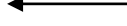


EBRU NURAY



Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST

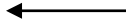
Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya

(sol yandaki gibi) olacak .



DOKTORA TEZİ



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS
TEZİ;

İSTANBUL
2019



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**KOLOREKTAL KANSERDE TRİPTOFAN
METABOLİZMASI VE FOXP3 ARASINDA İMMÜN SİSTEME
YÖNELİK BAĞLANTININ ARAŞTIRILMASI**

EBRU NUR AY

PROF. DR. İLHAN YAYLIM

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2019

DOKTORA TEZİ ONAYI

Istanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Doktora öğrencisi **Ebru Nur AY** tarafından **Prof. Dr. İlhan YAYLIM**'in danışmanlığında hazırlanan "**Kolorektal Kanserde Triptofan Metabolizması ve Foxp3 Arasında İmmün Sisteme Yönelik Bağlantının Araştırması**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 30/12/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Arzu ERGEN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

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

Jüri

Prof. Dr. Bayram KIRAN
Kastamonu Üni. Müh. ve Mim. Fak.
Genetik ve Biyomühendislik A.D.

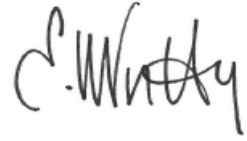
Jüri

**Prof. Dr. Ebru EMEKLİ
ALTURFAN**
Marmara Üni. Diş. Hek. Fak. Temel
Tıp Bil. Böl.

BEYAN

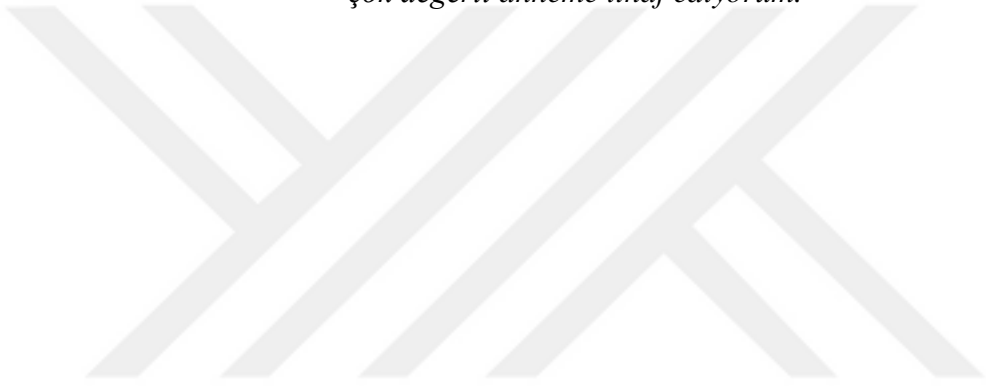
Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları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

Ebru Nur AY



İTHAF

*Hayatımın her anında desteğini ve sevgisini üzerimden eksik etmeyen
çok değerli anneme ithaf ediyorum.*



TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı ve doktora tez danışmanım, akademik bilgi ve tecrübesinin yanısıra içtenliğini ve sevgisini de benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. İlhan Yaylım'a,

Çalışma kapsamında hasta ve sağlıklı bireylerin tayini ile gerekli biyolojik örneklerin teminatı konusunda yardımcı olan İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi kliniği'nde görev yapan Doç. Dr. Soykan Arıkan'a ve İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof Dr. Filiz Akyüz'e,

Tezimin yapımı esnasındaki deneysel çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan ve değerli bilgilerini benden esirgemeyen sevgili ekip arkadaşlarım İstanbul Biruni Üniversitesi'nden Öğr. Gör. Şeyda Ercan'a ve Arş. Gör. Mehmet Tolgahan Hakan'a,

Tez çalışmamın deneysel aşamalarındaki HPLC analizlerinde gerekli olan kimyasal maddelerin temini konusunda yardımlarını benden esirgemeyen ve üzerimde manevi desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Cumhuriyet Üniversitesi'nden Dr. Öğr. Üyesi Ceylan Hepokur'a,

Dahil olduğum Moleküler Tıp Anabilim Dalından sevgili arkadaşlarım Dilara Sönmez'e, İslim Kaleler'e, Ülgen Sever'e,

Lisans eğitimim ile başlayan arkadaşlığımızdan bu zamana kadar, her zaman yanımda olduklarını bildiğim, gerçek dostlukları ile gerek akademik gerekse manevi olarak bana güç katan değerli arkadaşlarım Derya Cansız ve Zehra Sezer'e,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu akademik süreçte de manevi destekleriyle beni ayakta tuttıkları ve yaşamıma kattıkları tüm güzellikler için sevgili aileme,

sonsuz saygı ve teşekkürlerimi arz ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-30121

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET	XX
ABSTRACT.....	XXİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolorektal Kanser.....	3
2.1.1. Kolorektal Kanserin Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Kolorektal Kanserin Etyopatogenezi	4
2.1.3. Kolorektal Kanserde Risk Faktörleri	5
2.1.3.1. Yaş ve Cinsiyet.....	6
2.1.3.2. Beslenme.....	7
2.1.3.3. Sigara	7
2.1.3.4. Alkol	8
2.1.3.5. Diabetes Mellitus (DM)	8
2.1.3.6. Fiziksel Aktivite Yokluğu ve Obezite.....	8
2.1.3.7. İnflamasyonlu Bağırsak Hastalıkları.....	10
2.1.3.8. Aile Hikayesi.....	10
2.1.3.9. Kalıtsal Faktörler.....	11
2.1.4. Kolorektal Kansere Karşı Koruyucu Faktörler	11
2.1.5. Kolorektal Kanserin Teşhisine ve Tedavisine Yönelik Uygulamalar...12	
2.1.5.1. Kolorektal Kanserin Teşhisine Yönelik Analizler	12
2.1.5.2. Kolorektal Kanserin Tedavisine Yönelik Uygulamalar	13
2.1.6. Kolorektal Kanserde Onkogenik Aktivasyon	15

2.1.6.1. Kolorektal Kanserde Moleküler Hedefler	17
2.1.6.1.1. CIN (chromosomal instability) Sinyal Yolağı	18
2.1.6.1.2. LINE-1 hipometilasyonu	18
2.1.6.1.3. MAPK / PIK3 Yolağındaki RAS, BRAF ve PIK3CA Mutasyonları	19
2.1.6.1.4. WNT / APC / TGF- β Sinyal Yolağı	20
2.1.6.1.5. TP53 Mutasyonları	20
2.1.6.2. Kolorektal Kanserde İmmün Moleküler Hedefler	21
2.1.6.3. Kolorektal Kanserde Metabolik Süreçler	22
2.1.6.3.1. Tümör Hücrelerindeki Hızlandırılmış Glikoz Metabolizması “Warburg Etkisi”	23
2.1.6.3.2. Amino Asit Metabolizması	24
2.2. Triptofan Metabolizması	25
2.2.1. Triptofan Metabolizması Hidroksilasyon (Serotonin) Yolağı	28
2.2.2. Triptofan Metabolizması Oksidasyon (Kinürenin) Yolağı	29
2.2.3. Kolorektal Kanserde Triptofan Metabolizması	31
2.3. Kolorektal Kanserde İmmünolojik Mekanizmalar	33
2.3.1. Kolorektal kanserde immün sistemden kaçışta Foxp3’ün Rolü	35
2.4. KRK’de Metabolizma ile İmmün Süreçler Arası Etkileşimler	35
2.4.1.1.1. İmmün Sistemde Glikoz Metabolizması	36
2.4.1.1.2. İmmün Hücre Aktivasyonunda OXPHOS (Mitokondriyel Oksidatif Fosforilasyon Sistemi)’un Rolü	37
2.4.1.1.3. İmmün Sistemde Amino Asit Metabolizması	38
2.4.1.1.4. İmmün Sistemde Triptofan Metabolizması	39
2.5. Foxp3 (Forkhead Box P3) Proteini	40
2.5.1. Foxp3 ile İlişkili Gen Polimorfizmleri ve Kanser İlişkisi	42
2.5.2. Kolorektal kanserde Foxp3’ün Rolü	44
2.5.3. Triptofan Metabolizması ve Foxp3 Arasındaki İlişki	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Gereç	48
3.1.1. Hasta Örneklerinin Toplanması	48
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	49

3.1.3. Kullanılan Cihazlar	50
3.1.4. Kullanılan Tampon Solüsyonlar	51
3.2. Yöntemler	53
3.2.1. Tuzla Çöktürme Yöntemi ile DNA İzolasyonu	53
3.2.1.1. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini	53
3.2.2. Foxp3-C/A (rs3761548) Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması	54
3.2.2.1. PZR'deki Kimyasal Maddeler ve PZR Karışımının Hazırlanışı	54
3.2.2.2. PZR Koşulları	55
3.2.2.3. %2'lik Agaroz Jel Hazırlama ve PZR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi	55
3.2.2.4. PZR Ürünlerinin Kontrolü	56
3.2.3. Foxp3'ün 5. Ekzon 3'-UTR Bölgesi PZR Ürünlerinde PstI Enzim Kesimi	56
3.2.3.1. PstI Enzim Kesiminde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler:	56
3.2.3.2. PstI Enzim Kesimi	56
3.2.3.3. PstI Enzim Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi	56
3.2.3.4. Foxp3 C/A Gen polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi	57
3.2.4. Foxp3 Gen Ekspresyon Analizi	57
3.2.4.1. Doku Eldesi ve Homojenizasyonu	57
3.2.4.2. RNA İzolasyonu	57
3.2.4.3. RNA Kalitesinin Belirlenmesi	58
3.2.4.4. cDNA Eldesi	58
3.2.4.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR)	59
3.2.5. Plazma Triptofan, Kinürenin ve Kinürenik Asit Düzeylerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemiyle Belirlenmesi	60
3.2.5.1. Plazma Triptofan / Kinürünün / Kinürünik Asit Miktar Tayini	62
3.2.5.1.1. Kromatografik koşullar	62
3.2.5.1.2. Standart örneklerinin hazırlanması	62
3.2.5.1.3. Plazma örneklerinin hazırlanması	66

3.3. İstatistiksel Analiz	67
4. BULGULAR.....	69
4.1. PZR Ürünlerinin Kontrolüne ait Bulgular	69
4.1.1. Foxp3 rs3761548 C/A PZR Ürünü ile İlgili Bulgular.....	69
4.2. Kesim Ürünlerinin Kontrolüne ait Bulgular	69
4.2.1. PstI kesim Enzimi ile Foxp3 rs3761548 C/A Polimorfizim Bulguları.....	69
4.3. Foxp3 C/A Polimorfizim Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi.....	70
4.4. Foxp3 Gen Ekspresyon Düzeyinin Değerlendirilmesi	74
4.5. Plazma Triptofan, Kinürenin ve Kinürenik Asit Düzeylerinin Değerlendirilmesi	78
4.6. ROC Eğrisi Analizi.....	81
5. TARTIŞMA	83
KAYNAKLAR	94
FORMLAR	129
GÖNÜLLÜ ONAY FORMU	132
ETİK KURUL KARARI	133
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	134
ÖZGEÇMİŞ	135

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Kolorektal kanserler için evreleme	3
Tablo 2-2: Kadınlarda obezite ile ilişkili kanserler -2012 Dünya verileri.....	9
Tablo 2-3: Erkeklerde obezite ile ilişkili kanserler -2012 Dünya Verileri	9
Tablo 2-4: Kanser tedavisi için planlanmış immünometabolik ajanlar	39
Tablo 3-1: PZR karışımının içeriği	54
Tablo 3-2: Foxp3 geni 5. ekzon 3'-UTR bölgesi PZR reaksiyon koşulları	55
Tablo 3-3: PZR PstI enzim kesim protokolu	56
Tablo 3-4: cDNA sentez protokolu.....	59
Tablo 3-5: cDNA sentez koşulları	59
Tablo 3-6: Q PZR'de Foxp3 ekspresyonu için kullanılan primer dizileri.....	60
Tablo 3-7: Foxp3 ve GAPDH gen ekspresyon analizleri için qPZR protokolü .	60
Tablo 3-8: Foxp3 ve GAPDH gen ekspresyon analizleri için qPZR koşulları...	60
Tablo 3-9: Kromatografik koşullar	62
Tablo 3-10: Kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonları.....	63
Tablo 3-11: Kalibrasyon çözeltilerine ait konsantrasyonlar ve pik alanları	63
Tablo 4-1: Çalışma gruplarına ait veriler.....	71
Tablo 4-2: Kolorektal kanser hastalarında ve sağlıklı kontrollerde Foxp3 rs3761548 C/A genotipleri.....	72
Tablo 4-3: Foxp3 rs 3761548 C/A genotipleri hastaların patolojik parametreleri ile karşılaştırılması	73

Tablo 4-4: Hastalarda Foxp3 mRNA ekspresyon incelemesi.....	74
Tablo 4-5: Hastaların patoloji bulguları ve Foxp3 ekspresyonu.....	77
Tablo 4-6: Foxp3 3761548 C/A genotiplerine göre KRK hastalarda tümörlü doku Foxp3 ekspresyon düzeyleri.....	77
Tablo 4-7: KRK hastaları ve sağlıklı kontrollerde plazma TRP/ KYN/ KYNA düzeyleri.....	78
Tablo 4-8: Hastaların patoloji bulguları ve Plazma TRP düzeyleri.....	79
Tablo 4-9: Hastaların patoloji bulguları ve Plazma KYN düzeyleri	79
Tablo 4-10: Hastaların patoloji bulguları ve Plazma KYNA düzeyleri.....	80
Tablo 4-11: KRK hasta ve sağlıklı kontroller arasında plazma TRP düzeyleri için ROC eğrisi analizi.....	81
Tablo 4-12: KRK hasta ve sağlıklı kontroller arasında plazma KYN düzeyleri için ROC eğrisi analizi.....	81

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kanser gelişiminde genlerin ve çevrenin rolü.....	6
Şekil 2-2: Dünya genelinde yaşa standardize kolorektal kanser hızı (ASRYSH 100000'de)	6
Şekil 2-3: Türkiye'de KRK'nın erkeklerde ve kadınlarda yaşa özel hızları.....	7
Şekil 2-4: Kolorektal kanser tipleri ve ailesel risk faktörü	10
Şekil 2-5: Kolorektal kanserin moleküler mekanizmaları - KEGG Yolağı.....	17
Şekil 2-6: Triptofanın moleküler yapısı.....	26
Şekil 2-7: Triptofan metabolizmasının iki ana yolağı	26
Şekil 2-8: Triptofan metabolizmasının fizyolojik fonksiyonu	27
Şekil 2-9: Triptofan metabolizması	27
Şekil 2-10: Triptofan metabolizmasının seratonin yolağı.....	29
Şekil 2-11: Triptofan metabolizmasının kinürenin yolağı	31
Şekil 2-12: Kolorektal kanserin gelişiminde triptofan metabolizması	32
Şekil 2-13: Tümör mikroçevresinde immün düzenleyici yolaklar	34
Şekil 2-14: Tümör mikroçevresinde immün hücrelerin anti/pro-tümör fonksiyonlarını etkileyen metabolitler	36
Şekil 2-15: Foxp3 geninin kromozomal lokasyonu	40
Şekil 2-2-16: Foxp3'ün gen bölgeleri	40
Şekil 2-17: Foxp3'ün 3 boyutlu yapısı	41
Şekil 2-18: CD4+ hücrelerin sınıflandırılması.....	42

Şekil 2-19: Foxp3+ Treg'lerin hücre yüzeyi faktörleri yoluyla inhibisyonu	42
Şekil 2-20: Foxp3 geninin prognostik önemi	44
Şekil 2-21: Foxp3'ün onkogenез ve tümör ilerlemesi üzerine etkisi	44
Şekil 2-22: Onkogenез üzerinde sitokinlerin uyarıcı etkisi	45
Şekil 2-23: KanserdeIDO'nun rolü	47
Şekil 3-1: Foxp3 C/A Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü	57
Şekil 3-2: HPLC analiz süreci	61
Şekil 3-3: Kolondan moleküllerin ayrılma sıralarının şematik gösterimi.....	61
Şekil 3-4: Standart kalibrasyon grafiği (TRP)	64
Şekil 3-5: Standart kalibrasyon grafiği (TRP) – R ² değerleri.....	64
Şekil 3-6: Standart kalibrasyon grafiği (KYN).....	65
Şekil 3-7: Standart kalibrasyon grafiği (KYN) – R ² değerleri.....	65
Şekil 3-8: Standart kalibrasyon grafiği (KYNA).....	66
Şekil 3-9: Standart kalibrasyon grafiği (KYNA) – R ² değerleri.....	66
Şekil 3-10: Hasta örneğine ait kinürenin/ triptofan/ kinurenik asit kromatogramı	67
Şekil 3-11: Kontrol örneğine ait kinürenin/ triptofan/ kinurenik asit kromatogramı	67
Şekil 4-1: Foxp3 C/A PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü. (Marker: GeneDirex 100 bp DNA Ladder RTU).....	69
Şekil 4-2: PstI enzim kesim ürünlerinin %2'lük agaroz jel görüntüsü. (Marker: GeneDirex 100 bp DNA Ladder RTU).....	70
Şekil 4-3: KRK hastaları ve kontrollerde Foxp3 C/A genotipleri	73

- Şekil 4-4: Hastaların kontrollere oranla Foxp3 mRNA ekspresyon düzeylerinin kümülatif incelenmesi 76
- Şekil 4-5: Foxp3 geninin tümörsüz dokulara göre tümörlü dokularda fold change (Kat Değişimi) grafiği 76
- Şekil 4-6: KRK hasta ve sağlıklı kontroller arasında plazma TRP ve KYN düzeyleri için ROC eğrisi..... 82



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- KRK: Kolorektal Kanser
- FAP: Ailesel Adenomatöz Polipozis
- HNPCC: Herediter Nonpolipozis Kolorektal
- TNM: Tümör, Nod, Metastaz
- AJCC: American Joint Committee on Cancer
- APC: Antijen Sunan Hücre
- NSADD: Steroid Olmayan Anti-enflamatuar İlaç
- COX-2: Siklooksijenaz-2
- HMG-CoA: 3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA reduktaz
- CEA: Karsino Embriyojenik Antijen
- BT: Bilgisayarlı Tomografi
- MR: Manyetik Rezonans Görüntüleme
- DGKT : Dışkıda Gizli Kan Testi
- FS: Fleksibl Sigmoidoskopi
- TIL: Tümör İnfiltrat Edici Lenfosit
- SN: Tek Nükleotit Polimorfizmi
- DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
- KT: Kemoterapi RT: Radyoterapi
- EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
- VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
- DCC: Deleted in Colorectal Cancer Ge
- CIN : Kromozomal İnstabilite
- MSI: Mikrosatellit İnstabilitesi
- CIMP: CpG ada metilat fenotipi
- PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

TP53: Tumor Protein p53

MMR: Yanlış Eşleşme Onarım Gen

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

RNA: Ribo Nükleik Asit

KRAS: Kirsten Sıçan Sarkoma 2 Viral Onkogen Homoloğu

NRAS: Neuroblastoma RAS Viral (v-ras) Oncogene Homolog

BRAF: V-raf Murin Sarkomu Viral Onkogen Homoloğu B

ERBB2: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

ALK: Anaplastik Lenfoma Kinaz

ROS1: Proto-Onkojen Tirozin-Protein Kinaz 1 MET: Mezenkimal Epitelyal Geçiş Geni

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu MAPK: Mitojen Aktif Protein Kinaz

MLH: Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (Lynch Sendromu)

PMS: Mismatch Repair Sistem Komponent

WNT: Kanonikal Sinyal Yolağı

SCNA: Somatik Kopya Numarası Değişikliği

CTNNB1: Katenin beta-1

LINE-1: Long İnterspersed Nuclear Elements-1

PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PTGS2: cyclooxygenase-2

PDCD1(PD-1): Programlanmış hücre ölüm reseptörü-1

CD274 (PD-L1): Programlanmış hücre ölüm reseptörü ligandı-1

Foxp3 (Forkhead box P3): Transkripsiyon Faktörü Çatallı Kutu Protein 3

TLR4: Toll Benzeri Reseptör 4

NFKB: NF-κB, Nuclear Factor Kappa B

MIR21 (miR21): MicroRNA 21

HMGA1: Yüksek Hareketlilik Grubu A1
OXPHOS: Oksidatif Fosforilasyon
mTOR: Rapamisin'in Memeli Hedefi
MCT: Monokarboksilat Taşıyıcılar
HIF-1 α : Hypoxia-inducible Factor 1-Alpha
CD73: Ekto-5'-Nükleotidaz
MTA : 5'-Deoksi-5'Metiltioadenosinin Adenin
MTAP: Metiltiyoadenosin Fosforilaz
GLS: Glutaminaz
AMP: Antimikrobiyal Peptit Öncülleri
PFK1: fosho-fruktokinaz-1
TRP: Triptofan
TPH: triptofan hidroksilaz
5-HT: 5-hidroksitriptamin
AADC: Aromatik-L-Amino Asit Dekarboksilaz
IDO: İndolamin 2, 3-dioksijenaz
TDO: Tryptophan 2,3-dioxygenase
NFK: N-formil-kinurenine
KMO: Kinurenine-3-monooksijenaz
3HK: 3-hidroksi-kinurenine
KYNU: Kinüreninaz
3HAO: 3-hidroksiapranilik asit oksidaz
ACMS: 2-amino-3- karboksimukonik-6-semialdehit
PIC: Pikolinik Asit
QUIN: Kinolinik Asit
NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotidi

3HAA: 3-Hidroksiantiranili Asit

KYNA: Kinurenik Asit

KATs: Kinurenin Aminotransferazlar

NMDA: N-metil D-aspartik Asit

GI: Gastrointestinal

KP: Kinurenin Yolağı

NK: Doğal Öldürücü Hücre

Treg: Düzenleyici T Lenfosit

Th1: Yardımcı T Hücre Tip 1

Th2: Yardımcı T Hücre Tip 2

IFN γ : IFN İnterferon Gama

TCR: T Hücre Reseptörü

ROS: Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase

AKT: Protein kinase B

GLUT-1: Glukoz Transporter 1

MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cells

ARG: Arjinin

NO: Nitrik Oksit

ASH: Antijen Sunan Hücre

CTL: Sitotoksik T-lenfosit

CTLA4: Sitostatik T Lenfosit Antijen 4

MHC: Majör Histokompabilite Kompleksi

MSI-H: Mikrosatellit Instabilite-Yüksek

CEA-TCB : Karsinoembriyonik Antijen-T Hücre Bispesifik

Tim-3: T Hücre İmmunoglobulin Musin-3

UICC: Uluslararası Kanser Savaş Örgütü

B7-1: CD80 (Cluster of Differentiation 80) / B7 proteini

B7-2: CD86 (Cluster of Differentiation 80) / B7 proteini

TCR: T Hücre Reseptörü

TGF- β : Transforme büyüme faktörü beta

RBL: Eritrosit parçalayıcı tampon çözeltisi NaOH: Sodyum hidroksit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit NaCl: Sodyum klorür

WBL: Lökosit parçalayıcı tampon çözeltisi HCl: Hidroklorik asit

SDS: Sodyum dodesil sülfat

GAPDH: Gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenaz LD: Bağlantı dengesizliği

CpG: Sitozin Fosfoguanin

c-erbB1: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör Geni

DC: Dendritik Hücre

HPLC: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

NO: Nitrik Oksit

TDO: Triptofan 2, 3-dioksijenaz

TGF: Tümör Büyüme Faktörü

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TP53: p53 Geni

Tris: Tri-hidroksi metil- amino metan

ÖZET

AY, E. N. (2019). Kolorektal Kanserde Triptofan Metabolizması ve Foxp3 Arasında İmmün Sisteme Yönelik Bağlantının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kolorektal kanser tüm dünyada yaygın olarak görülen ve mortalite oranları yüksek bir hastalıktır. İmmün sistem ve kanser metabolizması üzerine artan çalışmalar, yeni immün temelli biyobelirteçlerin ve ilişkili immün yolakları hedef alan yeni ajanların tedaviye yönelik geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Birçok kanser türünde Foxp3 molekülünün immün sistemde çoğu moleküler mekanizmayı etkilediği bilinmektedir. Bu çalışmada, kolorektal kanser hastalarının, plazma triptofan düzeylerinin ve ilişkili degradasyon ürünlerinin düzeylerini araştırmak ve bu hastalardaki immün mekanizmalarda rolü olabilecek Foxp3'ü kodlayan gendeki polimorfik durumların Foxp3'ün ilgili gen anlatımını etkileme durumunun incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, KRK'lı olguların periferik kanlarından izole edilmiş DNA örneklerinden Foxp3 (rs3761548) genotipleme, "tümörlü ve sağlıklı çevre dokularından elde edilmiş cDNA örneklerinde kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ve plazma örneklerinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile triptofan, kinürenin ve kinürenik asit düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen bulgularda hasta ve kontroller arasında, kolorektal kanser hastalarında rs3761548 SNP'sine ait genotip analizinde, C allel frekansının taşınmasının daha yüksek olduğu tespit edilmiş olup, hasta ve kontrol grubu allel dağılımları açısından incelendiğinde aradaki farklılık ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p=0,012$). Ayrıca, KRK'lı hastaların tümörlü dokusu ile tümörsüz dokusuna ait Foxp3 gen ekspresyonu karşılaştırıldığında tümör büyüklüğü patolojik parametresinde istatistiksel bir anlamlılık yakalanmıştır ($p=0,021$). HPLC analizlerinde ise, KRK'lı hastalara ait plazma triptofan ($14,32 \pm 1,09 \mu\text{mol/L}$), kinürenin ($1,33 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$) ve kinürenik asit ($0,01 \pm 0,001 \mu\text{mol/L}$) düzeyleri, kontrollerde ise TRP ($26,82 \pm 1,04 \mu\text{mol/L}$), KYN ($1,42 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$), KYNA ($0,008 \pm 0,001 \mu\text{mol/L}$) düzeyleri tespit edilmiştir. Triptofan düzeyinin hasta örneklerinde kontrollere kıyasla daha düşük düzeyde olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu ortaya konmuştur ($p<0,001$). **Anahtar Kelimeler:** Kolorektal Kanser, Foxp3, Triptofan, Polimorfizm, Gen ekspresyonu, HPLC

ABSTRACT

AY, E. N. (2019). Investigation of the Immune System Connection Between Tryptophan Metabolism and Foxp3 in Colorectal Cancer. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine. PhD Thesis. Istanbul.

