE, Taylor SA, Tse MY, Pang SC, Louw JA, Vanner SJ (2014). A cross-sectional study of global DNA methylation and risk of colorectal adenoma. *BMC Cancer* 14(1): 488.

Kinzler KW, Vogelstein B, Horii A, Miyoshi Y, Nakamura Y (1992). Disruption of the APC Gene by a Retrotransposal Insertion of LI Sequence in a Colon Cancer. *Cancer Research* 52(3): 543-645.

Kinzler, K. W. and Vogelstein, B., 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), 159-170.

Kristensen LS, Wojdacz TK, Thestrup BB, Wiuf C, Hager H, Hansen LL (2009). Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM. *BMC Cancer* 9(1): 453.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, Fitzhugh W (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome 409(6822): 860.

Lee DW, Han SW, Cha Y, Bae JM, Kim HP, Lyu J, Han H, Kim H, Jang H, Bang D, et al. (2017). Association between mutations of critical pathway genes and survival outcomes according to the tumor location in colorectal cancer. *Cancer* 123(18): 3513-3523.

Lee E, Iskow R, Yang L, Gokcumen O, Haseley P, Luquette LJ, Lohr JG, Harris CC, Ding L, Wilson RK, et al. (2012). Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science* 337(6097): 967-971.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386(6625): 623.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396(6712): 643.

Li J, Huang Q, Zeng F, Li W, He Z, Chen W, Zhu W, Zhang B (2014). The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: A meta-analysis. *PLoS ONE* 9(9).

Liang PS, Chen TY, Giovannucci E (2009). Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer* 124(10): 2406-2415.

Lynch HT, Lanspa S, Smyrk T, Boman B, Watson P, Lynch J (1991). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, part I. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 53(2): 143-160.

Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, Qin H (2013). Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PLoS ONE* 8(1).

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B (1995). Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 68(5215): 1336-1338.

- Matsunoki A, Kawakami K, Kotake M, Kaneko M, Kitamura H, Ooi A, Watanabe G, Minamoto T (2012). LINE-1 methylation shows little intra-patient heterogeneity in primary and synchronous metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 12(1): 574.
- Matsuzaki K, Deng G, Tanaka H, Kakar S, Miura S, Kim YS (2005). The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 11(24): 8564-8569.
- Mead LJ, Jenkins MA, Young J, Royce SG, Smith L, St. John DJB, Macrae F, Giles GG, Hopper JL, Southey MC (2007). Microsatellite instability markers for identifying early-onset colorectal cancers caused by germ-line mutations in DNA mismatch repair genes. *Clinical Cancer Research* 13(10): 2865-2869.
- Monis PT, Giglio S, Saint CP (2005). Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry* 340(1): 24-34.
- Mueller C, Aschacher T, Wolf B, Bergmann M (2018). A role of line-1 in telomere regulation. *Frontiers in Bioscience – Landmark* 23: 1310–1319.
- Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y (2013). Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 109(2): 408.
- Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, Kovar CL, Lewis LR, Morgan MB, Newsham IF (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487(7407): 330.
- National Center for Biotechnology Information (2019). Nucleotide, Human DNA for LINE-1 transposable element ORFI and II [online]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X52235.1#sequence_X52235.1 (Accessed 17 May 2019).
- Nyström-Lahti M, Parsons R, Sistonen P, Pylkkänen L, Aaltonen LA, Leach FS, Hamilton SR, Watson P, Bronson E, Fusaro R (1994). Mismatch repair genes on chromosomes 2p and 3p account for a major share of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families evaluable by linkage. *American Journal of Human Genetics* 55(4): 659.
- Ogino S, Goel A (2008). Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *Journal of Molecular Diagnostics* 10(1): 13-27.
- Ostertag EM, Kazazian Jr HH (2001). Biology of Mammalian L1 Retrotransposons. *Annual Review of Genetics* 35(1): 501-538.
- Penzkofer T, Dandekar T, Zemojtel T (2005). L1Base: From functional annotation to prediction of active LINE-1 elements. *Nucleic Acids Research* (2005): D498-D500.
- Peppone LJ, Mahoney MC, Cummings KM, Michalek AM, Reid ME, Moysich KB, Hyland A (2008). Colorectal cancer occurs earlier in those exposed to tobacco smoke:

- Implications for screening. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 134(7): 743-751.
- Pino MS, Chung DC (2010). The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* 138(6): 2059-2072.
- Portela A, Esteller M (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology* 28(10): 1057.
- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359(6392): 235.
- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275(5302): 967-969.
- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* (2007): 597-608.
- Rodić N, Burns KH (2013). Long Interspersed Element-1 (LINE-1): Passenger or Driver in Human Neoplasms? *PLoS Genetics* 9(3).
- Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, García-Albéniz X, Maurel J, Batlle JF (2017). Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 109: 9-19.
- Roy HK, Lynch HT (2003). Diagnosing Lynch syndrome: Is the answer in the mouth? *Gut* 52(12): 1665-1667.
- Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, Ostos LCG, Lannon WA, Grotzinger C, Del Rio M, et al. (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nature Medicine* 19(5): 619.
- Schulz WA (2006). L1 retrotransposons in human cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2006.
- Shia J, Tang LH, Vakiani E, Guillem JG, Stadler ZK, Soslow RA, Katabi N, Weiser MR, Paty PB, Temple LK (2009). Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: A 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *American Journal of Surgical Pathology* 33(11): 1639-1645.
- Snover DC (2011). Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Human Pathology* 42(1): 1-10.
- Speck M (2001). Antisense Promoter of Human L1 Retrotransposon Drives Transcription of Adjacent Cellular Genes. *Molecular and Cellular Biology* 21(6): 1973-1985.

- Stanzer S, Balic M, Strutz J, Heitzer E, Obermair F, Hauser-Kronberger C, Samonigg H, Dandachi N (2010). Rapid and reliable detection of LINE-1 hypomethylation using high-resolution melting analysis. *Clinical Biochemistry* 43(18): 1443-1448.
- Steinhoff C, Schulz WA (2004). Transcriptional regulation of the human LINE-1 retrotransposon L1.2B. *Molecular Genetics and Genomics* 270(5): 394-402.
- Sunami E, de Maat M, Vu A, Turner RR, Hoon DSB (2011). LINE-1 hypomethylation during primary colon cancer progression. *PLoS ONE* 6(4).
- Swergold GD (1990). Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Molecular and Cellular Biology* 10(12): 6718-6729.
- Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ, Cannon-Albright LA (2010). Population-Based Family History-Specific Risks for Colorectal Cancer: A Constellation Approach. *Gastroenterology* 138(3): 877-885.
- Teodoridis JM, Hardie C, Brown R (2008). CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: Causes and implications. *Cancer Letters* 268(2): 177-186.
- Thayer RE, Singer MF, Fanning TG (1993). Undermethylation of specific LINE-1 sequences in human cells producing a LINE-1 -encoded protein. *Gene* 133(2): 273-277.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260(5109): 816-819.
- Tian S, Simon I, Moreno V, Roepman P, Tabernero J, Snel M, Van't Veer L, Salazar R, Bernards R, Capella G (2013). A combined oncogenic pathway signature of braf, KRAS and PI3KCA mutation improves colorectal cancer classification and cetuximab treatment prediction. *Gut* 62(4): 540-549.
- Tse MY, Ashbury JE, Zwingerman N, King WD, Taylor SAM, Pang SC (2011). A refined, rapid and reproducible high resolution melt (HRM)-based method suitable for quantification of global LINE-1 repetitive element methylation. *BMC Research Notes* 4(1): 565.
- Türkyılmaz M, Hacıkamiloğlu E, Baran Deniz E, Boztaş G, Dündar S, Kavak Ergün A, Sevinç A, Tütüncü S, Atik E (2018). Türkiye kanser istatistikleri 2015. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma A, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD (1998). Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(15): 8698-8702.
- Velayos FS, Loftus E V., Jess T, Harmsen WS, Bida J, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Sandborn WJ (2006). Predictive and Protective Factors Associated With Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis: A Case-Control Study. *Gastroenterology* 130(7): 1941-1949.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Smits AM, Bos JL (1988). Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine* 319(9): 525-532.

Vossen RHAM, Aten E, Roos A, Den Dunnen JT (2009). High-resolution melting analysis (HRMA) - More than just sequence variant screening. *Human Mutation* 30(6): 860-866.

Wittwer CT (2009). High-resolution DNA melting analysis: Advancements and limitations. *Human Mutation* 30(6): 857-859.

Wojdacz TK (2012). Methylation-sensitive high-resolution melting in the context of legislative requirements for validation of analytical procedures for diagnostic applications. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 12(1): 39-47.

Wojdacz TK, Borgbo T, Hansen LL (2009). Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications. *Epigenetics* 4(4): 231-234.

Wojdacz TK, Hansen LL (2006). Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay. *BioTechniques* 41(3): 274-278.

Wojdacz TK, Hansen LL, Dobrovic A (2008). A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC Research Notes* 1(1): 54.

Wolff EM, Byun HM, Han HF, Sharma S, Nichols PW, Siegmund KD, Yang AS, Jones PA, Liang G (2010). Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. *PLoS Genetics* 6(4).

Worm J, Aggerholm A, Guldborg P (2001). In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis. *Clinical Chemistry* 47(7): 1183-1189.

Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Qi X, Jiang X, Shi-Jie M (2016). LINE-1 in cancer: Multifaceted functions and potential clinical implications. *Genetics in Medicine* 18(5): 431.

Zisman AL, Nickolov A, Brand RE, Gorchow A, Roy HK (2006). Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: Implications for screening. *Archives of Internal Medicine* 166(6): 629-634.