Colorectal cancer is a common disease that has a high mortality rate. Increasing studies on the immune system and cancer metabolism have led to the development of novel immune-based biomarkers and novel agents targeting related immune pathways. It is known that in many cancer types, Foxp3 molecule affects most molecular mechanisms in the immune system. In this study, we aimed to investigate the levels of plasma tryptophan and related degradation products in colorectal cancer patients and to investigate the effect of Foxp3 on gene expression of polymorphic conditions in the gene encoding Foxp3, which may have a role in immune mechanisms in these patients. In this context, genotyping Foxp3 (rs3761548) from DNA samples isolated from peripheral blood of CRC cases, quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) in cDNA samples obtained from tumor and healthy surrounding tissues and high performance liquid chromatography (HPLC) and tryptophan with plasma, the levels of kinurene and kinurenic acid were determined. According to the findings, genotype analysis of rs3761548 SNP in patients with colorectal cancer was found to be higher in C allele frequency among patients and controls, and the difference between the allele distributions of the patients and controls was significant ($p = 0.012$). In addition, when the Foxp3 gene expression of tumor-free tissue and tumor-free tissue of CRC patients were compared, a statistically significant difference was found in the pathological parameter of tumor size ($p = 0.021$). In HPLC analysis, plasma tryptophan ($14.32 \pm 1.09 \mu\text{mol} / \text{L}$), kinurene ($1.33 \pm 0.02 \mu\text{mol} / \text{L}$) and kinurenic acid ($0.01 \pm 0.001 \mu\text{mol} / \text{L}$) in patients with CRC were analyzed. levels, TRP ($26.82 \pm 1.04 \mu\text{mol} / \text{L}$), KYN ($1.42 \pm 0.02 \mu\text{mol} / \text{L}$) and KYNA ($0.008 \pm 0.001 \mu\text{mol} / \text{L}$) levels were determined in the controls. Tryptophan levels were lower in patient samples compared to controls and this difference was statistically significant ($p < 0.001$).

Key Words: Colorectal Cancer, CRC, Foxp3, Tryptophan, Polymorphism, Gene expression, HPLC.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanserler multifaktöriyel sebeplerle ortaya çıkan insidansı ve mortalite oranları oldukça yüksek habis bir hastalıktır [1]. Tüm dünyadaki en önemli sağlık sorunlarından biri olan kolorektal kanserler hem erkek hem de kadınlar için en sık görülen ilk beş kanserin içindedir. Türkiye’de 2012’de belirtilen istatistiklere göre kolorektal kanser, tüm kansere bağlı ölümler içinde %7,4 mortaliteden sorumludur [2]. Görülme sıklığı ve yaygınlığı yüksek olan bir kanser türü için teşhis yöntemlerinin etkinliği ve yeni yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Cerrahi müdahale ile tümörün tedavisi en temel yöntem olsa da, kanser hastalarının %30’undan fazlasında metastatik kansere sahip olduklarında cerrahi müdahale ve kemoterapi ile tedavi edilememektedir. Bu sebeple, aşırı ilerlemiş kolorektal kanserin tanısı ve tedavisi için uygulanan çalışmalar yetersiz kalmaktadır. İmmün sistem ve kanser gelişimi arasındaki kritik bağlantılar hastalığın prognozunda oldukça önemlidir. Tümör gelişimi ve immünite üzerine odaklanan immünoterapötik çalışmaları, yeni sinyal mekanizmaları hedef alan terapötik ajanların bulunmasına olanak sağlayacaktır.

Foxp3 (Forkhead box P3), X kromozomu p11.23 lokasyon yerleşkeli ve Foxp3 geninden kodlanan, çatal/kanatlı sarmal transkripsiyon faktörü ailesine ait 431 aminoasitli bir proteindir. Düzenleyici T hücrelerinde ekspresyonu yüksek immün regülatör bir protein olan Foxp3 transkripsiyon gen ekspresyonunun artması durumunda T-reg lenfositler inaktive olur ve immün sistem susturulur [278]. T hücre cevabının başlamasında dendritik hücrelerin hayati önemi, tümör mikroçevresinde triptofan metabolizması hakkında sınırlı bilgilerimiz olmasından dolayı henüz açık değildir. Antijen sunan hücrelerin, epitelyal hücrelerin, fibroblastların ya da tümör hücrelerininIDO enzim aktivitesinin T hücre cevaplarını bloke ettiği, bu blokasyon sonrasında tümör oluşumuna yol açabileceği düşünülmektedir [3]. Triptofan metabolizmasında etkili olan çeşitli enzimler, immün cevabın regülasyonunda kritik biyolojik rol oynayarak doğal bir immünosupresif mekanizma olduğunu göstermektedir. İn vitro olarak insan makrofajlarının T-hücre çoğalmasını triptofan katabolizması yoluyla inhibe ettiğinin gösterildiği çalışmalardan elde edilen veriler tümör hücreleri için genel bir immün baskılayıcı role işaret etmiştir [4],[5]. Bu çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak, triptofan metabolizmasındaki ilgili enzimleri salgılayan hücrelerin, T-hücre cevabını lokal doku çevresinde triptofana erişimi kısıtlayarak baskıladığı ileri sürülmüştür.

Böylelikle, tümör hücreleri tarafından triptofan metabolizmasında yer alan enzimlerin etkisiyle immünoşpresif mikroçevre oluşturabilmektedir [6]. Yapılan pek çok çalışmada, triptofan metabolizmasındaki çeşitli bulguların kanser ilişkili immün uyarı üzerine etkili olabileceği önerilmekle birlikte, bu etkinin hangi immün moleküler aracılığı ile gerçekleştiği konusunda halen açıklanamayan mekanizmalar bulunmaktadır [7]. Bu çalışmada, kolorektal kanser hastalarının plazma triptofan düzeylerinin ve ilişkili degradasyon ürünleri olan kinürenin ve kinürenik asitin düzeylerini araştırmayı ve bu hastalardaki immün mekanizmalarda rolü olabilecek Foxp3'un genetik varyantları ve ilgili gen anlatımının, bu mekanizmalar ile birlikteliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca gerek triptofan ve ilişkili metabolit düzeyleri gerekse de Foxp3 (rs 3761548) genotip dağılımı ve ekspresyon düzeylerini belirleyerek, bu verilerin hastaların klinik ve patolojik parametreleriyle beraber incelenmesi amaçlanmıştır.

Elde edilecek bu muhtemel kazanımlar KKK hastalarında Foxp3 molekülünün dahil edilebileceği hastalık risk ve progresyonunda önerilecek önemli biyobelirteçlerden biri olup olamayacağı potansiyeli sayesinde Foxp3 ile ilgili moleküler kanser mekanizmaları araştıran literatürlere temel oluşturabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamız kolorektal kanserlerde Foxp3 SNP, Foxp3 gen ekspresyonu, triptofan ve ilgili degradasyon ürünleri olan Triptofan/Kinürenin/Kinürenik asit düzeylerinin bir arada araştırıldığı özgün bir çalışma niteliğindedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

İnsanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip olan kanser hastalığı dünyadaki ölüm nedenleri arasında ilk sıradadır. Kolorektal kanser (KRK) ise, dünyada en sık tanı konan üçüncü malignite olup kansere bağlı ölümlerde dördüncü sırada yer almaktadır. Yapılan tahminlere göre, 2030 yılına kadar hastalığın dünyada %60 oranında artarak 2,2 milyon yeni vakanın ortaya çıkması ve 1,1 milyon kişinin ise kolorektal kanserden hayatını kaybetmesi beklenmektedir. Bu beklentinin temel nedenleri, hatalı beslenme, yüksek ve artan tütün tüketimi, çevresel faktörler ve yaşlanan nüfus olarak düşünülmektedir [1]. Yapılan bilimsel araştırmalar sonucunda geliştirilen tedavi yöntemleri kolorektal kanserlerin tedavisinde istenilen başarıyı göstermesede KRK tedavisine yönelik pek çok araştırma yapılmaktadır. Hastalığın yayılım derecesini belirlemek, tedavinin planlanması ve hastalığın seyrini tahmin etmek amacıyla evreleme sistemleri geliştirilmiştir. KRK için günümüzde en sık kullanılan evreleme (Tümör/Nod/Metastaz değerlendirme), AJCC'e (american joint committee on cancer) göre belirlenmiş olup, KRK'nın histopatolojik sınıflandırması aşağıda yer almaktadır [8].

Tablo 2-1: Kolorektal kanserler için evreleme

T: Primer Tümör	
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor.
T0	Primer tümör yok
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör submukozaya yayılımı
T2	Tümör 'muskularis propriaya yayılımı
T3	Tümör muskularis propria içinden subserozayı ya da nonperitoneal periferik veya perirektal dokulara yayılımı
T4	Tümör diğer organlara ya da viseral peritona yayılımı
N: Bölgesel Lenf Nodları	
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	1-3 bölgesel lenf nodunda metastaz
N2	4 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz
N3	Ana arter kökünde lenf nodu tutulumu

M: Uzak Metastaz	
Mx	Uzak metastaz değerlendirilemiyor.
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

2.1.1. Kolorektal Kanserin Epidemiyolojisi

KRK insidansı ve mortalitesi dünya çapında belirgin değişiklik göstermektedir. Kolorektal kanser dünyada en çok mortalite oranına sahip kanserlerden biridir. Kolorektal kanser insidansı 7/100.000 olup yılda yaklaşık 5.000 yeni vaka ve 3.200 ölümlle sonuçlanmaktadır. KRK görülme sıklığı, ekonomik olarak gelişmiş ve gelişmekte ülkelerde artmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, Avrupa, Kuzey Amerika ve Okyanusya ülkelerinde kolorektal kanser görülme sıklığının yüksek, Asya, Afrika ve Güney Amerika'da ise KRK insidansının daha düşük olduğunu rapor etmektedir [9].

Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı 2015 verilerine göre, Türkiye'de KRK, diğer kanserler ile karşılaştırıldığında yaşa bağlı olarak ortaya çıkmakta olup kadınlarda ve erkeklerde üçüncü sırada yer almaktadır. Amerikan Kanser Topluluğu verilerine göre, Amerika'da kolorektal kanser, erkeklerde ve kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenlerinde üçüncü sırada olmakla birlikte, 2019 yılında yaklaşık 51.020 kişinin KRK nedeniyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir. Ayrıca, ABD nüfusunun %5,2'sinin KRK geliştirme riski, önümüzdeki 30 yıla kadar %18'e yükseleceği tahmin edilmektedir [10]. Japonya'nın yaşamsal istatistiklerine göre ise 2015 yılında kolorektal kanser kadınlardaki malign neoplazmların en fazla ölüme neden olan türü olmuştur [11].

2.1.2. Kolorektal Kanserin Etyopatogenezi

Onkogenlerde, tümör baskılayıcı genlerde ve DNA tamir mekanizmaları ile ilişkili genlerdeki mutasyonlar kolorektal kanserin başlamasına neden olabilmektedir. Mutasyonun kökenine bağlı olarak kolorektal karsinomalar, sporadik, kalıtsal ve ailevi olarak sınıflandırılmaktadır. Kolorektal kanserlerin yaklaşık %95'ini adenokarsinom oluştururken oluşabilecek diğer kanser türleri arasında ise müsinöz karsinomlar ve adenoskuamöz karsinomlar bulunmaktadır [12].

Dünyadaki en önemli sağlık sorunlarından biri olarak görülen KRK'nın ortaya çıkmasında çevresel ve genetik faktörler önemli rol oynamaktadır. Kalıtsal kolorektal

kanserlerde germline mutasyonlar sorumluyken, sporadik vakalarda ise genetik ve epigenetik mekanizmalardaki değişimler sorumlu tutulmaktadır. Tüm KRK olgularının yaklaşık %5'i genetik aktarılan mutasyonlar sonucu gelişmektedir. Bununla birlikte genetik yatkınlık tümör oluşumunu belirli oranda arttırmasına rağmen kolorektal kanser olgularının çoğu sporadiktir.

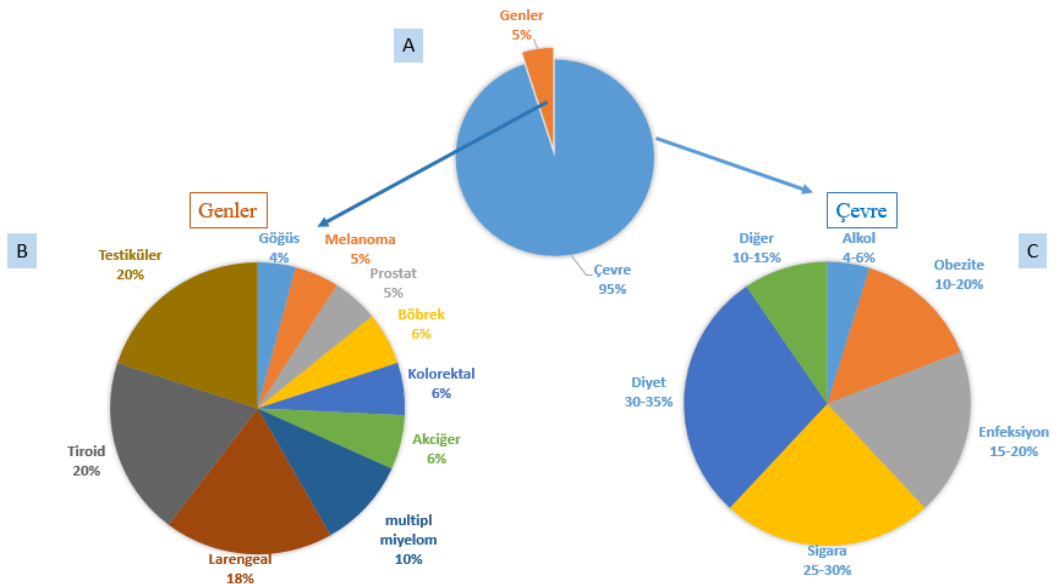
Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC) tüm KRK'lerin ortalama %5'ini oluşturan kalıtsal kolorektal kanserlerdir. FAP otozomal dominant olarak kalıtılan, tüm kolonda adenomatöz polip gelişimiyle karakterize genetik bir hastalıktır. FAP'lı hastalarda polip görölme yaşı 16 olurken, KRK ise ortalama olarak 39 yaşında ortaya çıkmaktadır. FAP gelişiminde tümör baskılayıcı APC genindeki germ-line mutasyonlar rol oynamaktadır. Lynch sendromu olarak bilinen bir diğer kalıtsal KRK herediter nonpolipozisde ise tümör, %60-70 oranında sağ kolona yerleşmektedir. DNA tamir genlerinde germ-line mutasyonları ile karakterize HNPCC, musinöz ve kötü differansiye bir kanserdir.

Genetik olmayan sporadik KRK'ların %90'ından fazlası ise 50 yaş üstü bireylerde görölmektedir. Sporadik kolorektal kanserler daha çok çevresel kaynaklı olup, obezite-kötü beslenme, hareketsiz yaşam tarzı ve sigara-alkol kullanımı ile ilişkilendirilmiştir [13].

2.1.3. Kolorektal Kanserde Risk Faktörleri

Kolorektal kanser, multifaktöriyel bir süreç olmakla birlikte genetik geçişli predispozan faktörler ve çevresel kaynaklı nedenlerin birikmesiyle ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal KRK'de germline mutasyonlar rol oynarken, sporadiklerde ise genetik ve epigenetik mekanizmalardaki farklılıklar rol oynamaktadır [14–16].

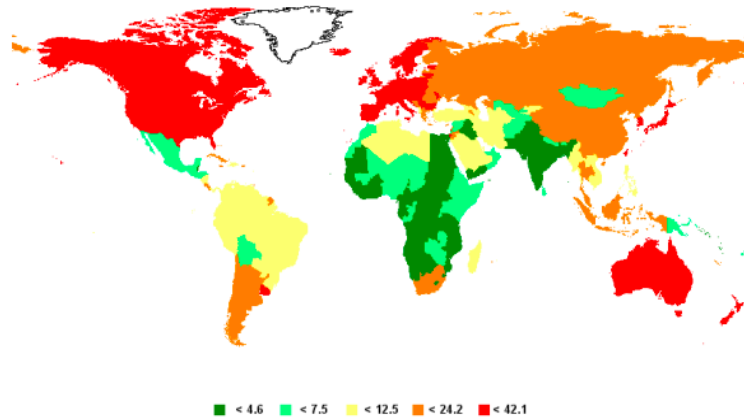
Kolorektal kanserin değiştirilebilir risk faktörleri arasında obezite, fiziksel aktivitesizlik, sigara ve aşırı alkol kullanımı yer alırken, değiştirilemez risk faktörleri arasında yaş, kolorektal poliplerin veya kolorektal kanserli bireylerin kişisel öyküsü, inflamatuvar bağırsak hastalığı öyküsü, adenomatoz polipler, FAP ve HNPCC gibi kalıtsal geçişler ayrıca tip 2 diyabet yer almaktadır [17,18].



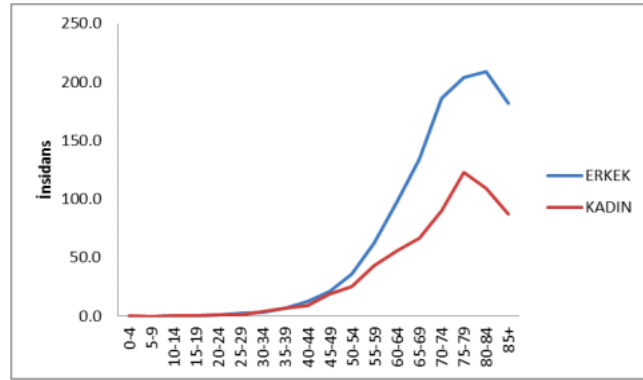
Şekil 2-1: Kanser gelişiminde genlerin ve çevrenin rolü [19]

2.1.3.1. Yaş ve Cinsiyet

Kolorektal kanser riski yaş ile artmakla birlikte olgularının %90'ından fazlası, 50 yaş ve üstü bireylerde görülmektedir. 65-85 yaş arasındaki bireylerde KKR riski 50 yaş altındaki bireylere göre 6 kat daha fazla ortaya çıkmaktadır [20,21]. KKR vakalarının %90'ı 50 yaş üzerinde iken, 80 yaş üzerinde bu oran erkekler için %10'a, kadınlar için ise %15'e kadar yükselmektedir. KKR'nin yaşam boyu görülme sıklığı yaklaşık olarak % 2,4-5 oranında gözükmeyle birlikte kişide var olan belli risk faktörleriyle bu oran daha da yükselmektedir [22].



Şekil 2-2: Dünya genelinde yaşa standardize kolorektal kanser hızı (ASRYSH 100000'de) [Globocan 2008 (IARC)]



Şekil 2-3: Türkiye’de KRK’nın erkeklerde ve kadınlarda yaşa özel hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014)

2.1.3.2. Beslenme

Beslenme tarzı ve diyet alışkanlıkları KRK için risk oluşturabileceği ifade edilmiştir. Sığır eti, kuzu eti gibi kırmızı ve işlenmiş etlerden yüksek diyet kolorektal kanser riskini artırdığı gösterilmiştir [23]. Yapılan bir çalışmada, yüksek kırmızı et tüketen KRK’lı bireyler ve kırmızı et tüketmeyenler ile karşılaştırıldığında ileri kolorektal kanserli bireylerde artmış risk ile ilişkilendirilmiştir [24]. Bir çalışmada ise, günde 80 gramdan fazla işlenmiş et tüketimi, günde 10 gram ya da daha az tüketenler ile kıyaslandığında kolorektal karsinoma gelişiminin %62 arttırdığı, ayrıca işlenmiş etlerin de uzun süreli ve yüksek alımının distal kolon kanseri riskini %50 oranında arttırdığı gösterilmiştir [25], [26].

KRK için değiştirilebilir risk faktörleri kapsamında olan sağlıksız beslenme ve diyet gereken önlemler alındığında kolorektal kanseri önlemede önemli faktörler olsa da, bu diyet faktörlerinin kolorektal kanser için yüksek genetik riske sahip bireylerdeki koruyucu rolleri hakkında kanıtlara dayalı fikir ayrılıkları bulunmaktadır [27].

2.1.3.3. Sigara

Sigara ve sigara dumanı heterosiklik aminler, polisiklik hidrokarbonlar ve nitrozaminler gibi çeşitli karsinojenler için önemli bir kaynaktır. Sigara dumanıyla kolorektal mukozaya ulaşan bu karsinojenler, KRK ile ilişkili genlerin ifadesini değiştirebilir veya genetik hasara neden olabilmektedir. Sigarada bulunan karsinojenler ile tümör baskılayıcı APC geni arasındaki ilişkiyi gösteren hayvan modeli çalışmaları yapılmıştır [21],[28]. Kolorektal kanserde sigara kullanımı hem insidans hem de mortalite

artışı ile ilişkili bulunmuştur [29],[30]. Kolorektal kansere bağlı ölüm nedenlerinin %12'sinin sigara kaynaklı olduğu gösterilmiştir [31]. Yapılan pek çok araştırma, uzun süreli sigara kullanımının kolorektal adenom riskinin 2-3 kat arttırdığını ortaya koymuştur [32]. Sigaranın kolorektal kanser lezyonlarının öncüsü olarak bilinen adenomatöz poliplerin oluşumunda ve büyümesinde etkili olduğu düşünülmektedir [33].

2.1.3.4. Alkol

Kolorektal karsinomada değiştirilebilir risk faktörlerinden biri olan alkol kullanımının, kolon kanserinin görülme sıklığını arttırdığı üzerine birçok çalışma mevcuttur [34]. Alkoldeki karsinojen asetaldehit metaboliti, aynı zamanda sigara ile etkileşime girerek DNA da spesifik hasarlara neden olabilmektedir [31,32]. Alkolün lipid peroksidasyonu ve serbest O₂ radikali üretiminde etkisi olmasıyla birlikte diğer karsinojenlerin mukoza hücrelerine transferini kolaylaştırdığı belirtilmektedir [32], [20].


2.1.3.5. Diabetes Mellitus (DM)

Yapılan birçok çalışma, diabetes mellitusun kolorektal kanser insidansını arttırdığını rapor etmektedir. Diabetes mellitus ile kolorektal karsinoma gelişimi arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik ortaya konulan hipotezlerden biri de hiperinsülinemidir. Bu hipoteze göre, kolon mukoza hücreleri için önemli bir büyüme faktörü olan insülinin artmasıyla, kanser gelişiminin de arttırdığı ifade edilmektedir [35].

2.1.3.6. Fiziksel Aktivite Yokluğu ve Obezite


Yapılan pek çok çalışmada, kolorektal kanserde değiştirilebilir risk faktörleri arasında yer alan hareketsizlik ile artan kolon kanseri arasındaki ilişkiyi doğru orantılı olarak değerlendirilmiştir [36,37]. Bir diğer KRK risk faktörü olan obezitenin, özellikle erkeklerde kolon kanseri riskini önemli ölçüde arttırdığı ispatlanmıştır [38]. Diyetle ilgili risk faktörleri arasında yer alan yağ asitleri ve nötral steroidlerin kolon karsinogenezini başlatabilecek endojen üretimi, bakteriyel yıkımı ve ekskresyonunu arttırmaktadır. Bu faktörler sonucunda ortaya çıkan hareketsiz yaşam ile birlikte obezite, diyet yağı ile bağlantılı olarak KRK riskini arttırmaktadır. Başka bir çalışmada ise, kırmızı ve işlenmiş etler gibi pro-enflamatuvar diyetlerin, tümör mikroçevresinde düşük ya da olmayan lenfositik reaksiyona sahip KRK vakalarındaki riskin, yüksek lenfositik reaksiyona sahip KRK olgularından daha fazla risk ilişkisi olduğu gösterilmiştir [21].

Tablo 2-2: Kadınlarda obezite ile ilişkili kanserler -2012 Dünya verileri [33]



KADIN	Atfedilen Risk %	Vaka Sayısı
Özofagus	33,8	3862
Kolorektal	6,2	36611
Safra Kesesi	32,3	32346
Pankreas	7,8	12269
Meme	10,2	113767
Uterus Korpusu	34	107172
Over	4	8948
Böbrek	25,9	30179

Tablo 2-3: Erkeklerde obezite ile ilişkili kanserler -2012 Dünya Verileri [39]



ERKEK	Atfedilen Risk %	Vaka Sayısı
Özofagus	33,3	13569
Kolorektal	10,3	73412
Pankreas	8,4	14845
Böbrek	16,6	34231

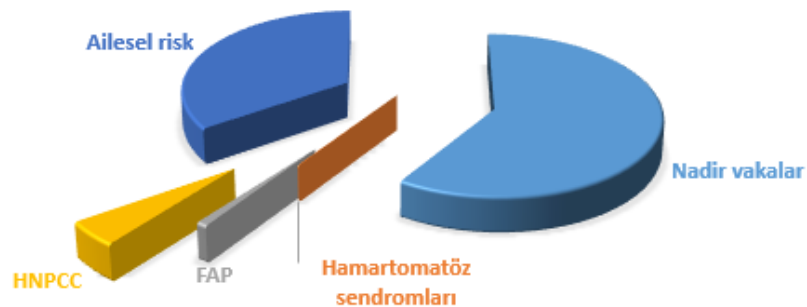
2.1.3.7. İnflamasyonlu Bağırsak Hastalıkları

İnflamasyonlu bağırsak hastalıkları (İBH) arasında yaygın olarak görülen crohn hastalığı ve ülseratif kolit, rektum ve rektum mukozalarının iltihaplanmasıdır. İBH kişinin kolon kanserine yakalanma riskini 20 kata kadar arttırmaktadır [40]. Bu sebeple, kronik inflamasyon kolorektal karsinoma için önemli bir risk faktörüdür. Kolit ile ilişkili kanser, crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi kronik inflamasyonlu bağırsak hastalığına sahip bireylerde gelişen bir KRK şeklidir [41]. İnflamasyonlu bağırsak hastalığında, genetik duyarlılık lokusunun ve çevresel faktörlerin neden olduğu bağırsak mukozal immün sisteminin düzensiz aktivasyonu yoluyla kronik enflamasyona yol açmaktadır [42].

Kolorektal kanserin gelişme riski inflamasyonlu bağırsak hastalığının aktivitesinin süresi, derecesi ve ciddiyeti ile ilişkili olduğu bulunmuştur [41]. Çeşitli tahminlerle birlikte ülseratif kolit tanısı alan kişilerin %2'sinde semptomlar ortaya çıktıktan 10 yıl sonra KRK geliştiği bildirilmiştir [42].

2.1.3.8. Aile Hikayesi

Kolorektal kanseri tetikleyen 3 önemli risk faktörü olarak kalıtsal, ailesel ve sporadik kolorektal adenomlar rapor edilmiştir. KRK'lı bireylerin yaklaşık %25'inin aile bireylerinde kolon kanserine yakalanma öyküsü bulunmaktadır [21]. 60 yaş altında olan birinci derece akrabalarında kolon kanseri hikayesi bulunan kişilerin ise kolorektal karsinomaya yakalanma riski oldukça yüksektir [43,44]. Aile hikayesi olan KRK'lı bireylerdeki bu risk artışının nedenleri tam olarak açıklanamasa da büyük olasılıkla kalıtılan genler, paylaşılan çevresel faktörler veya bunların birlikte aktivasyonlarının etkili olduğu düşünülmektedir [20].



Şekil 2-4: Kolorektal kanser tipleri ve ailesel risk faktörü [45]

2.1.3.9. Kalıtsal Faktörler

Kolorektal karsinomanın değiştirilemez risk faktörleri arasında yer alan kalıtsal faktörler, kalıtsal KRK'ların yaklaşık %5-10'unu kapsamaktadır. Kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser (HNPCC) ve Ailesel Adenomatöz Polipozis (FAP) kalıtsal KRK'larda insidansi en yüksek olanlardır [46],[36]. HNPCC (Lynch sendromu) tüm vakaların %2-3'ünü oluşturmakla birlikte en sık görülen herediter KRK tipidir. Lynch sendromu, DNA tamir genleri MLH1 ve MSH2'deki mutasyonlar ile ortaya çıkmaktadır [47,48]. HNPCC ilişkili mutasyonları taşıyan kişiler yaşam boyu %80 oranında risk taşımaktadır [49]. FAP (ailesel adenomatöz polip) ailesel adenomatöz polip, otozomal dominant kalıtılan bir hastalık olup, KRK gelişimi için yaşam boyu risk oldukça yüksektir [50,51]. Hastalık, kromozom 5q21 uzun kolundaki tümör baskılayıcı gen olan APC geninde oluşan mutasyon FAP ile ilişkilendirilmiştir. Ailesel adenomatöz polip hastalığında, erken yaşta ortaya çıkan bağırsak lümeni boyunca çok fazla sayıda kolorektal adenomatöz polipe rastlanmaktadır [52,53].

2.1.4. Kolorektal Kansere Karşı Koruyucu Faktörler

Kolorektal karsinomada posalı besinlerce zengin diyetin koruyucu özellik gösterdiği belirlenmiştir. Meyve ve sebzelerin hangi faktörler nedeniyle koruyuculuk sağladığı tam olarak anlaşılmasına rağmen içerdikleri lif, folik asit, antioksidan vitaminler, selenyum gibi bazı mineraller ya da fitokimyasal bileşiklerin kansere karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir [54]. Diğer yandan, zengin posalı bir diyetin KRK'daki koruyuculuğunun bulunmadığını gösteren çalışmalar olduğu gibi kırmızı et, hayvansal yağ ve/veya kolesterolden fakir bir diyetin de KRK gelişimini azalması üzerine çelişkili çalışmalar da bulunmaktadır [23,55,56].

Yapılan çalışmalar, düzenli fiziksel aktivite ve sağlıklı beslenmenin KRK riskini azalttığını göstermektedir. Hayatları boyunca düzenli aktivite gösteren kişilerin kolorektal kansere yakalanma riski oldukça düşük olduğu bildirilmiştir [36],[57]. Ancak düşük fiziksel aktivite ve kolorektal karsinoma riski arasındaki biyolojik mekanizma tam olarak açıklanamamıştır [58].

Aspirin ve diğer nonsteroid antiinflamatuar (NSADD) türevi ilaçların kolorektal kanserden koruyuculuğuna üzerine pek çok çalışma mevcuttur. Uzun süreli ve düzenli aspirin kullanımı KRK insidans ve mortalitesini azalttığı rapor edilmiştir. Ayrıca, NSADD türevi ilaçların kolorektal kanser ve adenomatöz poliplere karşı koruyucu etkiler

gösterdiği bildirilmiştir [20,59–62]. Bir hayvan deneyinde COX-2'yi (cyclooxygenase-2) inhibe eden NSADD türevi ilaç kullanılmış ve kolorektal karsinogenezin baskılandığı tespit edilmiştir [63].

Kalsiyum, vitamin C, D, E, indol türevleri ve beta karotenin KRK riskini azalttığı ve kansere karşı koruyucu etkilerinin olduğu düşünülmektedir [64]. Ayrıca, HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinin ve postmenapozal hormon kullanımının kolorektal karsinoma riskini düşürdüğüne dair birçok veri bulunmaktadır [65], [66].

2.1.5. Kolorektal Kanserin Teşhisine ve Tedavisine Yönelik Uygulamalar

2.1.5.1. Kolorektal Kanserin Teşhisine Yönelik Analizler

KRK'de en sık karşılaşılan klinik bulgular, bağırsak alışkanlıklarında değişiklik, karın ağrısı, güçsüzlük, anemi, hematokezya ve kilo kaybıdır. Bu klinik bulgular kolorektal kanserin yerleşim bölgesine göre değişirken erken dönemde karında sadece bir şişkinlik ve ağrı da olabilmektedir. Sol kolon lokasyonlu tümörlerde dışkılama alışkanlığında değişiklik, karın ağrısı ve bulantı ve kusma gibi obstrüksiyon semptomları ortaya çıkarken sağ kolon yerleşimli tümörlerde ise yine karın ağrısı ile fiziksel muayenede ele gelen kitle izlenebilmektedir. Ayrıca, pelvik ağrısı olan bireylerde hastalığın ileri bir evrede olduğunu ve tümörün pelvik sinirlere yayıldığını düşündürmektedir [67].

Kolorektal karsinomada, karsino embriyogenik antijen (CEA)'nin serum düzeyinin prognostik önemi oldukça yüksektir. Bununla birlikte, ameliyat öncesi CEA düzeyi > 5 ng/ml ise kötü prognoz göstergesidir. Tanıda kullanılan en iyi yöntem olan kolonoskopi ile tümör ya da öncül lezyonları direkt olarak gözle görülerek belirlenebilir, lokalizasyonu net olarak saptanabilir, biyopsi alınabilir ya da uygunsa endoskopik olarak lezyon tamamen çıkarılabilmektedir [68]. Kolonoskopi dışında tek ve çift kontrast kolon grafisi, fleksibl sigmoidoskopi, BT (Bilgisayarlı Tomografi) ve MR (Manyetik Rezonans Görüntüleme) da tanıda kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. KRK'lerin büyük çoğunluğu adenomatöz polip formunda iken tarama ve izlem sırasında tespit edilebilmektedir. Kolorektal kanser taramasında amaç, adenomatöz polipleri erken dönemde saptamak, çıkarmak ve bunun sonucunda tümör gelişimini önlemek, kansere bağlı morbidite ve mortaliteyi azaltmaktır. Kolorektal kanser taramasında ise dışkıda gizli kan testi (DGKT), fleksibl sigmoidoskopi (FS), kolonoskopi, tek ve çift kontrastlı kolon grafisi, virtual kolonoskopi BT gibi çeşitli tanı yöntemleri kullanılmaktadır [69].

Ayrıca, kolorektal tümörler histopatolojik olarak da incelenmektedir. Kolorektal tümörlerin histopatolojik incelemesinde az differansiye veya andifferansiye olanların kötü prognoz belirttiği saptanmıştır. Histopatolojik olarak analiz edilen KRK olgularındaki tümörler, lenfoma, karsinoid ve sarkomlar olduğu gibi primer kolorektal tümörlerin %90-95'inin ise adenokarsinomlardan oluştuğu bilinmektedir [70].

2.1.5.2. Kolorektal Kanserin Tedavisine Yönelik Uygulamalar

Multifaktöriyel nedenlerle ortaya çıkan KRK'lerin tedavilerine yönelik gelişmeler gün geçtikçe artmaktadır. Kolorektal kanserin tedavisi temel olarak tümörün büyüklüğü, yerleşimi ve yaygınlığına göre planlanmaktadır.

Cerrahi Tedavi

KRK'de en sık kullanılan tedavi yöntemi olan cerrahi müdahale tedavisinin esas amacı, tümörün vücuttan uzaklaştırılmasıdır. Operasyon sırasında genellikle tümör, bir kısım sağlıklı kolon, rektum ve çevresindeki lenf bezleri ile birlikte alınmaktadır.

Kemoterapi

Kanserli dokunun küçültülmesi, hastalık belirtilerinin azaltılması amacıyla ilaç kullanılarak kanser hücrelerinin yok edilmesidir. Kemoterapi sistemik bir tedavi olup, ilaç yalnızca tümör bölgesinde değil, tümör dışı bölgedeki kanserli hücrelerde de etkili olmaktadır.

Radyasyon Tedavisi – Radyoterapi

Radyasyon tedavisi bölgesel bir tedavi yöntemi olup sadece uygulandığı bölge üzerinde etkili olmaktadır. Kolorektal kanserlerde tümörün küçültülebilmesi için genellikle ameliyat öncesi dönemde de uygulanmaktadır. Operasyon sonrasında da kalmış olabilecek kanserli hücrelerinin vücuttan uzaklaştırılması için kullanılmaktadır. Radyoterapi ayrıca hastalık belirtilerinin giderilmesinde de kullanılabilir.

Biyolojik Tedavi- Kanser İmmünoterapisi

Son yıllarda kolorektal kanserin tedavisindeki olumlu gelişmeler metastatik safhadaki hastaların sağ kalım oranlarını arttırmıştır fakat daha başarılı tedavi

seçeneklerine halen ihtiyaç duyulmaktadır. İmmün sistemin tümörün oluşumu, büyümesi ve metastazının önlenmesinde önemli rolünün olduğuna dair bilgiler, yapılan çalışmalarla birlikte artmaktadır. İmmünoterapi tedavileri, pek çok kanser türünde olumlu yanıtlar alınması nedeniyle KRK’de de dikkat çekmektedir. Kanser immünoterapisi vücudun bağışıklık sisteminin kansere karşı güçlendirme yöntemidir. İmmünoterapi yönteminde vücudun doğal antikanser özelliği uyarılmakta ve desteklenmektedir. Böylece bu tedavi yöntemi ile bağışıklık sistemi hücreleri kanserli hücreleri tespit ettikten sonra yok etmektedir. Kolorektal kanserde immünoterapi yöntemi gerek yüksek maliyeti gerekse birtakım yan etkileri sebebiyle rutinde yaygın olarak tercih edilmese de ameliyatlardan sonra tek başına ya da kemoterapi ile birlikte uygulanabilmektedir.

Geleneksel kanser tedavi yöntemlerine kıyasla kanser immünoterapi uygulamalarının başarısı oldukça dikkat çekmektedir. Yapılan pek çok çalışma kolorektal tümör dokusunda tümör infiltre edici lenfositlerin (TIL) bulunması iyi prognozla ilişkilendirilmesi kolorektal kanserde immünoterapinin önemini düşündürmektedir [71]. Ayrıca, çeşitli kanser türleri üzerinde yapılan araştırmaların kemoterapi ve radyoterapiye dirençli tümörlerin immunoterapiye aday olduğunun belirlenmesi ile immünoterapinin KRK’lerin ileri evreleri için de bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir [72],[73], [74].

Spesifik olmayan bir immunoterapi yaklaşımı olan IL-2 (interlökin-2) ile yapılan araştırmalarda, bu yaklaşımın metastatik kolorektal kanserde etkili olmadığı gözlenirken, adjuvan tedavide standart tedaviye eklendiğinde potansiyel olarak yararlı olabileceği gösterilmiştir [75]. Kolorektal kanser tedavisinde yıllardır kullanılmakta olan monoklonal antikorlar yüksek spesifiteye sahip ve klinik olarak etkili immün tedavi ajanlarıdır. Panitumumab ve Setuksimab gibi EGFR’yi (Epidermal büyüme faktörü reseptörü) hedefleyen ve Bevacizumab gibi VEGF’ü (Vasküler endotelial büyüme faktörü) hedefleyen monoklonal antikorlar, önemli sinyal yollarının inhibisyonlarını ve doğal immün efektör mekanizmaları kullanma yoluyla antikor bağımlı sitotoksositeye neden olmaktadır [76]. Mevcut kanser immünoterapi çalışmalarının yetersizliği ve sağladığı katkının sınırlı olması gerekse önemli orandaki yan etkileri nedeniyle rutin tedavide kullanılmamaktadır. Ancak kolorektal kanser ile ilgili mevcut immünoterapi araştırmaların kapsamlı bir kısmı geleneksel olanlardan daha az agresif ve daha etkili olan tedavilerden oluşmaktadır. Kanser immünoterapisi alanında gerçekleştirilecek umut

vadedici keşifler ve klinik uygulamalarının, gelecekte KKK hastalarının genel sağ kalım ve yaşam kalitesini arttıracakı düşünölmektedir.

2.1.6. Kolorektal Kanserde Onkogenik Aktivasyon

Kolorektal karsinomanın, onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ile tümör supresor genlerin ise mutasyonel inaktivasyonu sonucunda ortaya çıktığı bildirilmektedir. Karsinogeneizde, onkogenler tek nokta mutasyonu şeklinde veya genin aşırı ifadesi şeklindeki mutasyonel değışikliklerle aktive edilmektedir. Sadece bir allelin değışikliğı malign oluşumu başlatmak için yeterli olmayan bu etki transdominans etki olarak kendi göstermektedir [77].

Kolorektal tümörlerde en fazla ortaya çıkan onkogenler *c-Ki-ras* ve *c-Myc* olup daha az izlenen onkogenler ise *c-Src*, *c-Myb* ve *c-erb-B2*'dir [78]. *C-Ki-ras*, hücre membranında mitojenik mesajların iletiminde görev alan bir proteinin sentezinden sorumlu olan bir onkogendir. *C-Ki-ras*'da meydana gelen nokta mutasyonları kolorektal kanserlerin %39-71'inde ve adenomatöz poliplerin ise %42'sinde izlenmektedir [79],[80],[81]. Kolorektal karsinoma gelişiminde en sık izlenen bir diğör onkogen olan *c-Myc*, DNA sentezi için gerekli olan nükleer fosfoproteini kodlamaktadır. Kolorektal tümörler, *c-Myc* onkogeninin aşırı ekspresyonu ile aktive olmaktadır. Yapılan birçok çalışmada, adenom ve KKK'li bireylerin %60-70'inde RNA'da *c-Myc* ekspresyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir [79],[80],[81].

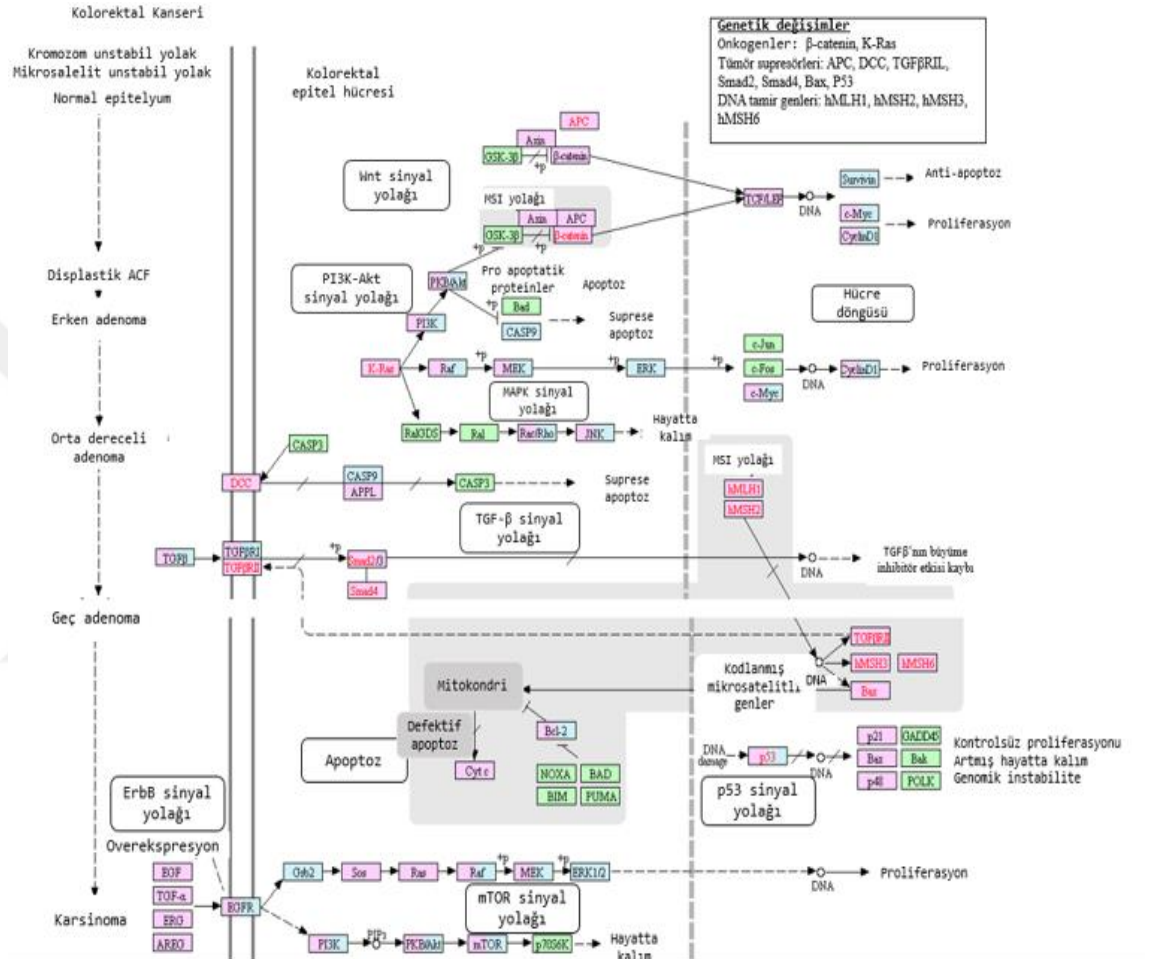
Diğör yandan, onkogenlere göre tümör supresor (baskılayıcı) genler ise resesif aktivite paterni göstermektedir. Tümör supresor genler üzerindeki mutasyonel değışiklikler için nokta mutasyonu, delesyon ya da her ikisinde de her 2 allelin inaktivasyonu gerekmektedir [77]. Örneğın, FAP sendromu APC tümör baskılayıcı geninde nokta mutasyon sonucu gelişmektedir. Bu sendromda, APC geni germline olarak kalıtılır ve kromozom 5q21 koluna yerleşmiştir [82]. DCC geni ise, 18. Kromozoma lokalize bir tümör baskılayıcı gen olup, kolorektal kanser olgularının %73'ünde ve adenomaların ise %11'inde aktivasyonu mevcuttur [80]. Kromozom 18q lokasyon kaybına neden olan DCC genindeki bu mutasyon ile hücreler arasındaki ilişkinin bozulmasıyla birlikte tümör büyümesi ve invazyon artmaktadır [83].

Genomik instabilite, kolorektal karsinomanın altında yatan en önemli sebeplerden biri olmaktadır. Kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilitesi (MSI) ve CpG ada metilat fenotipi (CIMP) genomik instabiliteye yol açan patojenik mekanizmalardır. KRK olgularının %80-85'inin nedeni kromozom sayısındaki dengesizliklerle karakterize edilen ve anuploidik tümörlere yol açan CIN yolağıdır. Kromozomal instabilitenin (CIN), temelini oluşturan mekanizmalar arasında APC, KRAS, PI3K ve TP53 gibi hücre fonksiyonunun korunmasında rol oynayan kritik genleri etkileyen kromozom ayrımı, telomer disfonksiyonu ve DNA hasar yanıtı değişiklikleri içermektedir. APC mutasyonları, katenin'in çekirdeğe translokasyonuna, tümörgenezisde ve invazyonda yer alan genlerin transkripsiyonunun başlamasına neden olurken, KRAS ve PI3K'daki mutasyonlar MAPK'ın sabit bir aktivasyonuna yol açmaktadır, böylece hücre çoğalmasında da artmaktadır. Sonuç olarak, hücre döngüsü kontrol noktası olan p53'ü kodlayan TP53'teki fonksiyon kaybı mutasyonları hücre döngüsünde kontrolsüz bir girişe neden olmaktadır [84].

Mikrosatellit instabilite yolağı (MSI), DNA tamir mekanizmalarının kaybına bağlı olarak hipermik bir fenotipten kaynaklanmaktadır. Kısa DNA zincirlerini veya tandem tekrarlarını onarma yeteneği, mikrosatellit instabilite olan tümörlerde azalır bu nedenle, mutasyonlar bu bölgelerde birikme eğilimi göstermektedir. Bu mutasyonlar, kodlanmış mikrosatellitlerde olduğu gibi kodlamayan bölgeleri de etkileyebilir. Onkogenlerin okuma çerçeveleri veya mikrosatellitlerdeki kodlanmış tümör baskılayıcı genler değiştiğinde tümörler gelişmektedir. Yanlış eşleşme onarım gen (MMR) ifadelerinin kaybı, spontan olaylar (promoter hipermetilasyonu) veya Lynch sendromunda olduğu gibi germlinal mutasyonlardan kaynaklanabilir. Bu tümörler çoğunlukla diploiddir ve daha az LOH bulundurmaktadır. Mikrosatellit kararsızlığı olan tümörlerde MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 ve PMS2 genlerinin mutasyona uğradığı belirlenmiştir [85]. Genel olarak, MSI tümörleri sporadik tümörlerden daha iyi prognoza sahip olduğu bilinmektedir [86].