EKLER

Ek 1. Hastalara Ait Tüm Bölgelerdeki Metilasyon Seviyeleri (N: Normal Doku, T: Tümörlü Doku)

Hasta No	Metilasyon Değeri (%)											
	1. Bölge		2. Bölge		3. Bölge		4. Bölge		5. Bölge		6. Bölge	
	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T
1	100	98	64	54	70	66	100	90	100	68	100	100
2	97	87	69	98	70	67	67	57	69	54	55	37
3	83	78	61	43	68	63	71	68	74	77	89	89
4	87	82	64	54	61	61	82	79	77	79	72	83
5	87	79	57	38	63	66	79	76	77	71	83	100
6	91	72	76	71	68	63	84	60	74	52	66	43
7	95	75	52	68	61	63	93	84	90	63	95	49
8	83	80	54	52	68	61	79	76	82	82	72	83
9	85	80	64	61	66	70	77	69	70	64	72	60
10	87	66	43	41	68	68	67	73	73	75	83	78
11	91	90	50	54	68	70	90	81	81	73	100	95
12	100	89	48	34	77	72	88	92	50	69	100	72
13	87	79	52	45	55	63	81	67	70	62	83	72
14	100	80	58	59	50	61	100	71	100	70	100	66
15	87	91	46	59	70	68	81	100	81	97	83	89
16	90	82	61	52	63	61	73	65	75	64	83	72
17	90	82	55	66	57	57	71	75	47	51	89	83
18	95	79	38	25	66	61	81	92	49	44	91	100
19	90	63	92	38	72	57	88	61	44	32	100	72
20	87	83	69	80	63	57	71	81	47	51	66	78
21	87	82	46	25	66	50	73	77	47	42	95	89
22	88	96	39	46	55	63	73	85	44	44	95	100
23	85	83	43	61	63	66	77	81	49	56	89	72
24	85	75	55	20	57	42	81	73	54	47	89	89
25	87	85	76	78	57	46	88	90	61	61	78	72
26	95	90	46	64	57	61	88	73	61	44	95	100
27	91	74	43	31	70	55	83	88	61	71	60	66
28	83	80	89	57	61	52	85	81	69	54	66	66
29	87	83	78	20	72	70	88	44	71	20	89	81
30	91	83	61	89	66	46	88	79	61	49	89	95

Ek 2. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı



RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kolorektal kanserde epigenetik bir çalışma : line-1 retrotranspozonunda 5'Utr Metilasyon değişimlerinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	105

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Ali İrfan GÜZEL			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	TIBBİ BİYOLOJİ A.D.			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ			
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Fatimatüzzehra ŞİPŞAK			
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Recep BEDİR			
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Ahmet PERGEL			
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	-----			
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	-----			
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	-----			
	ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	-----			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkan Vekili
Unvanı/Adı Soyadı:Doç.Dr.Remzi Adnan AKDOĞAN
İmzası

Ek 2 (devam)



RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kolorektal kanserde epigenetik bir çalışma : line-1 retrotranspozonunda 5'Utr Metilasyon değişimlerinin araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	105

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	01.06.2018	105	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	

Karar Bilgileri	Karar No: 2018/108	Tarih: 06.07.2018
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkat e alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "salt çoğunluğu" ile karar verilmiştir.	

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BAŞKAN VEKİLİ UNVANI / ADI / SOYADI	Doç.Dr.Remzi Adnan AKDOĞAN
-------------------------------------	----------------------------

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
			E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ömer ŞATIROĞLU(Başkan)	Kardiyoloji	RTEÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	-----
Dr.Öğr.Üyesi Atilla TOPÇU(Raportör)	Tıbbi Farmakoloji	RTEÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Remzi Adnan AKDOĞAN(Başkan Vekili)	İç Hastalıkları	RTEÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Hüseyin Avni UYDU	Tıbbi Biyokimya	RTEÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	-----
Doç.Dr.Teslime AYAZ	İç Hastalıkları	RTEÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üyesi Vaner KÖKSAL	Beyin ve Sinir Hastalıkları	RTEÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	-----
Dr.Öğr.Üyesi Mehmet ALTUNTAŞ	Acil Tıp	RTEÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üyesi Şenol ŞENTÜRK	Kadın Hastalıkları ve Doğum	RTEÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üyesi Hüseyin FINDIK	Göz Hastalıkları	RTEÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üyesi Suat TERZİ	Kulak-Burun-Boğaz Hastalıkları	RTEÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	-----

* :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER		
Soyadı, Adı	: ŞİPŞAK Fatimatüzzehra	
Uyruğu	: Türkiye Cumhuriyeti	
Doğum Tarihi ve Yeri	: 17.05.1993/ RİZE	
E-Posta	: sipsak.zehra@gmail.com	
EĞİTİM BİLGİLERİ		
Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Bölümü	Halen
Lisans	Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2015
Lise	Tevfik İleri Anadolu Lisesi	2011
YABANCI DİL		
İngilizce	İyi	
Almanca	Başlangıç	