Epigenetik instabilite nedeniyle CpG ada metilat fenotipi ortaya çıkmaktadır. CIMP tümörlerinin temel özelliği genetik susturma ve protein ifade kaybına neden olan onkogen promotörlerin hipermetilasyonudur. Genetik ve epigenetik değişiklikler kolorektal kansere özgü olmamakla birlikte her ikisi de nokta mutasyonlarından çok gen metilasyonu ile işlev görmektedirler [87]. Çoğu CIMP tümörlerindeki mikrosatellit

instabilitesinin yanı sıra BRAF mutasyonlarının varlığı kolorektal karsinomanın gelişim aşamalarında genetik ve epigenetik etkilerin kombinasyonuna örnek olarak verilebilir [88].



Şekil 2-5: Kolorektal kanserin moleküler mekanizmaları - KEGG Yolu

2.1.6.1. Kolorektal Kanserde Moleküler Hedefler

Anahtar moleküler biyobelirteçler, kolorektal kanserlerin biyolojik heterojenliğini anlamak, ayrıca prognoz ve tedavi yanıtını öngörmeye kullanılabilecek alt tiplere sınıflandırılması ve nüks riskini anlamak için oldukça önemlidir. Bu önemli moleküler özelliklerin veya yolların kişiselleştirilmiş terapilerdeki hedefleri gösterebilme potansiyeli bulunmaktadır [89].

2.1.6.1.1. CIN (chromosomal instability) Sinyal Yolağı

Genomik instabilite kazanılması tümörnezeis için önemli bir özellik olup kolorektal karsinogeneze CIN, MSI ve CIMP olmak üzere 3 temel yolaaktan oluşmaktadır [84]. Kolorektal karsinomada CIN yolağı, MSI veya CIMP yolaqları ile karşılaştırıldığında %75-85 oranında daha fazla ortaya çıkmaktadır. KRK'larda CIN'in nedenlerini belirleme konusunda önemli ilerleme kaydedilmesine rağmen, altta yatan mekanizmaları halen tam olarak bilinmemektedir [84],[80].

Çeşitli mekanizmaların TP53 ve APC gibi kritik genleri etkilemesiyle kromozom ayırımı, telomer disfonksiyonu ve DNA hasar cevabında değışiklikler ortaya çıkmaktadır. Temel hücre döngüsü kontrol noktası geni olan TP53'ün fonksiyon kaybı mutasyonları, hücre döngüsünde kontrolsüz bir çoğalmaya neden olmaktadır [84]. CIN'li KRK'lar, genom boyunca kapsamlı SCNA'ların (somatik kopya numarası değışikliği) varlığı ile karakterize edilir ve anöploidik tümörler ve heterozigotluk kaybıyla sonuçlanır [90]. Kromozomal segregasyondaki kusurlarla ilişkili olan APC mutasyonları CIN ile de güçlü bir şekilde ilişkilidir bu nedenle, kolorektal kanserlerde CIN yolağının aktivasyonu kanserin ilerlemesini artırması arttırmaktadır [91],[84]. APC, WNT sinyal yolağının bir parçasını oluşturur ve inaktivasyonu, nükleer CTNNB1 ifadesini ve hücre proliferasyonunda bir artışla sonuçlanmaktadır [92]. Bu nedenle, WNT sinyal yolağı CIN yolağı, kolorektal karsinomada çok önemli bir rol oynamaktadır.

2.1.6.1.2. LINE-1 hipometilasyonu

Kolorektal tümörlerde LINE-1 hipometilasyonu, erken yaşta başlamış, KRK'li bireylerin aile öyküsü, azalmış müsin, MSS ve CIN yolaqlarının aktivasyonu ve BRAF yabani tip fenotipi bulunmasıyla karakterizedir [93]. Kolorektal karsinomada LINE-1 hipometilasyonu yüksek mortalite ile ilişkili bulunmuş olup tümör LINE-1 metilasyon seviyesi, agresif karsinomları tanımlamak için yararlı bir prognostik biyobelirteç olabilmektedir [94].

Somatik bir LINE-1 insersiyon APC geninde, ikinci APC allelindeki bir nokta mutasyonu ile birlikte kolorektal klasik iki vuruşlu KRK yolu ile kolorektal tümörnezeisi başlattığı gösterilmiştir [95]. Kolorektal kanserin özellikle erken dönem formu için LINE-1'in dolaşımdaki hücrede DNA'nın hipometilasyon durumu plazmada potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilir [96].

2.1.6.1.3. MAPK / PIK3 Yolağındaki RAS, BRAF ve PIK3CA Mutasyonları

MAPK ve PIK3 (PI3K) yolakları hücre proliferasyonunda etkin rol oynamaktadır. Bu yolaklarda ortaya çıkan değişiklikler tümör hücreleri için proliferatif avantajlar sağlamaktadır. Kolorektal tümör genezisde MAPK / PIK3 yolaklarını etkileyen en yaygın mutasyonlar KRAS, BRAF ve PIK3CA mutasyonlarıdır. KKR'ların yaklaşık % 40'ında KRAS mutasyonları gözlenmektedir [97],[98],[99]. Buna karşılık, KKR'ların sadece % 2,5 - 4,5'inde NRAS mutasyonlar izlenmektedir [97],[100].

Kolorektal kanserde anti-EGFR antikor tedavisi uygulanmaktadır. Uygulanan anti-EGFR antikor tedavisinde KRAS ve NRAS mutasyonlarının tedaviye direnç gösterdiği tahmin edilmektedir [101]. Buna karşılık yapılan çeşitli araştırmalarda, KKR hastalarında KRAS mutasyonlarının prognozla olan ilişkisinde çelişkili yorumlar bulunmaktadır [97],[102],[103]. KRAS mutasyonlarının sağ kalım üzerindeki olumsuz etkisinin distal kolon kanserlerinde proksimal kolon kanserlerinden daha fazla olduğu rapor edilmiştir [104]. Diğer yandan, BRAF ve PIK3CA mutasyonlarının da yine anti-EGFR antikor tedavisine dirence katkı sağladığı ortaya koyulmuştur [101],[105],[106]. PIK3CA mutasyonları, kolorektal kanser hastalarının %10-20'sinde izlenmekte olup KRAS mutasyonu ve CIMP-pozitif fenotipi değişiklikleri içeren mekanizmalar ile ilişkili bulunmuştur [97]. PIK3CA, EGFR'nin PIK3 alt sinyal yolağı için oldukça önemli bir bileşenidir. PIK3CA mutasyonu PIK3'ü sinyal yolağını aktive etmesiyle hücre çoğalması artar ve bunun sonucunda karsinogenez gelişmektedir. RAS mutasyonlarında ve BRAF mutasyonlarında olduğu gibi PIK3CA mutasyonları, anti-EGFR antikor tedavisine karşı direnç gösterdiği düşünülmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, PIK3CA mutasyonlarına sahip KKR vakalarında, prostaglandinler tarafından üretilen ve enflamatuvar düzenlemede kritik rol oynayan bir molekül olan COX2 (PTGS2)'nin aşırı ifade edildiği gösterilmiştir. Aspirin, COX2 ifadesini ve PIK3 sinyal yolağını baskılamaktadır. Yapılan çalışmalar, kolorektal karsinomada düzenli aspirin kullanımının, PTGS2'nin aşırı ifade riskini azalttığını göstermiştir [107],[108]. Benzer şekilde, bir araştırmada düzenli aspirin kullanan PIK3CA mutasyonuna sahip KKR hastaları düşük mortalite ile ilişkilendirilirken, PIK3CA mutasyonu olmayan KKR'li bireylerde bir ilişki saptanamamıştır [109]. Popülasyona dayalı bir kohort çalışmasında, aspirin kullanımı ile sağ kalım arasındaki ilişkinin COX2 ekspresyonuna göre farklılaştığını ancak PIK3CA mutasyon durumuna göre farklı olmadığını göstermiştir [110]. Başka bir çalışmada ise,

KRAS mutasyonu olmayan KRK'li bireylerde steroid olmayan anti-enflamatuar ilaçların (NSAID) düzenli kullanımının, hastalarda sağ kalımda iyileşme ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir [111]. Genom çapında tek nükleotid polimorfizm (SNP) verileri, aspirin ve/veya NSAID'lerin kullanımının 12. ve 15. kromozomlarındaki iki SNP'deki genetik varyasyona göre KRK'li bireylerdeki riskin düşük olduğunu önermiştir [112].

2.1.6.1.4. WNT / APC / TGF- β Sinyal Yolağı

Sporadik KRK'lerin çoğu, WNT (kanonikal sinyal yolağı) sinyal yolağının anormal aktivasyonunu göstermektedir. APC'nin genetik olarak bozulması, WNT sinyal yolağının aktivasyonuna yol açar ve bu kolorektal tümörgeze için kritik bir erken genetik durumdur. Bir çalışmada, WNT sinyal yolağının gerek hipermutasyonlu gerekse mutasyonsuz KRK'li bireylerin %90'undan fazlasında aktive edildiği belirtilmiştir [90]. Kolorektal kanserin yaklaşık %80'inde APC mutasyonları ortaya çıkarken, %5 - %10'unda ise WNT sinyallerinde mutasyonlar veya epigenetik değişiklikler bulunmaktadır [80], [90]. APC geni sadece WNT sinyal yolağının yalnızca kritik bir negatif regülatörü olmadığı gibi aynı zamanda kromozomal ayırım, hücresel farklılaşma, adezyon, migrasyon ve apoptozun düzenlenmesinde de kritik rollere sahiptir. Kolorektal tümörgeze, TGF- β 'yi içeren kromozomal değişiklikler CIN yolağına katılmaktadır. Kromozomun 18q lokasyonunda fonksiyon kaybı, TGF- β sinyal yolağının inaktivasyonu ile temel genomik değişikliklerden biridir. Kromozom 18q lokasyonunda, iki önemli tümör baskılayıcı gen için olan SMAD2 ve SMAD4 genlerini kodlamaktadır. Bu tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı TGF- β sinyal yolağının inaktive eder ve böylece hücre proliferasyonu artmakta ve apoptozisden kaçmaktadır. Kolorektal kanserlerin büyük bir çoğunluğunda TGF- β sinyal yolağının inaktivasyonu ve/veya WNT sinyal yolağının aktivasyonu yoluyla kolorektal karsinomada önemli role sahip MYC aktivasyonunu ortaya çıkarmaktadır [90].

2.1.6.1.5. TP53 Mutasyonları

TP53, en önemli tümör baskılayıcı genlerden biridir ve hücre döngüsü kontrol noktası regülatörüdür [113]. TP53'ün inaktivasyonu ile aşırı hücre çoğalması ortaya çıkmakta ve tümörün ilerlemesini sağlanmaktadır. Buna ek olarak, yapılan çalışmalar adenomdan invaziv karsinomaya geçiş genellikle TP53'ün inaktivasyonu ile

ilişkilendirilmiştir [113],[80],[114]. TP53'ün lokalize olduğu kromozom 17q lokasyon fonksiyon kaybı, KRK'lerde sık izlenen bir durumdur, çünkü TP53 kanonik adenom-adenokarsinom dizisinde kritik bir rol oynamaktadır [90].

2.1.6.2. Kolorektal Kanserde İmmün Moleküler Hedefler

KRK'lerin moleküler özelliklerinin belirlenmesindeki potansiyel gelişmeler, klinik süreçlerin daha spesifik olmasına, moleküler olarak karakterize edilmiş alt tiplere yönelik terapötik hedeflerin bulunmasına ve heterojen bir hastalık grubundan evrilmesine izin verecektir. Ayrıca, belirli bir kolorektal kanser alt tipine özgü kilit moleküler özelliklerin veya yolakların tespit edilmesi, uyarlanmış tedavilerin uygulanmasını ve daha iyi hasta yönetimini mümkün kılan potansiyel terapötik hedefleri temsil edebilecektir. Bununla birlikte kanser immünoterapisi, kolorektal kanserler dahil çeşitli malignitelerin tedavisi için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır. Son çalışmalar, tümör mikroçevresinde tümörün moleküler özellikleri ve immün hücreler arasındaki karmaşık ilişkilerinin önemini ortaya koymaktadır [115],[116]. Ortaya çıkan kanıtlar, tümöre karşı gelişen immün yanıt ile birlikte tümörün moleküler özelliklerinin etkileştiğini önermektedir [117],[118]. Ayrıca, tümör mikroçevresindeki bağışıklık kontrol noktası mekanizmalarının, anti-tümör T hücresi aracılı immün yanıtın baskılanmasında kritik rolleri olduğunu gösterilmiştir [119],[120],[121],[122],[76],[123].

T hücrelerinin PDCD1'e (PD-1) bağlanması ile immünosüpresyonunu destekleyen bir immün modülatör olan CD274 (PD-L1) aktive edilmektedir. CD274 molekülü, PDCD1 reseptörü yoluyla immün yanıtın negatif olarak düzenlenmesinde yer almaktadır. PDCD1 ve CD274'ü hedef alan terapötik antikolar, KRK'ler dahil birçok malignitede etkili olmaktadır [120],[122]. Tümör CD274 ekspresyonunun, PD1/PDL1 tedavilerine daha iyi yanıt veren potansiyel bir biyobelirteç olduğu düşünülmektedir [124],[125]. Tümörlerdeki CD274'ün ekspresyon seviyesi, Foxp3+ düzenleyici T hücrelerinin yoğunluğu ile ters orantılıdır, bu da bağışıklık kontrol noktası yolu ile kolorektal karsinogenezde konak immünesi arasındaki potansiyel etkileşimleri ortaya koymaktadır [126].

Mikrobiyota intestinal enflamasyonu etkileyerek ve tümör ile ilişkili sinyal yolunu modüle ederek, KRK'de tümörün başlatılması ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir [127], [128],[129],[130]. Yapılan bir araştırmada, kolorektal karsinoma dokularında, malign

olmayan kolorektal dokulara kıyasla daha fazla *Fusobacterium nucleatum* fazlalığı tespit edilmiştir [131],[132]. KRK hücrelerinin tümörjenik aktivitesi, TLR4 sinyalinin MYD88'e sinyal aktivasyonu, NFKB aktivasyonuna ve MIR21 (miR21) ekspresyonunu arttırması yoluyla *Fusobacterium nucleatum* ile enfeksiyondan sonra artmaktadır[133].

Her ne kadar kolorektal karsinomanın moleküler özellikleri ve sınıflandırmaları, uyarlanmış tedavilerin veya prognostik öngörücülerin potansiyel hedefleri olarak ayrıntılı bir şekilde tanımlanmış olsa da, rutindeki klinik uygulamalarda hedefli tedavi ve prognostik işlemler için daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır [134].

2.1.6.3. Kolorektal Kanserde Metabolik Süreçler

Kolorektal kanserde hastalığın normal epitelden malign fenotipi geliştirmesinde çeşitli biyokimyasal ve genetik değişiklikler etkili olmaktadır. Deneysel ve epidemiyolojik kanıtlar, diyet ve beslenmenin kolon kanseri başlangıcını ve ilerlemesini modüle etmede anahtar faktörler olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, antitümör aktivitesine sahip diyet bileşenlerinin tanımlanması ve etki mekanizmalarının araştırılması, bu neoplazmaların önlenmesinde önemli ilerlemelere yol açabilecektir. Ayrıca, bazı beslenme faktörlerinin kolorektal kanserlerine karşı potansiyel korumanın, hücre proliferasyonu ve büyümedeki modifikasyonlarla ilişkili olabileceği görülmektedir. Doğal olarak oluşan poliaminler, spermin, spermidin ve putresin, hücre göçünde ve hiperproliferasyonda kilit bir rol oynamakla birlikte kolorektal tümörigenezin tüm aşamalarında yer almaktadır. Yapılan bir çalışmada, düzensiz hiperproliferasyonun bir ölçümü olarak mukozal poliamin seviyelerinin kanser riski ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu ayrıca neoplastik proliferasyon için ise spesifik bir belirteç olarak kabul edilmiştir [135].

Hücre proliferasyonunu modüle etmede ilgi çekici potansiyele sahip takviyeler, bazı laktik asit üreten enterobakteriyel gıda destekleri ve probiyotiklerdir. Probiyotiklerin kronik malign olmayan hastalıkları ve gastrointestinal sistem kanserini önlediği iddia edilmiştir [136],[137]. Probiyotikler, genellikle yoğurt, mayalı süt veya diğer mayalı gıdalarla alınmaktadır. Probiyotiklerin etkilerini uyguladığı mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir, ancak bağırsak pH'nın modifikasyonunu, antimikrobiyal bileşiklerin üretilmesi yoluyla patojenlerin antagonizmini, patojen bağlama ve reseptör bölgeleri için mevcut besinler ve büyüme faktörleri, immünomodülatör hücrelerin uyarılması ve laktaz

üretimi yapmaları söz konusudur [138]. Genel olarak, kolon kanserogenezini önleyen beslenme faktörleri aynı zamanda büyüme inhibitörleri ve apoptozun indükleyicileridir [139].

Yeniden programlanan enerji metabolizması kanserin bir özelliği olarak ortaya çıkmıştır [140]. Kanser hücreleri, düzensiz hücre büyümesi ve anormal farklılaşma sonucu ortaya çıkan anabolik taleplerini karşılamak için değiştirilmiş hücresel metabolizmaya güvenmektedir. Tümör metabolizmasında en iyi çalışılmış değişim, aerobik glikoliz veya Warburg etkisine bağımlılıktır. Bu değişiklik, oksidatif fosforilasyondan glikolize geçişin bir sonucu olarak aşırı piruvat ve laktat üretimiyle sonuçlanmakta olup, tümör büyümesine avantajlar sağlamaktadır. Bu ve diğer biyokimyasal değişiklikler, kanser hücrelerinin karakteristiği olan eşsiz bir metabolik profile neden olarak kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırt etme şansı sağlamaktadır. Bu konu üzerine yoğunlaşan araştırmalar, böylesi farklılıkların biyobelirteçler ve terapötik hedefler olarak kullanılmasını amaçlanmaktadır [141], [142]. Yüksek Hareketlilik Grubu A1 (HMGA1) geninin aşırı ekspresyonu, KRK'de dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde tümör ilerlemesi ile karakterizedir [143],[144],[145],[146]. KRK hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, epitelyal-mezenkimal bir geçişe katılan genleri düzenleyen HMGA1 geninin, kök hücre transkripsiyon ağlarını indükleyerek tümörün ilerlemesini sağladığı öne sürülmektedir [147].

2.1.6.3.1. Tümör Hücrelerindeki Hızlandırılmış Glikoz Metabolizması - “Warburg Etkisi”

Hücreler çeşitli fonksiyonlarını yerine getirmek için enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Glikoz çoğu hücre için birincil enerji kaynağı olup, hücre çoğalması ve hayatta kalması için oldukça önemlidir. Buna ek olarak, hücreler ATP formunda enerji üretmek ve hücre büyümesi için biyomoleküller oluşturmak için lipitleri veya glutamin gibi amino asitleri kullanmaktadır. Sağlıklı glukozu esas olarak oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yoluyla metabolize edilirken, tümör hücreleri esasen ilk olarak neredeyse bir yüzyıl önce Otto Warburg tarafından tarif edilen bir fenomen olan glikoz metabolizması için glikolizi kullanmalarıdır [148]. Bu metabolik değişimin tümör gelişimi ve ilerlemesi için önemli olduğu ve kanserin ayırt edici özelliği olduğu açıkça belirtilmiştir [140]. Yapılan araştırmalar, çok sayıda çoğalan hücrelerin glikolize geçtiklerini ifade etmişlerdir, çünkü mitokondri yapı taşlarının üretimi için anabolik organeller olarak glikolizin gerekli

olduğunu göstermiştir [141],[149]. Hızlandırılmış glikoliz hipoksi, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin yanı sıra rapamisinin memeli hedefi (mTOR) gibi kinazlarla da düzenlenmektedir. Glukoz laktata metabolize edilir, ikincisi monokarboksilat taşıyıcılar (MCT), MCT-1 ve MCT-4 ile protonlu kotransport içindeki tümör hücrelerinden dışarıya verilir ve bu durum da tümör mikroçevresindeki pH'ı düşüren laktat birikimi ile sonuçlanmaktadır [150]. Yapılan çalışmalar, tümör hücrelerinin “glikolitik fenotipinin”, büyüme avantajı sağladığını ve invaziv malignitelerin evrimi için gerekli olduğunu hipotezini ortaya koymuştur [151]. Bu hipotez ışığında tümör dokularında laktat konsantrasyonu ile metastaz insidansı arasında bir korelasyon bulunmuştur [152]. Bununla birlikte, Warburg etkisi, karmaşık tümör metabolizmasının yalnızca bir parçası olup, amino asit, lipid ve adenosin metabolizmalarının da tümör hücrelerinin biyokimyasal ihtiyaçlarını karşılamak için de uyarlanmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen kanıtlar, gelişmiş glikolizin ve düşük oksidatif fosforilasyonun, Warburg etkisiyle KRK'de meydana geldiğini ortaya koymaktadır [153],[154], [155],[156].

2.1.6.3.2. Amino Asit Metabolizması

Hipoksik dokularda hücre dışı adenosin konsantrasyonunda önemli bir artış olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, HIF-1a'nın (Hypoxia-inducible factor 1-alpha), adenosine monofosfatı adenosine metabolize eden CD73'ü (ekto-5'-nükleotidaz) düzenlediği gösterilmiştir. CD73 (ekto-5'-nükleotidaz), tümör hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen ve birçok kanser varlığında yüksek aktivite gösteren bir enzimdir [157],[158],[159]. Buna karşılık, MTA (5'-deoksi-5'-metiltioadenosinin adenin) ve MTAP'a (metiltiyoriboz 1-fosfat) dönüşümünü katalize eden metiltiyoadenosin fosforilaz ekspresyonu, kromozomal yeniden düzenleme ya da epigenetik susturmadaki gen bozulmasından dolayı malign melanom ve hepatoselüler karsinom dahil olmak üzere birçok tümörde azalmaktadır [160], [161]. Bu durum, tümör ortamında MTA'nın birikmesine neden olmaktadır. Hipoksi kaynaklı faktör ayrıca siklooksijenaz COX-2 gibi lipid metabolizması için önemli olan genleri de düzenlemektedir [162],[163]. COX enzimleri prostaglandinlerin sentezinden sorumludur. COX-1 hemen hemen tüm dokularda yapısal olarak eksprese edilirken, izoenzimi COX-2 öncelikle tümörlerde bulunur ve aşırı ekspresyon, meme ve yumurtalık kanserinde kötü prognozla ilişkilendirilmiştir [164],[165],[166]. Glutamin, vücutta en fazla bulunan amino asittir ve tümörler, yüksek miktarda glutamin alım hızı, birçok tümör hücresi için karakteristik

olduğundan, glutamin tuzakları olarak işlev görmektedir. Glutamin artışının bir kısmı, glutamin metabolizmasında ilk enzim olan glutaminazın (GLS) daha yüksek aktivitesine ve ifadesine dayanmaktadır [149], [167], [168]. Buna göre, intra-tumoral glutamin seviyeleri düşüktür ve kanser hastaları düşük plazma glutamin seviyeleri ve tersine yüksek glutamat konsantrasyonları sergilemektedir [169].

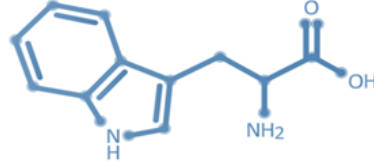
Birkaç çalışma çeşitli ortak amino asitin KRK'de biriktiğini saptamıştır [153], [154],[170],[171],[172],[173]. Değişmiş KRK metabolizmasının moleküler temellerinin daha iyi belirlenebilmesi, kolorektal tümörleri tedavi etmek, hatta önlemek için yeni ajanları da ortaya çıkarabilecektir. KRK ile ilişkili metabolik aberasyonlar hakkındaki çoğu literatüre rağmen [155], KRK veya metastatik hastalığın varlığını doğrulayan metabolik profillerin tanımlanması zor olmaktadır. Hem pozitif hem de negatif iyonlaşma modu analizlerinde, KRK numunelerinde AMP'nin (Antimikrobiyal peptid öncülleri) belirgin bir şekilde aşırı ifadesi saptanmıştır. Ayrıca AMP, foshofruktokinaz-1 (PFK1) aktivitesini aktive etmesiyle birlikte tümör hücreleri için birincil enerji kaynağı olarak artırılmış aerobik glikoliz ile ilişkili bulunmuştur [174].

Bir çalışmada, folat takviyesinin KRK gelişme riskini azaltabileceğini öne sürse de, farklı bir çalışma folat aşırı alımının, özellikle premalign lezyon oluştuğunda, KRK gelişme riskini de arttırdığını göstermektedir [175]. Folat, DNA biyosentezi, onarımı ve metilasyonunu korumak için önemli bir metabolit olduğundan ve ayrıca pürin ve pirimidin nükleotit bazlarının üretiminde rol oynar, yüksek seviyeler anormal bir lezyon oluştuğunda KRK'de proliferasyonun devam etmesine katkıda bulunabilir [176]. Ayrıca, folatın bağırsaktaki doku homeostazında önemli olduğunu ve folat metabolizmasındaki sapmaların, çoğalma ve karsinojenezle birlikte ortaya çıkabileceğini göstermektedir.

2.2. Triptofan Metabolizması

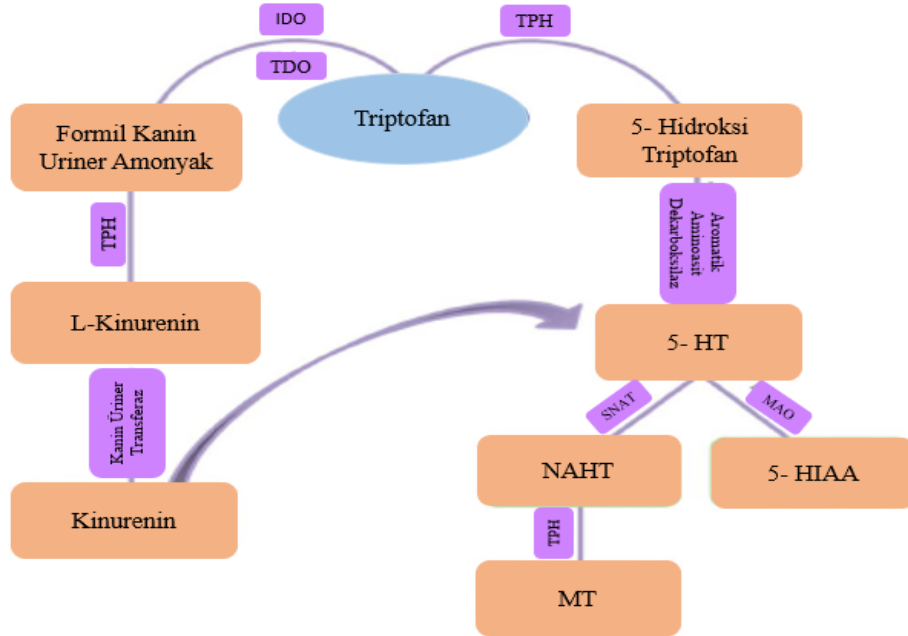
Triptofan (TRP), Frederick Hopkins tarafından 1901 yılında aromatik bir aminoasit olarak keşfedilmiştir. Hopkins, triptofanı ilk olarak 600 g pankreas özü ham kazeinden 4-8 g olarak izole etmiştir. Triptofan “((2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)” propiyonik asit), apolar yan zincire sahip esansiyel bir aminoasittir [177]. Triptofan, enzimler, yapısal proteinler, serotonin, melatonin ve nörotransmitterler gibi hayati pek çok biyomolekül için temel yapı taşı kabul edilmektedir. İnsan vücudunda triptofan, protein sentezine katılmanın yanı sıra kinürenin bileşiklerinin veya serotoninin sentezlendiği iki

önemli yolağın öncül bileşiği olarak görev yapmaktadır. Triptofan absorbe edildikten sonra %90 oranında albümine bağlı olarak veya serbest formda periferel dolaşımında yer almaktadır. Kompetitif non-spesifik L-amino asit taşıyıcılarıyla serbest formda kan-beyin bariyerini geçmektedir. Gerek periferel gerekse santral sinir sisteminde triptofan metabolizmasının fazla tercih edilen yolağı kinürenin yolağıdır [178].

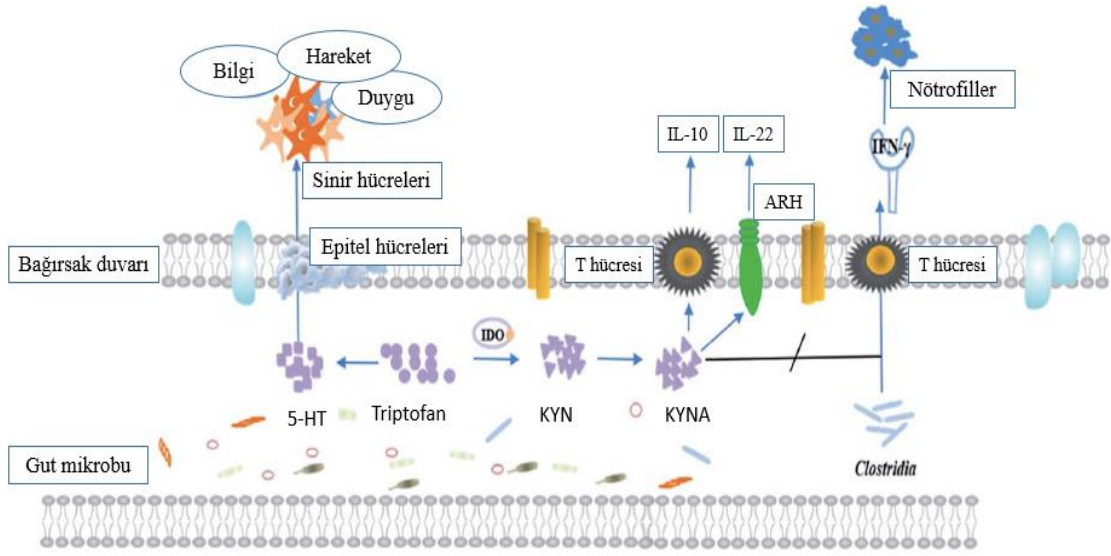


Şekil 2-6: Triptofanın moleküler yapısı

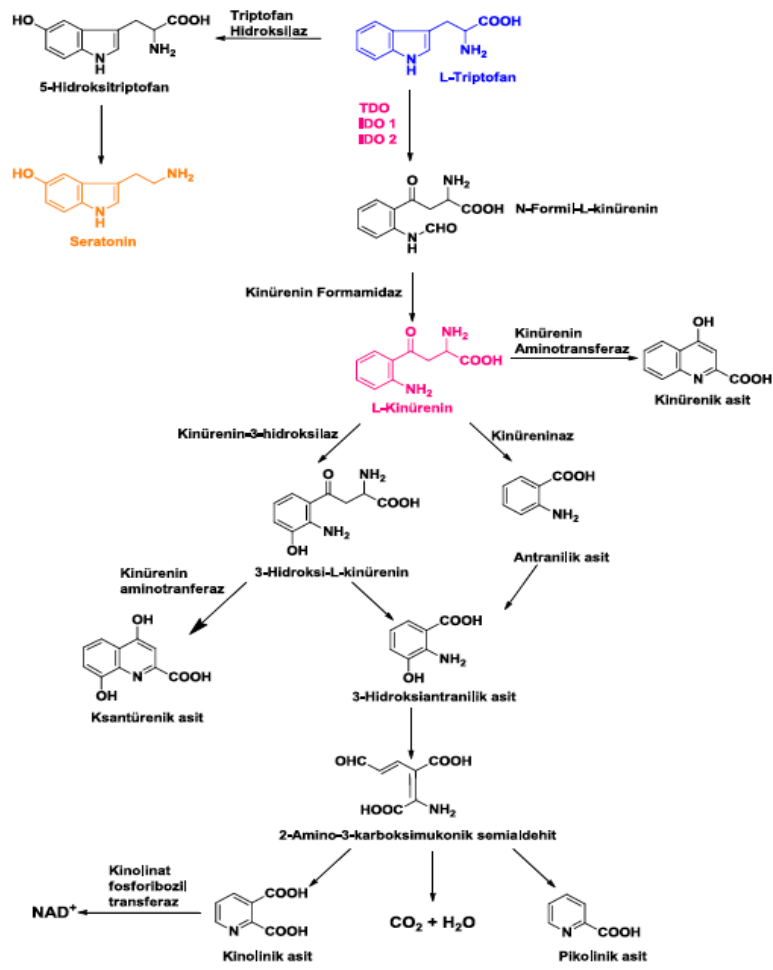
Triptofanın protein sentezine katılması ile birlikte kinürenine ve serotonin yolaklarında metabolize olmaktadır. Triptofanın yaklaşık %95'i hem santral sinir sisteminde hem de periferdeki kinürenin yoluyla metabolize edilirken, triptofanın sadece %1'i serotonin ve melatonine dönüştürülür [179], [180].



Şekil 2-7: Triptofan metabolizmasının iki ana yolağı [277]



Şekil 2-8: Triptofan metabolizmasının fizyolojik fonksiyonu [277]

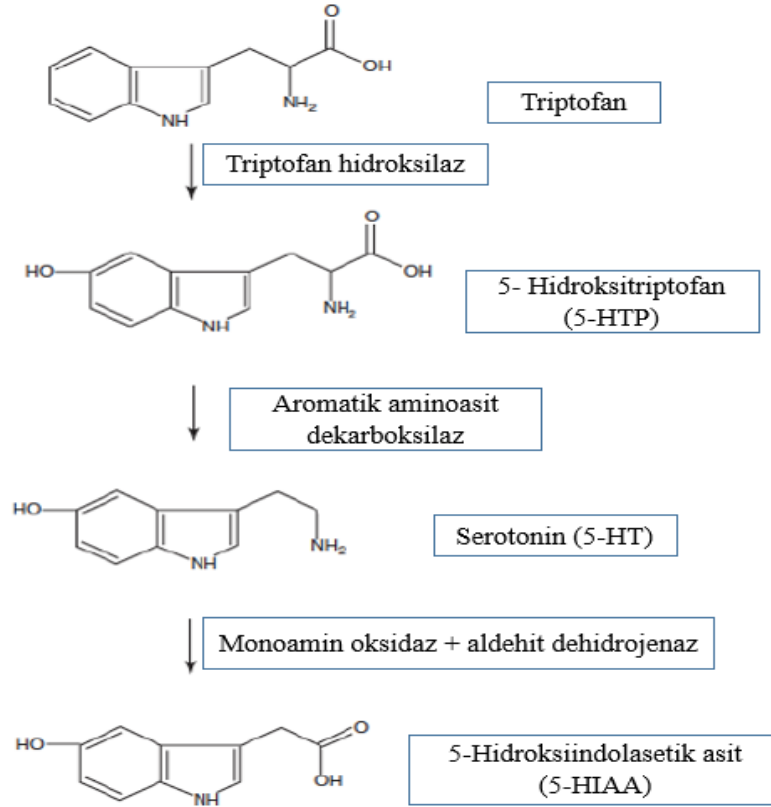


Şekil 2-9: Triptofan metabolizması

Triptofan degradasyon yolu, serotonin yolu ve kinurenine yoluna bölünmüştür. Kinurenik asit ve pikolinik asit nöroprotektif metabolitler olarak kabul edilirken, 3-hidroksi L-kinurenin, 3-hidroksiapranilik asit ve kinolinik asit nörotoksik metabolitlerdir [181]. L-Triptofan (TRP), esansiyel bir amino asittir, protein biyosentezi için bir yapı taşıdır ve insan metabolizmasında önemlidir [182]. Triptofanın metabolize olması karaciğer, böbrek ve beyin'de olmak üzere üç biyokimyasal yolak ile gerçekleşir [183]. Bu yolaklar kinurenine (KYN) yolu, 5-hidroksitriptamin (5-HT) yolu ve indoleacetic asit yoludur. Memelilerde TRP, öncelikle TRP'nin triptofan 2,3-dioksijenaz (TDO) veya indoleamin 2,3-dioksijenaz (İDO) ile katabolize edildiği KYN yolu ile metabolize edilir ve daha sonra KYN'ye dönüştürülür. KYN ayrıca, KYN aminoferaz ile kinetik asit (KYNA) içine katabolize edilir.

2.2.1. Triptofan Metabolizması Hidroksilasyon (Serotonin) Yolağı

Diyetle alınan triptofanın yaklaşık %3'ü serotonin sentezi için kullanılmakta olup, beyinde ise sadece %1'i serotoninin sentezlendiği hidroksilasyon yolağına katılmaktadır [177]. Triptofanın metabolizmasının hidroksilasyon yolunda, triptofan triptofan 5-hidroksilaz enzimi aracılığı ile 5-OH triptofan'a hidroksillenmekte, L-amino asit dekarboksilaz enzimiyle dekarboksilasyona uğrayarak serotonin'e çevirilmektedir (Şekil 2-10) [177],[178]. Sentezlenen serotonin miktarı, TRP'nin kullanılabilirliğine ve bu enzimlerinde aktivitesine bağlı olarak değişmektedir. Doku serotonin miktarı diyetle alınan triptofana bağlı olup, serotonin gastrointestinal sistem, trombositler ve beyinde sentezlenmektedir.



Şekil 2-10: Triptofan metabolizmasının serotonin yolağı

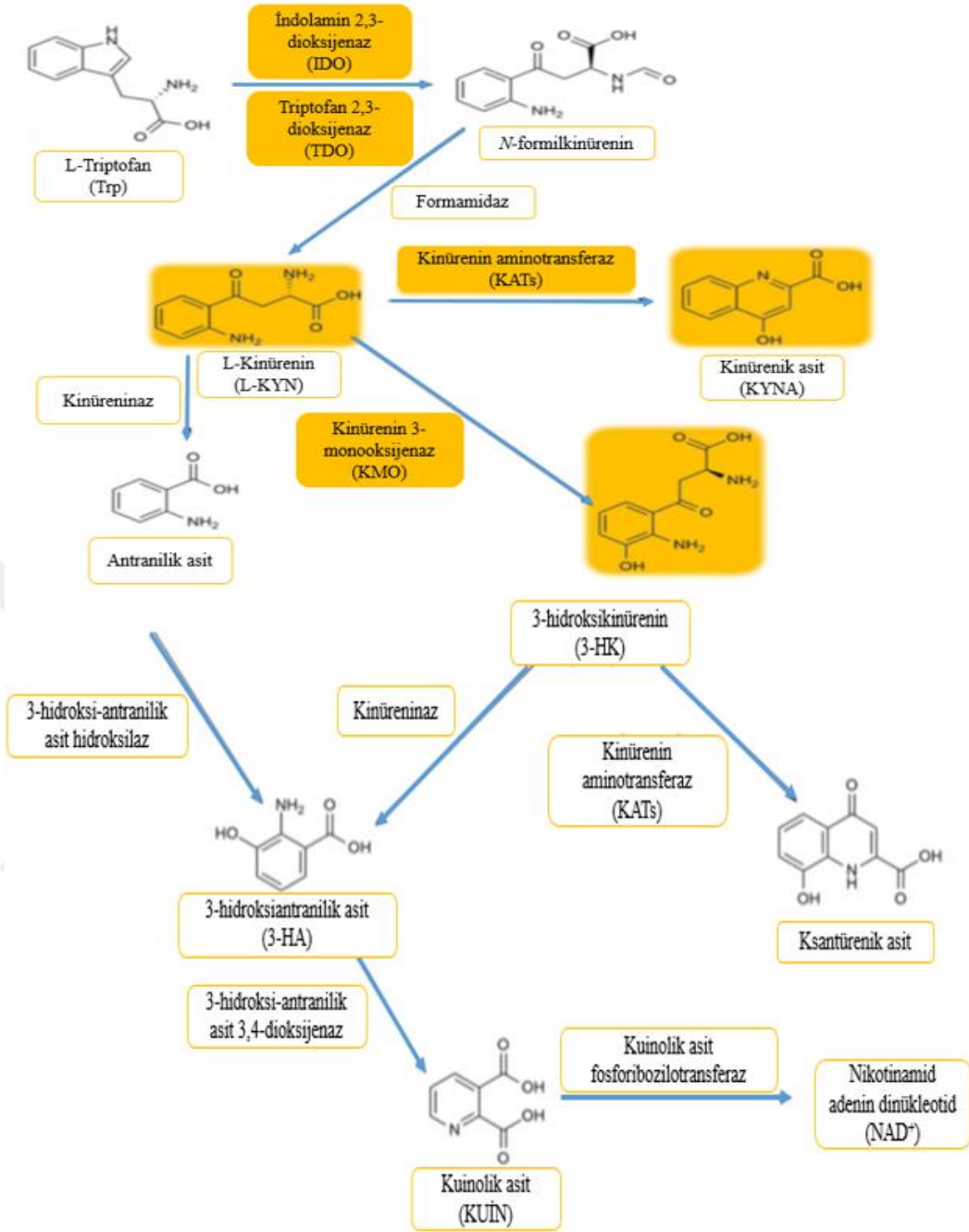
Serotoninin, fizyolojik ve psikiyatrik süreçlerde önemli bir nörotransmitter ve nöromodülatör olarak rol oynadığı bilinmektedir [177],[184]. Diğer yandan, TRP metabolizmasının serotonin yolağı melatonin sentezine de aracılık etmesi nedeniyle de oldukça dikkat çekicidir [185]. Triptofanın oksidasyon yolağında etkili olan indolamin 2,3-dioksijenaz enzimi aracılığıyla ortaya çıkan triptofan azlığının özellikle kanser hastalarında da izlenen depresyona yol açabileceği bildirilmektedir [186],[187].

2.2.2. Triptofan Metabolizması Oksidasyon (Kinürenin) Yolağı

Triptofan metabolizmasının %90 oranında tercih ettiği bir diğer yol olan oksidasyon yolağı, Kinürenin yolağına olarak da adlandırılmaktadır. Kinürenin yolağına giren triptofan, doku ve hücre lokalizasyonları, substrat spesifiteleri bakımından farklılık gösteren triptofan 2,3-dioksijenaz ve indolamin 2,3-dioksijenaz enzimleri tarafından N-formil kinürenine dönüştürülmektedir (Şekil 2-11). Kinürenin yolağının bu basamağı, yolağın ilk ve hız sınırlayıcı basamağı olmaktadır. Bu katabolik reaksiyonlara katılan çeşitli enzimler ile biyolojik olarak aktif, hüresel fonksiyonlar üzerinde fizyolojik ve

patofizyolojik etkileri olan 3-hidroksiantranilik asit, kinürenik asit ve kinolinik asit gibi diğer metabolizme ürünleri sentezlenmektedir [178].

Beyinde oldukça düşük konsantrasyonda mevcut endojen nöroprotektif bir bileşiktir olan kinürenik asit, önemli rolleri olan bir metabolittir. N-metil D-aspartik asit (NMDA) reseptörünün glisin modülatör bölgesine az konsantrasyonlar bağlanırken, NMDA reseptörünün glutamat bölgesine ise yüksek konsantrasyonlar bağlanmaktadır. Beyinde kinürenik asit yoğunluğunun artışının sedatif etkiye aracılık ettiği tespit edilmiştir [188]. Kinürenin yolağında 3-hidroksikinüreninin hidroliz veya antranilik asitin oksidasyonundan sentezlenen 3-hidroksiantranilik asit metaboliti, immün düzenlenmedeki rolünün yanı sıra nörotoksik olduğu da bilinmektedir. TRP metabolizmasının oksidasyon yolunda oluşan diğer bir metabolit olan pikolinik asit, endojen nöroprotektan olup, hücrel büyüme kontrol etmekte, antitümöral, antifungal ve antiviral aktiviteler göstermektedir. Kinolinik asit metaboliti ise, nöronal NMDA glutamat reseptörlerini aktive ederek agonist etki göstermektedir. Beyindeki kinolinik asit konsantrasyonu, triptofanın seratonin yolağına yönelmesinden dolayı, kan ve sistemik dokularla karşılaştırıldığında daha düşük oranda bulunmaktadır [178].

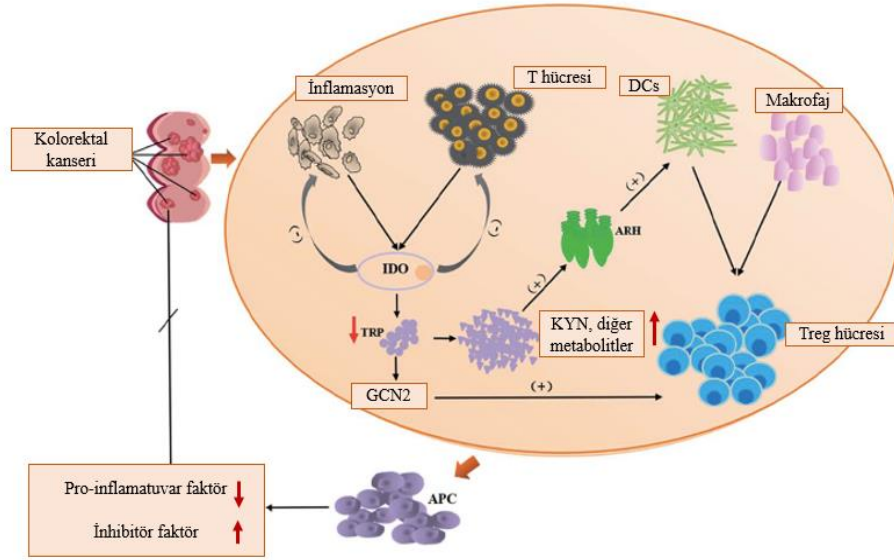


Şekil 2-11: Triptofan metabolizmasının kinürenin yolağı

2.2.3. Kolorektal Kanserde Triptofan Metabolizması

Esansiyel bir amino asit olan triptofan, tümörlerin, immün imtiyazlı bölgelerin veya iltihaplanma bölgelerinin lokal mikroçevresinde katabolize edilmektedir [178]. Kinürenin yolağı (KP) boyunca triptofan metabolizması immünoterapi için özellikle umut verici bir hedeftir. İndoleamin 2,3-dioksijenaz 1 (IDO1), bu yolu başlatan enzimler üzerinde en iyi çalışılmış ve genellikle KRK'de aşırı ifade edilmiştir. Bu yolun gastrik,

pankreas, özofageal ve gastrointestinal (GI) stromal tümörleri gibi diğer GI malignitelerdeki rolü de tartışılmaktadır [189].



Şekil 2-12: Kolorektal kanserin gelişiminde triptofan metabolizması [277]

Triptofan metabolizmasının, iltihaplanma ve KRK'deki rolünün aydınlatılması adına literatürde birçok kapsamlı çalışma bulunmaktadır. Triptofan metabolizması, bağışıklık sürveyansından kaçınmak için tümör hücreleri tarafından tüketilen önemli bir mekanizmadır [190],[191]. Triptofan en temel amino asittir ve diyet triptofanın % 95'i kinürenin yolağı (KP) boyunca metabolize edilir (Şekil 2-12) [192]. Bu yoldaki ilk ve hız sınırlayıcı basamağı, IDO1 hem enflamatuvar hem de malignitelerde adaptif immün yanıtların sınırlandırılmasında önemli rollere sahiptir. Diğer iki enzim olan indoleamin 2,3-dioksijenaz 2 (IDO2) ve triptofan dioksijenaz (TDO veya TDO2), kinürenin yolağı boyunca triptofanı metabolize etmektedirler [193]. Başlangıçta, IDO1 çoğu doku ve hücre tipinde yaygın şekilde ekspresye edilirken, doku dağılımı IDO2 (böbrek) ve TDO (karaciğer) için çok daha sınırlıdır. Bununla birlikte, her üçünün de çeşitli kanserlerde ifade edildiği gösterilmiştir [194], [195], [196].

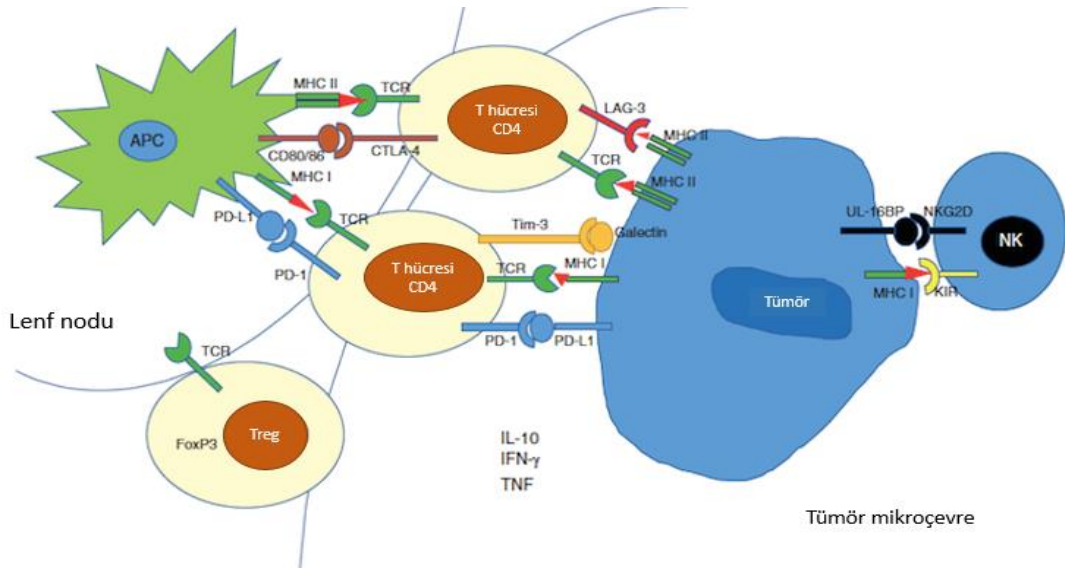
Yapılan çalışmalarda, kolorektal kanser hastalarında azalmış triptofan seviyelerini ve artmış kinürenin yolağı metabolitleri tespit edilmiş, bunun sonucunda IDO1 aktivitesinde artış olduğu tespit edilmiştir [197]. Yüksek IDO1 ekspresyonu tümör invazyonu açısından, genel sağ kalım ve meta-senkronize KRK metastazları için bağımsız bir olumsuz prognostik faktördür. Bununla birlikte, tümör infiltre lenf

düğümlelerinde yüksek yoğunlukta IDO1 ekspresyon hücrelerinin fazlalığı, kolon kanseri hastalarında 5 yıllık sağ kalım oranları ile ilişkili bulunmuştur [198],[199],[200].

İndol bileşikleri kommensal kolonik mikrobiyota tarafından diyet triptofandan üretilmektedir. Bu indol metabolitlerinin çoğu, AHR'yi (aril hidrokarbon reseptör) aktive etmektedir. Aktive edilmiş triptofan metabolizması, KKK'de ortak bir özellik olup prelinik veriler bu yolun neoplastik hastalık ilerlemesini desteklemektedir [201].

2.3. Kolorektal Kanserde İmmünolojik Mekanizmalar

Bağışıklık sistemi hücreleri immün mikroçevreye katkıda bulunmaktadır. Doğal öldürücü (NK) hücreler, doğal immün yanıtta kritik öneme sahip olup anormal hücrelere karşı kendiliğinden sitotoksik etki göstermektedirler. Yapılan çalışmalarda, kolorektal kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla, NK hücre aktivitesinde azalma tespit edilmiştir [202]. Ek olarak, NK hücrelerinin kolorektal tümörlere infiltrasyonunun daha iyi klinik sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Metastatik hastalıkta, periferik kandaki yüksek NK hücrelerinin oranı ve artan NK sitotoksitesi, kemoterapiye verilen yanıtların artması ve daha uzun sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir [203],[204]. Ancak, hücrelerle etkileşimleri ve prognostik önemi henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Dendritik hücreler, adaptif immünitinin başlatılmasında ve düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayan anahtar antijen sunan hücrelerdir. Tümör antijenlerini T hücrelerine sunarak ve diğer efektör hücrelerle etkileşimler yaparak antitümör yanıtlarını başlatmaktadır. Dendritik hücre fonksiyonundaki bozulma birçok kanser modelinde ortaya çıkmakta ve immün kaçış mekanizmasını temsil etmektedir [205]. Ayrıca, bu hücreler PD-L1 ve CD80/86 dahil immün kontrol noktası ligandlarını ifade etmektedirler [206]. İmmünsüpresyon için diğer bir mekanizma, MHC (major histocompatibility complex) sınıf I ve II proteinlerinin hücre yüzeylerinden kaybolmasıdır. T hücrelerine ve diğer efektör hücrelere antijen sunumu için gereklidirler. MHC sınıf I kaybı MSI-H kolorektal kanserinde sık görülmektedir [207].



Şekil 2-13: Tümör mikroçevresinde immün düzenleyici yollar [208]

Kolorektal kanser hastaları için tümör mikroçevresi üzerine çeşitli immünoterapi uygulamaları planlanmaktadır. Bu hedef doğrultusunda yapılan bir çalışma, T hücre hedefli bispesifik antikorların kullanımı ile tümör içindeki immünojeniklik uyarılmıştır [124]. Başka bir araştırmada ise, T hücrelerinde eksprese edilen CD3 molekülü ve sıklıkla kolorektal karsinomada aşırı eksprese olan bir belirteç olan CEA'ya aynı anda bağlanan karsinoembriyonik antijen-T hücre bispesifik (CEA-TCB) antikorunu değerlendirilmiştir. CEA-TCB antikor aktivitesi, zayıf bir immünojenik tümör mikroçevresinde T hücre proliferasyonu ve sitokin salınımı sağlar ve böylece CEA-TCB antikor, MSS tümörlerinde dahi immün kontrol noktası blokaj ajanlarının etkisini artırabildiği saptanmıştır [209],[210].

Diğer immün hücre kaynaklı yolları hedef alan spesifik immünoterapötik ajanlara cevap verebilecek olguları tanımlamak için önemli bir potansiyel mevcuttur. Farede, hem Tim-3 hem de PD-1'i hedef alan solid tümör modelleri, her iki yolu ayrı ayrı hedeflemekten daha büyük antitümör tepkilerine yol açmaktadır [211]. Bununla birlikte, kombine Tim-3 ve PD-1 blokajı solid tümörlerde erken faz klinik çalışmalar da bulunmaktadır [212]. Bispesifik antikorlar, doğal immün yanıtın artırılmasında umut vadedicidir. Dahası, neoantijen klonalitesinin immün mikroçevredeki etkilerin belirlenmesi, kanser aşılama yöntemleri ve edinsel hücre transferinde kullanılan farklı hedef potansiyeleri sağlayabilecektir. Yeni tedavi yöntemlerinin bulunması için gerçekleştirilen genetik ve kanser immünojisindeki alanındaki ilerlemeler, özellikle

mevcut tedavilere dirençli olan kanserlerde tümör immünojeniklik etki mekanizmaları daha iyi belirlenebilmiştir. Ayrıca, özellikle kolorektal kanserde immünoterapinin rolünün oldukça etkili olduğu düşünülmektedir [208].

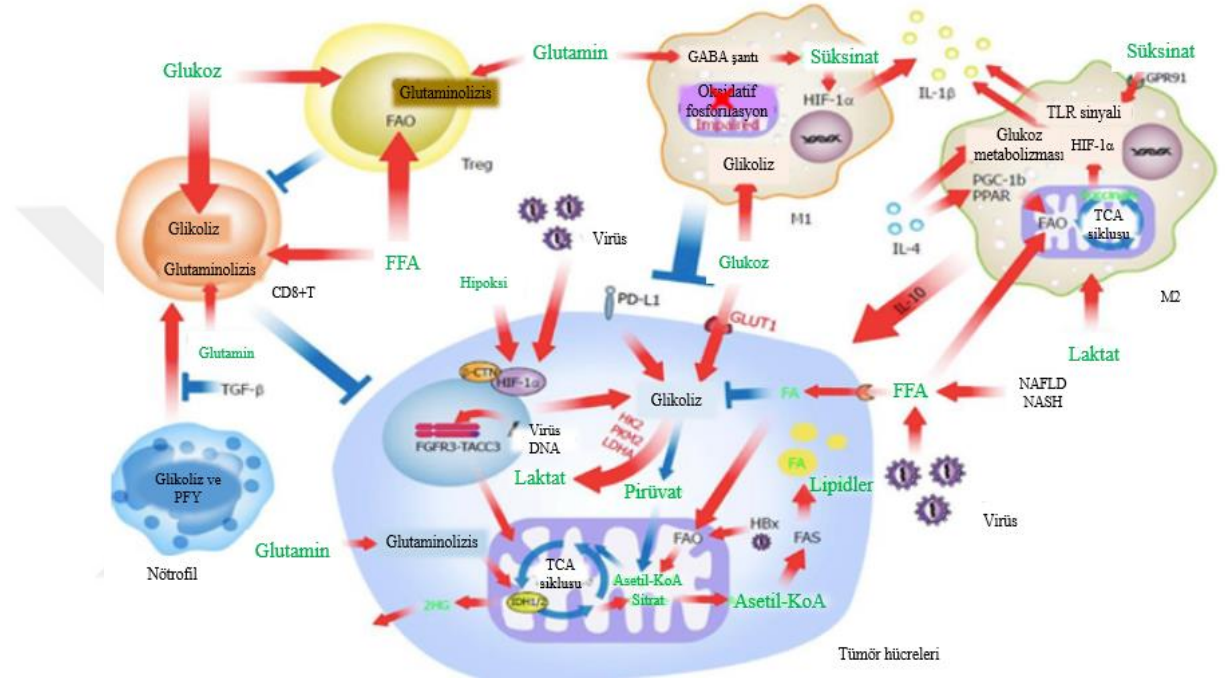
2.3.1. Kolorektal kanserde immün sistemden kaçışta Foxp3'ün Rolü

Temel olarak, Th1 (T-yardımcı 1) hücreleri sitotoksik CD8 + T hücrelerini aktive eder, böylece bir antitümoral etkiye neden olurken Th2 / Th3 / Tr1 hücreleri IL-4, IL-5/ IFN- γ / IL-10 sitokinlerinin salgılanmasıyla tümörün ilerlemesini arttırmaktadır [213],[214]. Bir Th-1 hücre aracılı sitokin profilinin, Th2 / Th3 / Tr1 lenfositleri için tipik bir profile dönüşmesi, Th-1 / Th-2 kayması olarak adlandırılır ve karsinogenez sırasında etkisiz bir hücrel immün yanıtın ana nedeni olarak kabul edilmektedir [215]. Ayrıca, transkripsiyonel repressor geni Foxp3'ü eksprese eden ve timustan olgun T hücreleri olarak ayrılan düzenleyici CD4+ CD25+ T lenfositleri, malign hücelere hücrel immün cevabın etkisizliği bakımından giderek dikkat çekmektedir [216],[217]. Düzenleyici T hücreleri, kendi antijenlerine karşı toleransı sürdürmede ve otoimmüniteyi önlemede kritik bir rol oynamaktadır [218]. İndüklenebilir Treg lenfositleri, patojenlere ve kendi antijenlerine cevap olarak periferde cevap üretirler [213],[219]. Bununla birlikte, Treg'lerin patojenler tarafından uyarılması veya aktivasyonu, koruyucu bağışıklık kazandırma stratejisi olduğu gibi, CD4+ CD25+ Treg hücrelerinin tükenmesi, belirli enfeksiyonlar sırasında hayatta kalmayı arttırdığı gösterilmiştir [220]. Tümör mikroçevresi ve kanser hücreleri içindeki dendritik hücreler, belirli koşullar altında, IL-10 veya TGF- β 'ye maruziyetten sonra, sitotoksik T hücrelerini inhibe etmesiyle efektör yanıtlarını sınırlayan Treg'lerin gelişimini başlatabilir, böylece anti-tümör immünitesini bozabilmektedir [221]. Sonuç olarak, TGF- β ve IL-10 ekspresyonu, tümör gelişiminde yakından ilişkilendirilmiş olup tümör hücre biyolojisi ve immün sistem arasında birçok etkileşime katkıda bulunmaktadır.

2.4. KRK'de Metabolizma ile İmmün Süreçler Arası Etkileşimler

Sitotoksik T ve NK (doğal öldürücü lenfosit) hücre aktivasyonu, tümör hücreleri tarafından iyi bilinen bir özellik olan glukoz ve amino asitlere olan ihtiyacın artmasına neden olmaktadır. Bu yakın metabolik bağımlılıklar, tümöre özgü immün hücrelerin proliferasyonunu ve efektör fonksiyonlarını sınırlayan metabolik rekabet ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte, sadece besin kısıtlaması değil aynı zamanda

metabolit fazlalığı ve laktat gibi metabolik atık ürünlerin birikimindeki tümör kaynaklı kaymalar, lokal immünoşüpresyona neden olarak tümörün ilerlemesini ve metastazını kolaylaştırmaktadır. Tümör mikroçevresindeki metabolitler, immün hücrelerin anti/pro-tümör fonksiyonlarını etkilemektedir. Böylece, glikoz, glutamin, serbest yağ asitleri ve süksinat gibi diğer metabolitleri içeren enerji kaynakları makrofajların, nötrofillerin ve T hücrelerinin fonksiyonlarını büyük ölçüde değiştirmektedir [222].



Şekil 2-14: Tümör mikroçevresinde immün hücrelerin anti/pro-tümör fonksiyonlarını etkileyen metabolitler [222]

2.4.1.1.1. İmmün Sistemde Glikoz Metabolizması

T hücresi proliferasyonunun glukoz metabolizmasına bağlı olduğu bilinmektedir [223],[224],[225]. Glikolizin immün hücre proliferasyonu desteklemesinin yanı sıra, fonksiyonel aktivitesi için de hayati önemi bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, glikoliz metabolizması, lenfoid ve miyeloid hücrelerde sitokin üretimiyle ilişkilendirilmiştir [226],[227]. Glikoliz hızlı enerji teminini garanti ederken, aynı zamanda IFN γ üretiminin post-transkripsiyonel ve epigenetik kontrolüne de katılmaktadır [226],[227],[228]. Belirli sinyal yolları, immün hücrelerde ve tümör hücrelerinde metabolik düzenleme için gerekli olmaktadır. T hücre reseptörü (TCR) stimülasyonu üzerine hızla aktive olan AKT, glikolizin indüklenmesinde rol oynamakla birlikte sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin

ifadesini de belirlemektedir [229], [230], [231]. Ayrıca, Myc geni efektör T hücrelerinde geçici olarak düzenlenmekle birlikte glukoz, glutamin metabolizmasına ilişkin genlerin ifadesini de arttırmada etkilidir [225], [232]. Ek olarak, T hücrelerinin efektör veya düzenleyici fenotiplere farklılaşması etkili olan mTOR kompleksi immün hücre metabolizmasının merkezi bir düzenleyicisidir [229],[230],[233]. T hücresi mTORC1'in rapamisin yoluyla baskılanması, glikolizin inhibisyonu ile sonuçlanır ve CD8 bellek üretimini artırır [228], [234],[235].

2.4.1.1.2. İmmün Hücre Aktivasyonunda OXPHOS (Mitokondriyel Oksidatif Fosforilasyon Sistemi)'un Rolü

Glikolizin yanı sıra, OXPHOS ayrıca T hücrelerinde anti-CD3 / CD28 uyarımı üzerine hemen yükseltilir ve pasif hücrelerin efektör hücrelere geçişini destekler [236], [227], [237]. OXPHOS glukoz kısıtlamasını telafi edebilir ve IFN γ üretimi sürdürülür [236], [238]. Ayrıca, antijene spesifik T hücresi aktivasyonu için mitokondriyal ROS üretimi, NF-kB ve AP-1'i aktive etmek için ise Ca²⁺ artışı ile sinerji oluşturması oldukça önemlidir [239],[240]. İmmün yanıtların kontrolünde ise, OXPHOS, düzenleyici T hücreleri için özellikle önemlidir, çünkü baskılayıcı fonksiyonları glikoz ve lipit oksidasyonu ile bağlantılı bulunmuştur [241], [242].

Bu genel etkiyle uyumlu olarak Foxp3 kararlılığı, Asetil-CoA ile artırılır ve lipit oksidasyonunun inhibisyonu, Foxp3 ekspresyonunu ve bununla ilgili baskılayıcı kapasiteyi azaltmaktadır [243]. Foxp3'ün kendisi AKT aktivasyonunu ve dolayısıyla GLUT-1 ekspresyonunu baskılayarak metabolizmayı oksidasyona kaydırır [244], [245]. Bununla birlikte, proliferatif Treg'ler glikolize geçer ve Treg'lerin indüklenmesi, glikolize bağlıdır [246]. OXPHOS'un bellek T hücresi oluşumundaki rolü ile ilgili farklı sonuçlar yayınlanmıştır. Yapılan bir araştırmada, OXPHOS'u tercih eden mitokondriyal füzyonun, T hücrelerinin üretilmesinde önemli olduğunu, buna karşın başka bir çalışmada ise OXPHOS'un bellek T hücre farklılaşması için gerekli olmadığını gösterilmiştir [247]. Gözlenen fark, efektör hafızası ve merkezi hafıza T hücreleri arasındaki altküme değişimleri ile ilgili olabileceği düşünülmektedir [248]. Sonuç olarak yapılan çalışmalar ışığında, T hücrelerinin metabolik esneklik gösterdiği ve tek bir enerji sağlama yoluna dayanmadığı görülmektedir.

2.4.1.1.3. İmmün Sistemde Amino Asit Metabolizması

Tüm immün hücrelerde olduğu gibi T hücrelerinde de proliferasyonun yanı sıra aktivasyonlarında da amino asitlere olan ihtiyaç artmaktadır. Glutamin, T hücrelerinde protein ve lipid biyosentezinin yanı sıra ilk büyüme fazı boyunca proliferasyon için temel bir aminoasittir [225],[249],[250]. Ayrıca, miyeloid hücrelerde enflamatuar aktivite, fagositoz ve antijen ifadesi için de oldukça önemli etkilere sahiptir [251],[252]. Glutamin, OXPHOS'u, protein biyosentezini desteklemektedir [253]. Arginin, triptofan ve sistein gibi diğer amino asitler de T hücresi çoğalmasında olduğu kadar makrofaj ve MDSC fonksiyonu için kritik önem taşımaktadır. Bu amino asitlerin miyeloid hücreler tarafından tükenmesi, T hücrelerinde hücre döngüsü durmasına yol açmaktadır [5],[254],[255]. Arginin seviyelerinin yükselmesi, aktif T hücrelerinde glikolizden OXPHOS'a kaymaya neden olarak sağkalım ve antitümör aktivitesinin artmasıyla merkezi bellek benzeri hücrelerin oluşumunu teşvik etmektedir [256].

Tümör hücreleri ve aktive edilmiş immün hücreler, anabolik makromolekül sentezi için triptofan, arginin ve glutamin gibi sürekli bir amino asit kaynağı gerektirmektedir. Bu nedenle, tümör hücreleri ve immün hücreler arasındaki metabolik bir rekabet, besin yoksunluğuna neden olabilmektedir. Yapılan pek çok çalışma, triptofanın bulunması ile ilgili olarak,IDO'nun birçok kanserde aşırı eksprese edildiği ve IDO eksprese eden tümör hücreleri spesifik T hücreleri tarafından reddedilmediğini tespit etmiştir [257]. Buna göre kolorektal kanserde IDO ekspresyonu düşük T hücresi infiltrasyonu ve azalmış sağkalım ile ilişkili bulunmuştur [199]. Arginin tükenmesi, ARG veya NO sentazında, aşırı eksprese eden tümörleri eksprese ederek ve daha sonra yanıt vermeyen T hücrelerinin gelişmesine yol açmaktadır [258]. Ayrıca, tümör infiltre eden MDSC'lerin arginin yoksunluğu, T hücre fonksiyonunu bozduğu tespit edilmiştir [259].

Tablo 2-4: Kanser tedavisi için planlanmış immünometabolik ajanlar [199]

Hedefler	Kimyasal Ajanlar	Mekanizmalar	Geliştirme Durumu
PKM2	DASA, TEPP46	HIF1 α 'nın inhibisyonu	Preklinik
HIF1α	PX-478, RO7070179, EZN-2968	HIF1 α 'nın inhibisyonu	Faz 1
PTEN	VO-Ohpic, SF1670	PI3K'nin inhibisyonu	Preklinik
PDK	Dichloroacetate	Glikolizin inhibisyonu	Faz 2
GLUT1	Ritonavir	Glikolizin inhibisyonu	FDA- onaylı
LDH	Gossypol (AT-101), FX11 Galloflavin	Glikolizin inhibisyonu	Faz 3
CPT1A	Etomoxir	FAO'nun inhibisyonu	Preklinik
CTLA-4	Ipilimumab	Kontrol noktası blokajı; FAO'nun inhibisyonu	FDA- onaylı
PD-1/PD-L1	Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab	Kontrol noktası blokajı; FAO'nun inhibisyonu	FDA- onaylı
AMPK	Metformin	Kompleks I'in inhibisyonu; mitokondriyel ROS'un düşürülmesi	FDA- onaylı
mTOR	Temsirolimus, Everolimus	HIF-1 α translasyonunun inhibisyonu	FDA- onaylı
IDO	Epacadostat	Triptofan metabolizmasının düzenlenmesi, mTORC1'in inhibisyonu	FDA-onaylı
IDH1/2 mutasyonları	Ivosidenib (AG-120) IDH305, AG-881, DS-1001b	2-HG üretiminin inhibisyonu	Faz 3
FGFR	Regorafenib, Sunitinib, TAS120	Multi-hedefli kinazın inhibisyonu	Faz 2
iNOS	L-NMMA, 1400W	NO üretiminin inhibisyonu	Faz 2
FOXP3	P60	NF-κB ve NFAT'in baskılanması	Preklinik

2.4.1.1.4. İmmün Sistemde Triptofan Metabolizması

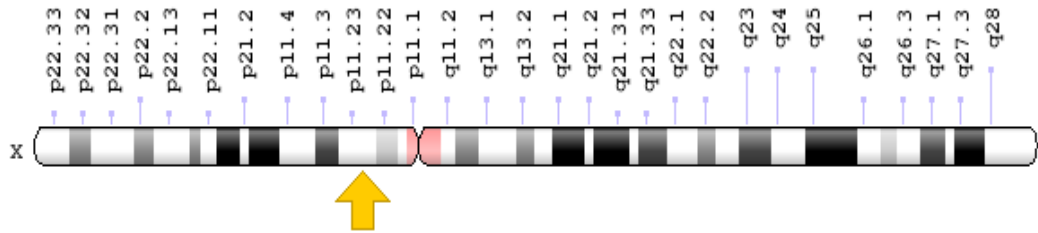
Tümörü olan lenf düğümlerinin antijen sunan hücrelerinde, transkripsiyon faktörü Foxo3, IDO1 ve TGF- β ekspresyonunu indükleyerek normal immün fonksiyonuna paralel bir tolerans yolu göstermektedir [260]. Bu tümörlerde IDO1 ekspresyonunun, triptofan tükenmesi ile immünoşüpresif bir tümör mikro ortamına katkıda bulunacağı

tahmin edilmektedir [261],[257],[262]. Kolon kanserleri sıklıkla primer tümördeIDO1 ekspresyonu sergileyerek miyeloid türevli hücelere sızmaktadır [198],[257], [262].

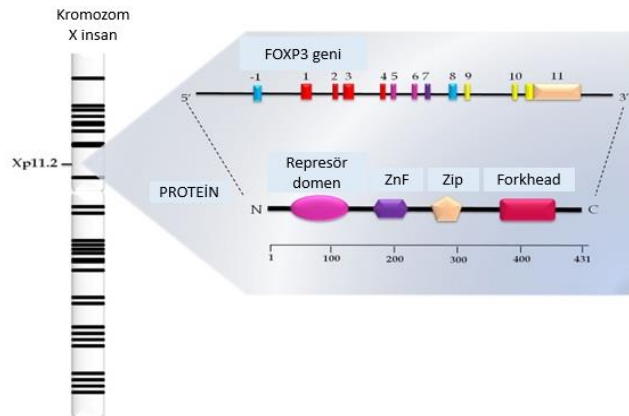
Efektif T hücreleri, T hücre reseptör sinyalizasyonunu takip eden T hücre siklusu boyunca triptofan miktarına oldukça duyarlıdır. Efektif T hücrelerinin artışı, serbest triptofana erişimleri sınırlandırılınca hücre siklusunun G1 fazında kısıtlanmaktadır [263]. Bu bilgiler ışığında, doku mikroçevresinde triptofana erişimin, antijen sunan hücreler (ASH)'e karşı oluşacak cevapta T hücrelerinin harekete geçip geçmeyeceğine ve proliferasyon durumlarının nasıl değişeceğinin belirleyen kritik bir faktör olduğunu düşünülmektedir.

2.5. Foxp3 (Forkhead Box P3) Proteini

Foxp3 (Forkhead box P3), X kromozomu p11.23 lokasyon yerleşkeli ve Foxp3 geninden kodlanan, çatal/kanatlı sarmal transkripsiyon faktörü ailesine ait 431 aminoasitli bir proteindir. [264].



Şekil 2-15: Foxp3 geninin kromozomal lokasyonu



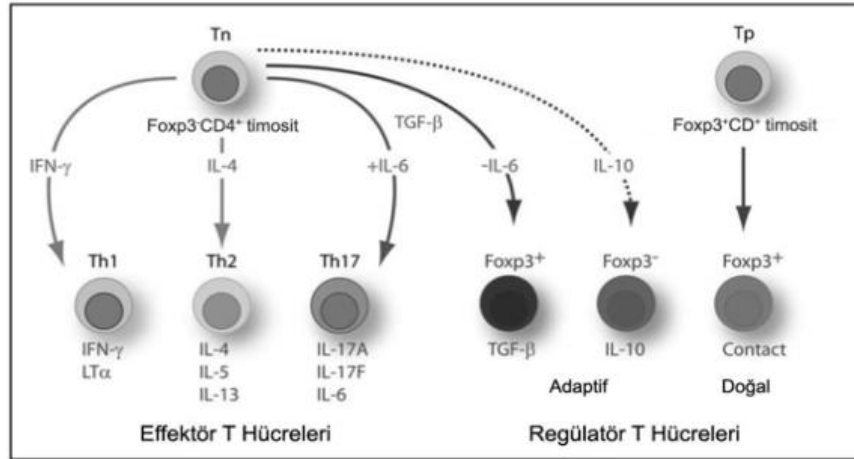
Şekil 2-2-16: Foxp3'ün gen bölgeleri

Transkripsiyon faktörü çatallı kutu P3 (Foxp3), CD4+ CD25+ düzenleyici T hücrelerinin (Treg) bir belirteci olarak tanımlanmış olup immünoşüpresif fonksiyonlarının önemli bir belirleyicisidir. Foxp3'ün, tümör ilerlemesi sırasında antitümör immün yanıtları sınırladığı gösterilmiştir. Ek olarak, karsinogenezde artmış Foxp3 ekspresyonu ile tümör hücrelerinin efektör T-hücre yanıtlarından kaçabildiğini öne sürülmüştür.



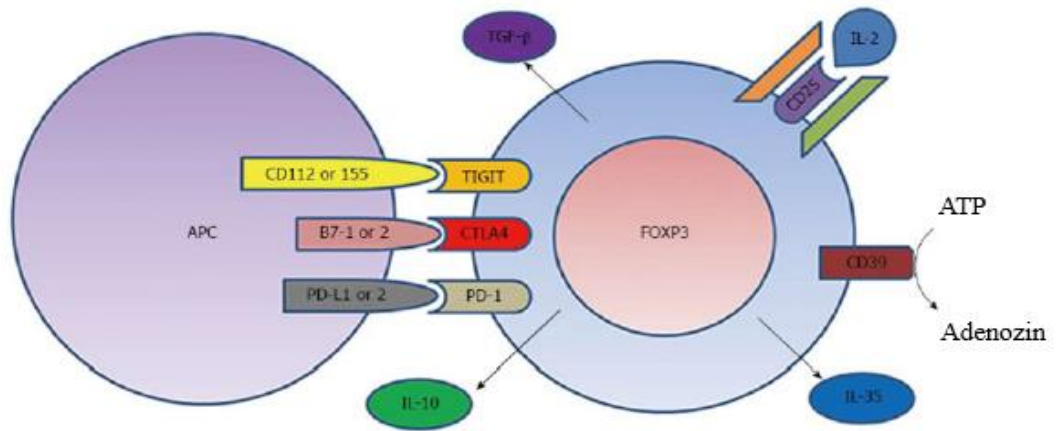
Şekil 2-17: Foxp3'ün 3 boyutlu yapısı

Bazı Treg alt sınıfları, IL-10 gibi sitokinler üreterek ve transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) gibi sitokinler üreterek immünoşüpresif fonksiyonlar sergilemektedir. İn vivo olarak, Treg'lerin, TGF- β 'nin kanser biyolojisindeki karmaşık rolünün çok önemli bir parçası olarak öne çıkan, sitotoksik T-lenfosit (CTL) fonksiyonlarını TGF- β sinyalleri yoluyla spesifik olarak bloke ettiği gösterilmiştir. Treg'ler aynı zamanda hücre-hücre teması gerektiren bir mekanizma aracılığıyla sitokin üretmeden T hücrelerinin aktivasyonunu ve/veya çoğalmasını da baskılayabilmektedir. Ayrıca, naif T hücrelerinin çoğalmasını da inhibe etmektedir [264].



Şekil 2-18: CD4+ hücrelerin sınıflandırılması

Birçok çalışma, Foxp3+ Treg'lerin tüm T hücrelerine göre daha yüksek oranlarda tümörlere infiltre olabileceğini bildirmektedir. Tümörlerde ve lokal lenf nodlarında Foxp3+ Treg'lerin birikmesinin immün yanıtları inhibe edebildiği ve bu nedenle istenmeyen prognozlu tümörgenezis ile sonuçlandığı gösterilmiştir [265],[266],[267].



Şekil 2-19: Foxp3+ Treg'lerin hücre yüzeyi faktörleri yoluyla inhibisyonu [255]

2.5.1. Foxp3 ile İlişkili Gen Polimorfizmleri ve Kanser İlişkisi

Tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) KRK duyarlılığına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Foxp3 transkripsiyon faktörü Treg fonksiyonu için kritik olarak tanımlanmış önemli bir belirteçtir [267],[268]. Foxp3 gen polimorfizmleri, fonksiyonel

Treg lenfositler azaltarak veya ortadan kaldırarak Foxp3'ü fonksiyonel veya kantitatif olarak değiştirebilmektedir.

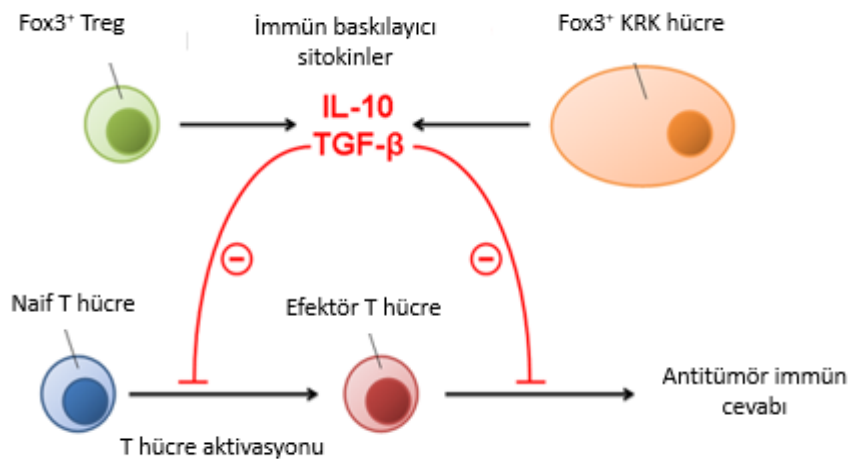
Çoğunlukla tek nükleotid polimorfizmlerinden (SNP'ler) oluşan genetik varyantların, birçok hastalıkta protein fonksiyonunda değişikliklere neden olduğu kanıtlanmıştır [269]. Bazı Foxp3 SNP'leri bildirilmiş ve bunların kanser duyarlılığındaki rolleri araştırılmıştır. 312 İranlı katılımcı üzerinde yapılan bir çalışmada, rs3761549 (T/C) 'deki T alelinin, akciğer kanserine duyarlılık ile korele olduğunu bildirilmiştir [270], başka bir çalışmada, Çin popülasyonunda rs3761548 (A/C) polimorfizmi araştırılmış ve endometriyal kanser kadınlarında A allel sıklığının sağlıklı kontrollerden anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir [271]. Diğer bir çalışmada ise, 1049 meme kanseri hastalarından alınan örnek üzerinde Foxp3 rs2280883'tür (C/T)'deki allel C mutasyonu ve meme kanseri riski arasında anlamlı bir ilişki olduğunu saptanamamıştır [272]. Farklı bir çalışmada, Çin popülasyonunda Foxp3 rs3761548 polimorfizmine sahip bireylerde kolorektal kansere olan duyarlılıkları tespit edilmiştir [273]. Foxp3'ün kanserdeki rolüne ilişkin çelişkili yayınlar bulunmakla birlikte, bu duruma açıklık getirmek için 2014 yılında bir meta-analiz yayınlanmış ve Foxp3 rs3761549 (T/C) ve rs3761548 (A/C) polimorfizmlerinin meme kanseri riski ile değil, akciğer ve hepatoselüler kanser riski ile ilişkili olduğunu ileri sürülmüştür [274]. Bir araştırmada, üç Foxp3 polimorfizmi ve altı kanser tipi değerlendirilmiştir. RS 3761548 (A/C) polimorfizmleri açısından genel olarak ve meme kanseri gruplarında anlamlı bir sonuç gözlenmemekle birlikte, toplanan veriler Çin popülasyonu için değişken AA genotipleri ve A alelinde kanser riskini arttırdığı tespit edilmiştir (AA vs. AC + CC: OR = 1.61 % 95 CI = 1.09, 2.39; AA - CC: OR = 1.74 % 95 CI = 1.05, 2.89; A - C: OR = 1.34 % 95 CI = 1.00, 1.78). Bu meta-analiz, Çin popülasyonunda Foxp3 rs3761548 (A/C) polimorfizmlerinin artmış kanser riski ile ilişkili olduğunu, rs2280883 (C/T) ve rs3761549 (T/C) polimorfizmlerinin olmadığını göstermiştir. Somut bir sonuç çıkarmak için farklı etnik kökenlere ve kanser tiplerine sahip daha geniş kapsamlı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır [275].



Şekil 2-20: Foxp3 geninin prognostik önemi [310]

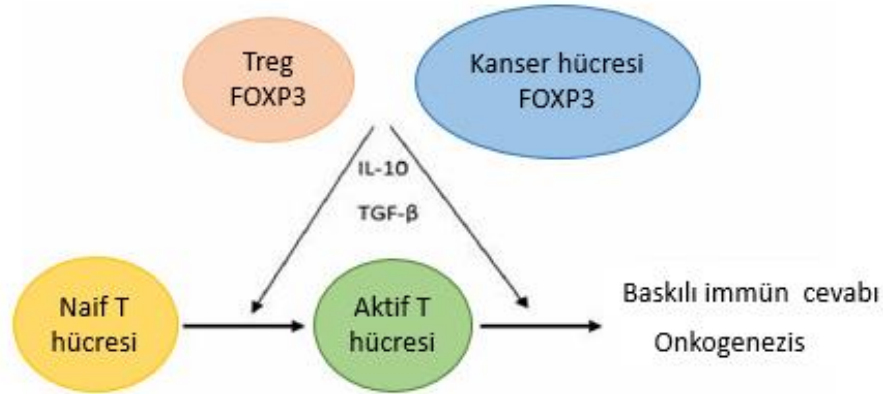
2.5.2. Kolorektal kanserde Foxp3'ün Rolü

Foxp3+ düzenleyici T hücrelerinin veya Foxp3+ kanser hücrelerinin serbest bıraktığı interlökin-10 (IL-10) ve transforme büyüme faktörü β (TGF- β) gibi immünoşüpresif sitokinler, naif T hücrelerinin aktivasyonunu inhibe etmesi yoluyla antitümör immün yanıtlar sınırlandırılmaktadır. Böylece immün sistem baskılanarak onkogeneze ve tümör ilerlemesi önlenmektedir [276].



Şekil 2-21: Foxp3'ün onkogeneze ve tümör ilerlemesi üzerine etkisi [267]

Foxp3'ün kanser hücreleri tarafından ifadesinin IL-10 ve TGF- β ile anlamlı şekilde korele olduğunu gözlemlenmiştir [277]. Yumurtalık ve pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli solid tümörlerde, yüksek yoğunlukta tümör infiltre eden Foxp3+ Treg lenfositleri kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [278]. Buna karşılık KRK hastalarını içeren birkaç çalışma, tümör infiltre eden Foxp3+ T lenfositlerinin mutlak sayısı ile prognoz arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [276]. Foxp3 gen ifadesi, KRK'nın farklı evrelerindeki (UICC I-IV) hastalarda tümör içine sızan Treg lenfositler ve KRK hücreleri ile değerlendirilmiş ve uzun vadeli prognostik önemini araştırılmıştır. CD4, CD25, Foxp3, IL-10 ve TGF- β gen ekspresyon profilleri, CD4 ve CD25'in, erken (UICC I / II) lezyonlarda ileri (UICC III / IV) tümörlerde, Foxp3, IL-10 ve TGF- β 'de olduğundan önemli ölçüde daha yüksek seviye ekspresyonu saptanamamıştır [277]. Dahası, bazı çalışmalar yüksek orandaki tümör infiltre Foxp3+ Treg lenfositler, kötü prognozdan ziyade olumlu faktörlerle ilişkilendirmiştir [279]. Bununla birlikte, Foxp3 proteininin kanser hücrelerindeki farklı ekspresyon seviyeleri üzerine literatürde çelişkili yayınlar mevcuttur bu nedenle Foxp3 proteininin kolorektal karsinoma hücrelerindeki biyolojik önemi tam olarak aydınlatılamamıştır [276].

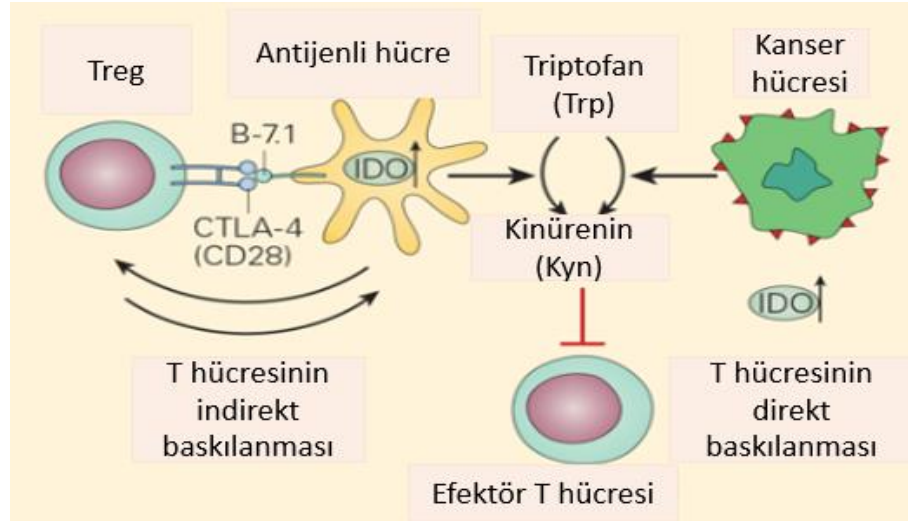


Şekil 2-22: Onkogenezis üzerinde sitokinlerin uyarıcı etkisi [310]

2.5.3. Triptofan Metabolizması ve Foxp3 Arasındaki İlişki

Düzenleyici T lenfositleri, tümöre kazanılmış toleransta kilit rol oynamaktadır. Artmış Treg aktivitesi tümör büyümesini hızlandırırken, Treg azalması, etkili antitümör

immün cevabı tetiklemektedir [280]. Kinürenin yolağının metaboliti IDO, Treg hücrelerinin immünosupresif etki mekanizmasını oluşturmaktadır. IDO, hem aktive edilmiş makrofajlar hem de diğer immüno-regülasyon hücreleri tarafından üretilen önemli bir immünomodülatör enzimdir. Bu metabolit, triptofanın kinurenine dönüşümünü katalize ederek normal immüno-regülatör fonksiyonlarını yerine getirmektedir. Triptofan tüketimi ve kinurenine aşırı üretimi karakterize artmış IDO ekspresyonu, T efektör hücre fonksiyonunu azaltmakta ve Foxp3+ Treg lenfositleri aktive etmektedir. Böylece, artan düzenleyici T hücre popülasyonu aktif T hücresi baskılanmasına yol açarak immün sistem susturulmaktadır. IDO ayrıca birçok tümör tarafından kullanılan immün yıkılma stratejisine katkıda bulunduğu düşünülen kanser hücrelerinde de üretilmektedir. Artmış IDO düzeyi, gerek tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu gerekse etkili immün tümör sürveyans mekanizmalarını etkisiz hale getirmesi ile tümör gelişimi artmaktadır [281]. Yapılan bir çalışmada, Foxp3+ düzenleyici T hücrelerinin in vitro olarak fare dentritik hücrelerinde (DC) yüksek seviyede fonksiyonel IDO ekspresyonunu indükledikleri gösterilmiştir [282]. Bu durumun, Foxp3+ Treg hücreler üzerindeki sitostatik T lenfosit antijen 4 (CTLA4+) 'ün, dendritik hücrelerdeki B7-1 ve B7-2'lere bağlanması aracılığı ile oluştuğu düşünülmektedir [280]. Yapılan başka bir çalışmada ise, bu bağlanmanın dentritik hücrelerde IDO ekspresyonunu ve enzimatik aktiviteyi artıran bir sinyal ortaya çıkarmasıyla, CTLA4-B7-1 ve/veya B7-2 arası etkileşiminin IDO'yu tetiklediği insan monosit kaynaklı dentritik hücrelerde de gösterilmiştir [283]. Bu veriler kapsamında, IDO, CTLA4+ Foxp3+ Treg aracılı immün baskılanmada olası bir mekanizma olduğu tahmin edilmektedir.



Şekil 2-23: Kanserde IDO'nun rolü

IDO eksprese eden tümör hücreleri, kinureninler gibi triptofan metabolitlerini salgılar, sitotoksik efektör fonksiyonlarını TCR CD3 zincirinin aşağı regülasyonu yoluyla baskılamakta ve Foxp3+ Treg farklılaşmasını uyarmaktadır [232].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta Örneklerinin Toplanması

İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 23.03.2018 tarih ve 479 sayılı karar numarası ile etik kurul onayıyla bu çalışmada yer alan kolorektal kanser (KRK) hastaları ve sağlıklı bireylerin ilgili klinikten seçimi Doç. Dr. Soykan Arıkan ve ekibi tarafından İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi kliniği, Prof. Dr. Filiz Akyüz ve ekibi ile İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya katılacak olan gönüllülere ameliyat öncesi, yapılacak araştırma ile ilgili bilgilendirilmiş gönüllü olur formu okutularak imzalatılmıştır. Hastalardan alınan kan steril EDTA'lı tüplere aktarılarak ve doku örnekleri uygun koşullarda İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'na soğuk zincirle ulaştırılmıştır.

Foxp3 rs3761548 gen varyantlarının incelenmesi amacıyla çalışmada kolorektal kanserli hasta grubu, kontrol grubu olmak üzere iki farklı grup kullanıldı. Birinci ve ikinci grup gen polimorfizmini belirlemek için KRK tanısı konulmuş 159 hastanın ve herhangi bir patolojik bulgusu, benign ya da selim tümörü ve tercihen ailesinde tümör hikayesi olmayan sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu olarak kullanılan 112 bireyin kan örneklerinden oluşmaktadır. İlgili hastalardan yukarıda belirtilen etik kurulun izniyle bilgilendirilmiş onam formu beraberinde 1 adet 10 ml EDTA'lı tüpe kanlar alınmıştır. Toplanan periferik kan örneklerinden tuzla çöktürme yöntemiyle genomik DNA'lar izole edilmiştir [284]. Nanodrop spektrofotometresi kullanılarak konsantrasyonları DNA'lar konsantrasyonları 100 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı. SNP genotiplemesine kadar elde edilen izole DNA'lar çalışma yapılana kadar -20 derece'ye kadar derin dondurucuda muhafaza edildi.

Gen ekspresyon analizi amacıyla KRK tanısı konulmuş olgulardan cerrahi operasyon ile alınan 20 tümörlü doku örneği ve bu her tümör dokusuna ait tümörlü olmayan 20 sağlıklı kolon dokusu kontrol olarak kullanıldı. Tümörlü-Tümörsüz mevcut toplam 40 doku örneğinden Trizol ile total RNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen RNA örnekleri Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (quantitative real time

polymerase chain reaction; q PZR) işlemine kadar RNAlater solüsyonu içeren kriyojenik tüplerde -80 °C’de saklandı.

Triptofan metabolizmasına ait metabolit düzeylerinin tespit edilmesi için ise, KRK tanısı konulmuş 20 hasta grubu ve 24 sağlıklı (kontrol) grubu örnekleri plazma elde edilmek üzere 10000 g hızda 10 dk. santrifüj edildi. Ayrılan plazmalar -80 °C’de analiz süresine kadar saklandı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Agaroz (Promega MBG)
- Amonyum asetat (Sigma A-8920)
- Asetik asit (Merck K-04134156)
- Beta-merkaptto-etanol (Sigma, M7522)
- Etidyum bromür (Sigma E-8751)
- Etil alkol (%99) (Merck)
- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma, 9884)
- Hidroklorik asit (Sigma, H1758)
- Hidrojen peroksit (Sigma, 349887)
- İzopropanol (Sigma, 19516)
- Ksilen siyanol (Sigma, X4126)
- PBS (Fosfat tampon çözeltisi)
- Proteinaz K (Sigma, P2308)
- pUC8 DNA size marker (MBI Fermentas)
- RNasezap (AMBION)
- Sodyum borohidrid (MERCK)
- Sodyum Dedodesil Sülfat (SDS) (Sigma, L4390)
- Sodyum hidroksit (Merck C754962)
- Sodyum Klorid (NaCl) (Sigma, S3014)
- Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas)
- Tripan mavisi (Gibco, 15250061)
- TrisBaz (BioChemika, 93362)
- L-Kinürenin (Sigma-Aldrich)
- L-Kinürenik asit (Sigma-Aldrich)
- L-Triptofan (Sigma-Aldrich)

- Glasiyal Asetik Asit (Merck)
- Perklorik Asit (Merck)
- Metanol (HPLC grade) (Merck)
- Asetonitril (HPLC grade) (Merck)
- Sodyum Hidroksit (Sigma-Aldrich)
- Perklorik Asit (Merck)
- Ultra Saf Su (Milipore) (HPLC Grade)

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı (+ 4 °C Arçelik)
- Çeker Ocağ (Opas)
- Derin Dondurucu (-20 °C Regal)
- Derin Dondurucu (-80°C Daihan Scientific)
- Distile su cihazı (Millipore)
- DNA/RNA UV Cleaner Kabin (Biosan)
- Elektroforez sistemi (E-C 350 MIDICELL)
- Etüv (Heraeus) (Nüve)
- Falkon santrifüj (Hettich)
- Güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Isı bloğu (Fisher scientific model 111004)
- İnkübatörler (37°C - 56°C Elektro Mag)
- Magna Lyser (Roche)
- Masaüstü mini santrifüj (Hettich)
- Mikrodalga fırın (Philco)
- Orbital çalkalayıcı (Thermo Scientific)
- Otoklav
- Otomatik pipet seti (Gilson) (Eppendorf)
- PZR cihazı (Thermal Cycler) (BioRad)
- Gerçek Zamanlı PZR Cihazı (Roche LightCycler 480)
- Santrifüj (Nüve Mf 048)
- Spektrofotometre (NanoDrop)

- UV transilluminator (Kodak EL LOGIC 100 görüntüleme sistemi)
- Vorteks-Mikrospin (Biosan)
- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) shimadzu LC-20AT
- Florasan Dedektör shimadzu RF-20A (FD)
- Degazer ünitesi DGU-20A
- Kolon Fırını CTO-10AS VP
- Analitik Kolon (C18 ODS, 150mm X 4,6mm, 5 μ m)
- Pompa
- Ultrasonik Banyo
- Yüksek Devirli Soğutmalı Santrifüj
- Otomatik Pipetler Eppendorf

3.1.4. Kullanılan Tampon Solüsyonlar

Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer): Bir erlen içersine alınmak üzere 1 g Potasyum bikarbonat, 200 μ l 0,5 M EDTA (Etilen diamintetraasetat) ve 8,74 g Amonyum klorür tartıldı. Erlen içersine alınan kimyasalların üzerine 900 ml distile su ilave edildi ve daha sonra çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Elde edilen çözelti balon joje içine alınarak distile su ile 1 litreye tamamlandı. Son olarak, 1 litre hacimli çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılarak 120 °C'de 15 dk. otoklavlandıktan sonra +4°C'de saklandı.

0,5 M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (pH 8.0): 186,1 g EDTA tartılarak beher içine alındıktan sonra üzeri 800 ml distile su tamamlandı. Oluşan heterojen çözelti manyetik karıştırıcı ile çözdürülmesi sağlandıktan sonra pH'sı NaOH çözeltisi ile 8,0'e ayarlandı. PH'sı 8,0'e ayarlanan çözelti distile su ile 1 litrelik hacme tamamlandı. Daha sonra 120 °C'de 15 dk. otoklavlav ile sterilize edildi.

4 M Sodyum Klorür (NaCl): 233,6 g NaCl tartıldıktan sonra erlene alınarak üzerine 800 ml distile su ilave edildi. Elde edilen karışım manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü. Homojen çözelti balon jojeye aktarılarak toplam hacim 1 litreye tamamlandı. 120 °C'de 15 dk. otoklavlanarak sterilize edildi.

Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL): 50 mL 0,5 M Etilendiaminasetat ve 25 ml 4 M “NaCl” balon jöjeye aktarıldıktan sonra son hacim distile su 1 litreye tamamlandı. 120 °C’de 15 dk. otoklavlanarak sterilize edilen çözelti, oda ısısında saklanarak muhafaza edildi.

1 M Tris Tamponu: 121,1 g olarak tartılan Tris baz, bir behere alındıktan sonra üzerine 42 µl HCl (hidroklorik asit) ile 800 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile çözdürülmesi sağlandı. Bu işlemden sonra, balon jöjeye aktarılan çözelti toplam hacim 1 litre olacak şekilde geri kalan hacim distile su ile tamamlandı. 120 °C’de 15 dk. otoklavlanarak sterilize edildi.

9,5 M Amonyum Asetat: 73,22 g tartılan amonyum asetat bir beher içersine alınarak üzerine 80 ml distile su eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Homojen bir karışım olan çözelti balon jöjeye aktarıldı. Daha sonra distile su ile 100 ml’ye tamamlandı. Son olarak, 0,22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +4°C’de muhafaza edildi.

%10’luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 10 g Sodyum dodesil sülfat (SDS) tartıldıktan sonra behere eklendi. Üzerine 80 ml distile su ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürüldü. Elden edilen çözeltinin pH’sı 7,2’ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı ve daha sonra oda ısısında saklandı.

Proteinaz K (20 mg/ml): 20 mg Proteinaz K tartıldıktan sonra steril bir tüp içersine alındı. Üzeri steril distile su ile 1 ml’ye tamamlandı ve 20 °C’de saklandı.

Etidyum Bromür (10 mg/ml): 1 g EtBr (Etidyum bromür) tartılarak steril distile su ile son hacim 10 ml’ye tamamlandı.

5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE): 27,5 g borik asit ve 54 g Tris baz tartıldıktan sonra beher içersine konuldu. Üzerine 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ve 800 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda homojen bir çözelti oluncaya dek çözdürüldü. Çözelti balon jöjeye aktarılarak son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Oluşan çözelti 120 °C’de 15 dk. otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında muhafaza edildi.

HPLC analizleri için Çinko Asetat (20mmol/L) Mobil Faz: Asetik asit (8.3 mmol/L), %2,5 (v/v) Asetonitril mobil fazı analiz yapılacak gün taze olarak hazırlandı. Bunun için, 4,4 g çinko asetat ve 468 µl asetik asitin üzerine 500 ml distile su eklendikten sonra bu karışıma 25 ml asetonitril ilave edildi. Toplam hacmi 1 litre olacak şekilde hesaplanan mobil faz çözeltisinin geriye kalan hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Tuzla Çöktürme Yöntemi ile DNA İzolasyonu

Periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra planlanan çalışma için falkon tüpüne eklendi. Üzerine 1:3 oranında (30 ml) eritrosit parçalama çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı ve +4 °C'de 20 dk. bekletildi. +4 °C'den alınan örnekler 1500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri süspanse edildikten sonra ise baştaki hacmin 2 katı kadar (15-20 ml) eritrosit parçalama çözeltisi ilave edildi. Örnekler 10 dk. 1500 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatantları atılarak süspanse edildi. Elde edilen pellet üzerine 50 µl proteinaz K (20mg/ml) , 500 µl %10'luk SDS ve 10 ml WBL (lökosit parçalama çözeltisi) eklenerek 56 °C'de su banyosunda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üzerlerine 3,7 ml 9,5 M Amonyum asetat çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırıldıktan sonra 20-30 dk. 4500 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan çökelti uzaklaştırılarak DNA içeren üst kısım falkon tüplere alındı. Falkon tüpe alınan üst kısmın üzerine 2 katı hacimdeki %99'luk etil alkol eklendi. Alkolün eklenmesiyle yüzeye çıkan DNA, bir pipet ucu yardımıyla 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alındı. Üzerine distile su eklenerek ve DNA çözdürülmesi sağlandı. DNA kalitesinin tespit edilmesi amacıyla NanoDrop spektrofotometrede konsantrasyon ölçümleri yapıldı. DNA'lar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.1.1. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Spektrofotometrik olarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı tespit edildi. 50 µg/ml çift iplikçikli DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik dansite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

$$\text{DNA Konsantrasyonu: } OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

DNA örneklerinin saflığı OD260/OD280 oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD260/OD280 değeri yaklaşık 1,8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1,8'den küçük olacaktır. OD260/OD280 değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelmektedir.

3.2.2. Foxp3-C/A (rs3761548) Gen Bölgesinin PZR ile Çoğaltılması

Foxp3 geninde C/A polimorfizminin gözlemlendiği 5. ekzon 3'-UTR bölgesini çoğaltmada kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler literatürde doğrulanmış primer dizileridir [285].

İleri primer: 5'- GGCAGAGTTGAAATCCAAGC -3'

Geri primer: 5'- CAACGTGTGAGAAGGCAGAA -3'

3.2.2.1. PZR'deki Kimyasal Maddeler ve PZR Karışımının Hazırlanışı

DNA Taq polimeraz enzimi (5 U/μl) (Intron Biotechnology, i-StarTaq™ DNA Polymerase), PZR reaksiyonundaki son konsantrasyonu 1 ünite olacak şekilde 24 μl'lik PZR reaksiyonuna eklendi.

Toplam reaksiyon hacmi 24 μl olacak şekilde Foxp3 için Tablo 3-1'de belirtilen bileşenler sırası ile 0,5 ml'lik steril tüpe konuldu. PZR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde soğukta ve steril alanda gerçekleştirildi.

Tablo 3-1: PZR karışımının içeriği

PZR Karışımı	dH ₂ O	10XPZR Tamponu	dNTP (2,5mM)	İleri primer (10pmol/μ)	Geri primer (10pmol/μ)	Taq polimeraz (5 U/μl)
Miktar	6,3 μl	2,5 μl	2,0 μl	1,0 μl	1,0 μl	0,3 μl

Hazırlanan PZR karışımından örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 23 μl reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 1 μl DNA eklendi ve daha önceden 94 °C sıcaklığa çıkarılmış PZR cihazına (Biorad Thermal Cycler) örnekler yerleştirildi ve PZR işlemi başlatıldı.

3.2.2.2. PZR Koşulları

Foxp3 geni ekzon 5 bölgesinin çoğaltılmasında, ileri ve geri primerler için kullanılan primer bağlanma derecesi optimize edilerek 60 °C olarak kullanıldı (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: Foxp3 geni 5. ekzon 3'-UTR bölgesi PZR reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	94 °C	4 dk.
Denatürasyon	94 °C	30 sn
Primer Bağlanması	60°C	30 sn (35 döngü)
Zincir Uzaması	72°C	30 sn
Son Uzama	72 °C	10 dk.

3.2.2.3. %2'lik Agaroz Jel Hazırlama ve PZR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi

4 g agaroz (Promega MBG) tartıldıktan sonra bir erlen içerisine konuldu. Üzerine son hacim 200 ml olacak şekilde 1xTBE tamponu eklendi. Elde edilen karışım mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözdürüldü. Erlenin sıcaklığı 50-55 °C'ye kadar düştükten sonra çözünmüş agaroz jel içine 4,5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklendi. Hazırlanan jel yatay jel yatağı içine döküldü ve yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı. Jelin donmasının ardından tarak kuyucuklara zarar verilemeden dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır hale geldi.

1xTBE tamponu içeren jel tankı içerisine %2'lik jel dikkatli şekilde konuldu. Agaroz jelin üzerini 2-3 ml geçecek şekilde 1X TBE tamponu jel üzerine ilave edildi. 7 µl PZR ürününe, 3 µl 6xLoading Dye (Intron Biotechnology) eklenip pipetaj işlemi yapılarak karışması sağlandı. 10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendikten sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (E-Capparatus Corporation, E-C4000P) 250 miliamper 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

3.2.2.4. PZR Ürünlerinin Kontrolü

Foxp3 genine ait istenilen bölgelerinin PZR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacı ile PZR tüpünden alınan 7 µl örnek 3 µl 6xLoading Dye (Intron Biotechnology) ile karıştırılarak yukarıda tanımlanan elektroforez sisteminde yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) PZR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi. PZR reaksiyonları sonucu Foxp3 geninden 155 bp'lik bir ürün elde edilmesi beklendi.

3.2.3. Foxp3'ün 5. Ekzon 3'-UTR Bölgesi PZR Ürünlerinde PstI Enzim Kesimi

3.2.3.1. PstI Enzim Kesiminde Kullanılan Enzim ve Kimyasal Maddeler:

PstI Kesim enzimi (10 U/µl) (Fermentas):

PstI enzimi 10X Green Buffer ile birlikte kullanıldı. PstI enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



3.2.3.2. PstI Enzim Kesimi

PZR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 15,6 µl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi" Tablo 3-3'de belirtilen çözeltilerin ve PstI enziminin sırasıyla eklenmesi ile gerçekleştirildi. 155 baz çiftlik PZR ürünü kesimi PstI enzimiyle 37°C'de 15 dk. inkübasyonu sağlandı.

Tablo 3-3: PZR PstI enzim kesim protokolu

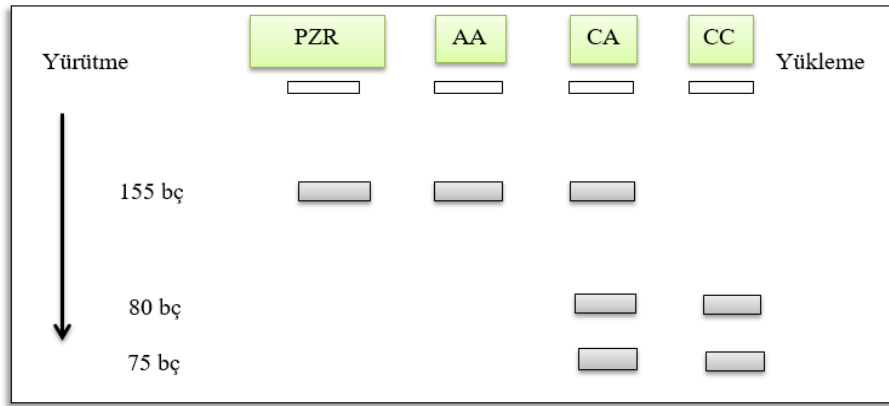
Kesim Karışımı	dH ₂ O	10X Green Buffer	PstI enzimi (10 U/µl)	PZR ürünü
Miktar	9,0 µl	1,0 µl	0,6 µl	5,0 µl

3.2.3.3. PstI Enzim Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi

%2'lük agaroz jel hazırlandıktan (bkz 3.2.2.3) sonra PstI kesim enzimi ile kesilen PZR ürününden 8 µl ve 2 µl 6xLoading Dye (Intron Biotechnology) alınarak karıştırılıp %2'lük agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Kesim ürünleri DNA moleküler marker (İnvitrogen 100 bp marker) ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar UV ışık (304 nm) altında incelendi.

3.2.3.4. Foxp3 C/A Gen polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi

C/A mutasyonu varlığında Foxp3 5. ekzonun 3'-UTR bölgesinde PstI enzimi uygulandığında birden fazla kesim bölgesi oluşmaktadır. CC genotipi için PZR kesim ürünleri 80 bç ve 75 bç büyüklüğünde iki bant verirken, homozigot AA mutasyonu içeren PZR kesim ürünleri 155 bç olmak üzere üç bant verir. Heterozigot CA mutasyonu içeren PZR kesim ürünleri ise 155 bç, 80 bç ve 75 bç olmak üzere üç bant PZR kesim ürünleri verir (Şekil 3-1). Foxp3 geni 5. Ekzon 3'-UTR bölgesi PZR ürününün PstI enzim kesimi sonrası görülen bantların agaroz jel görüntüsü Şekil 3-2'de gösterilmiştir.



Şekil 3-1: Foxp3 C/A Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü

3.2.4. Foxp3 Gen Ekspresyon Analizi

3.2.4.1. Doku Eldesi ve Homojenizasyonu

Kolorektal kanserli hastalardan cerrahi işlem esnasında alınan tümörlü doku örnekleri ve cerrahi sınıra uzak bölgeden alınan sağlıklı doku örnekleri hızlı olarak RNAlater içeren kriyojenik tüplere konularak -80 °C'de aniden donması sağlanmıştır. Analiz öncesi, donmuş doku örnekleri küçük parçalara ayrılarak üzerlerine 8-10 adet paslanmaz çelik boncuklar eklenip 700-1000 µl Trizol (Roche) solüsyonu ile MagnaLyser'da 4500 rpm'de 20-30 sn süreyle homojenize edilmiştir.

3.2.4.2. RNA İzolasyonu

Homojenizasyonu sağlanan örnekler oda sıcaklığında 5 dk. bekletildikten sonra üzerlerine 150 µl kloroform (200 µl kloroform 1 ml trizol içine) ilave edilen tüp, kuvvetli bir şekilde 15 sn karıştırılmıştır. Daha sonra oda ısısında 2-3 dk. bekletildikten sonra

12.000 g hızla +4 °C'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı tüp 45°'lik açı ile pipet yardımıyla başka bir tüpe aktarılmıştır. Protein ekstraktı orta fazda olup muhtemel ileriki deneylerde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. Temiz bir ependorf tüpe alınan süpernatant üzerine 375 µl %100 izopropil alkol (500 µl %100 izopropil alkol 1 ml trizol için) ilave edilmiştir. Oda ısısında tekrar 10 dk. bekletilmesinin ardından 12.000 g hızla +4 °C'de 10 dk. yine santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 750 µl %75 etil alkol (1 ml %75 etil alkol 1 ml trizol için) eklenmiştir. Bu adımda elde edilen RNA -20 °C'de en az 1 yıl veya +4 °C'de 1 hafta saklanarak kullanılabilir durumdadır. Etil alkol ilavesiyle RNA çok kısa süre süreliğine vorteksenerek 7.500 g hızda +4 °C'de 5 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonraki aşamada ise, süpernatant kısmı atılıp pellet 5-10 dk. kurumaya bırakılmış ardından 20 µl RNase free su içerisinde çözülmüştür. Su banyosunda 55-60 °C'de ya da ısı bloğu üzerinde 10-15 dk. bekletilme süresi sonunda RNA'lar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.4.3. RNA Kalitesinin Belirlenmesi

NanoDrop2000 spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda RNA'nın OD ölçümü yapılarak konsantrasyonu belirlenmiştir. 260 nm'deki OD, 230 ve 280 nm'deki OD'lere oranlanarak da RNA'nın saflık derecesi bulunmuştur.

$$\text{RNA konsantrasyonu} = 40 \mu\text{g/mL} \times \text{OD}_{260} \times \text{dilüsyon faktörü}$$

3.2.4.4. cDNA Eldesi

İzole edilen RNA örnekleri NanoDrop spektrofotometri ile ölçülüp, 100 ng/µl olacak şekilde eşit konsantrasyonda High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (LifeTech) sentez kiti ile kitin önerdiği protokol (Tablo 3-4) ve koşullarda (Tablo 3-5) cDNA'ya 0,2 ml'lik steril PZR tüpleri içerisinde çevrilmiştir.

Tablo 3-4: cDNA sentez protokolü

Kimyasallar	Miktarları (µl)
Nükleaz free distile su	3,2
10X RT tamponu	2
25X dNT karışımı (100mM)	0,8
10X RT random primer	2
Reverse transkriptaz (50 U/ml)	1
RNase inhibitör (20 U/ml)	1
RNA	10
Toplam hacim	20

Tablo 3-5: cDNA sentez koşulları

Sıcaklık (°C)	25	37	85	+4
Süre (dakika)	10	120	5	∞

Reaksiyon işlemi sonunda elde edilen cDNA örnekleri gerçek zamanlı PZR analizine kadar -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.4.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR)

Foxp3 gen ifadesinin Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR) ölçümü için Roche LightCycler 480 cihazı kullanıldı. Amplifikasyonlar 20 µL toplam reaksiyon hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler, gen ekspresyon RT² SYBR Green Mastermix kullanılarak gerçekleştirildi. Foxp3 gen ifadesinin normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, GAPDH genine özgü primer ve Foxp3 gen ekspresyon primeri kullanılarak çalışıldı (Tablo 3-6).

Q PZR işlemi aşağıda belirtilen protokol (Tablo 3-7) ve koşullarda (Tablo 3-8) koşullarda Veriti 96 well Roche LightCycler 480 cihazı aracılığıyla yapılmıştır. Foxp3 gen ekspresyon seviyesi protein kodlayan tüm ekzonlar dizisinin cDNA’sı kullanılarak kantitatif olarak gerçek zamanlı housekeeping gen ekspresyonu (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz, GAPDH) referans alınarak belirlenmiştir.

Tablo 3-6: Q PZR'de Foxp3 ekspresyonu için kullanılan primer dizileri

	Foxp3	GAPDH
İleri primeler	5'- TCCCAGAGTTCCCTCCACAAC-3'	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC -3'
Geri primer	5'-ATTGAGTGTCCGCTGCTTCT-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

Tablo 3-7: Foxp3 ve GAPDH gen ekspresyon analizleri için qPZR protokolü

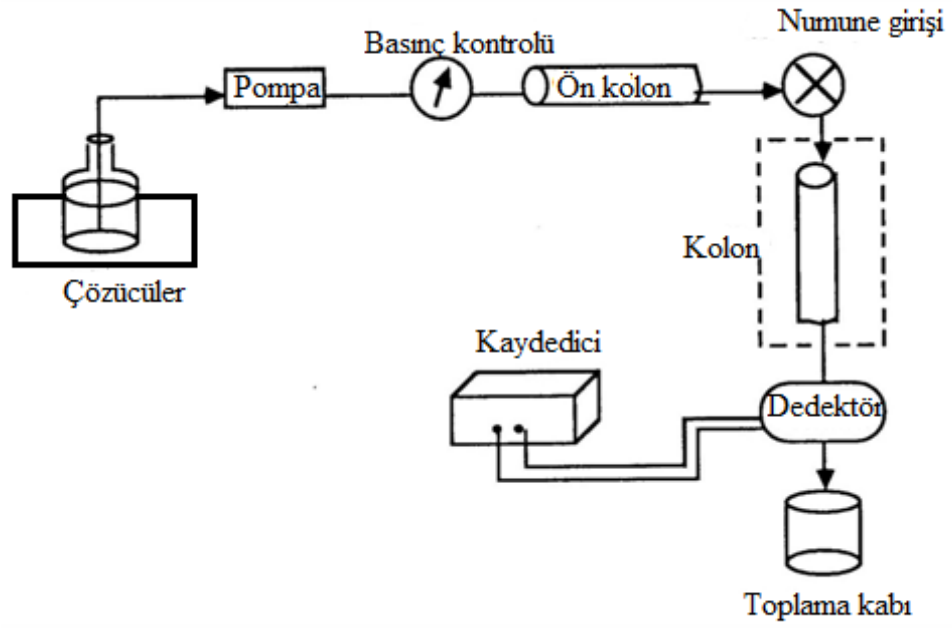
İçerik	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermix	12,5 µl
cDNA sentez reaksiyonu	1 µl
RT ² qPCR Primer Assay (10 µM stok)	1 µl
RNase-free distile su	10,5 µl
Total Hacim	25 µl

Tablo 3-8: Foxp3 ve GAPDH gen ekspresyon analizleri için qPZR koşulları

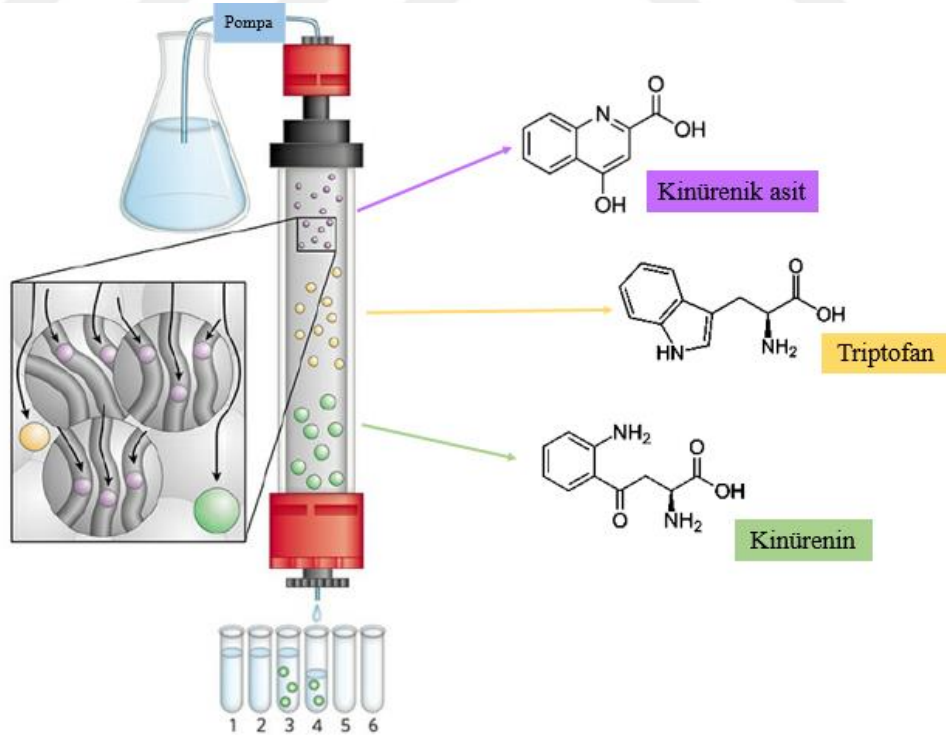
Döngü	Süre	Sıcaklık
1	10 min	95°C
	15 s	95°C
45	1 min	60°C

3.2.5. Plazma Triptofan, Kinürenin ve Kinürenik Asit Düzeylerinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemiyle Belirlenmesi

Plazma triptofan (TRP), kinürenin (KYN) ve kinürenik asit (KYNA) düzeylerinin tayini Xiang ve arkadaşları tarafından geliştirilen metoda göre Floresan dedektörlü-yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-FD) SHIMADZU LC-20A HPLC cihazı kullanılarak yapılmıştır [298]. Triptofan ve triptofan metabolitleri olan kinürenin ve kinürenik asitin HPLC ile analiz edilme süreci Şekil 3-3'de gösterilmiştir.



Şekil 3-2: HPLC analiz süreci



Şekil 3-3: Kolondan moleküllerin ayrılma sıralarının şematik gösterimi [286]

3.2.5.1. Plazma Triptofan / Kinürenin / Kinürenik Asit Miktar Tayini

3.2.5.1.1. Kromatografik koşullar

Tablo 3-9: Kromatografik koşullar

Kolon	ODS kolon, 5 µm, 150x4.6 ID
Mobil Faz	Çinko Asetat Tamponu (15mmol/l; pH:4,0): Asetonitril (95:5)
Akış Hızı	1,5 mL/dk
Elüsyon	İzokratik
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Dedektör UV λ	365-480 nm (Kinürenin için) 254-404 nm (Triptofan için) 344-404 nm (Kinürenik asit için)
Alıkonma süresi (Rt)	5.8 dk. (Kinürenin için) 13.0 dk. (Triptofan için) 16.7 dk. (Kinürenik asit için)

3.2.5.1.2. Standart örneklerinin hazırlanması

HPLC Grade saf suda 979 µmol/L triptofan ve 192 µmol/L kinürenin ve 211,6 µmol/L konsantrasyonlarında kinürenik asit stok standart çözeltileri olarak hazırlanarak çalışma zamanına kadar -20 °C’de saklandı. Simultane analizi yapılacak 3 molekülün, 5 noktada kalibrasyon grafiği çizmek için, bu stok standart çözeltilerden karışım standartları aşağıdaki derişimlerde 0,312 mol/L perklorik asit ile hazırlandı. HPLC analizlerinin yapılabilmesi amacıyla hazırlanan standart örneklerin kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonları Tablo 3-9’da verilmiştir. Kalibrasyon çözeltilerine ait pik alanları ve alıkonma zamanları ise Tablo 3-10’da gösterilmiştir. Kalibrasyon için verilen standart karışımların kromatogramı ise Şekil 3-4’de verilmiştir.

Tablo 3-10: Kalibrasyon çözeltilerinin konsantrasyonları

	TRP ($\mu\text{mol/L}$)	KYN ($\mu\text{mol/L}$)	KYNA ($\mu\text{mol/L}$)
Karışım 1	195,8	96	2,116
Karışım 2	97,9	48	1,058
Karışım 3	48,95	24	0,529
Karışım 4	24,48	1,2	0,0153
Karışım 5	0,245	0,048	0,00105

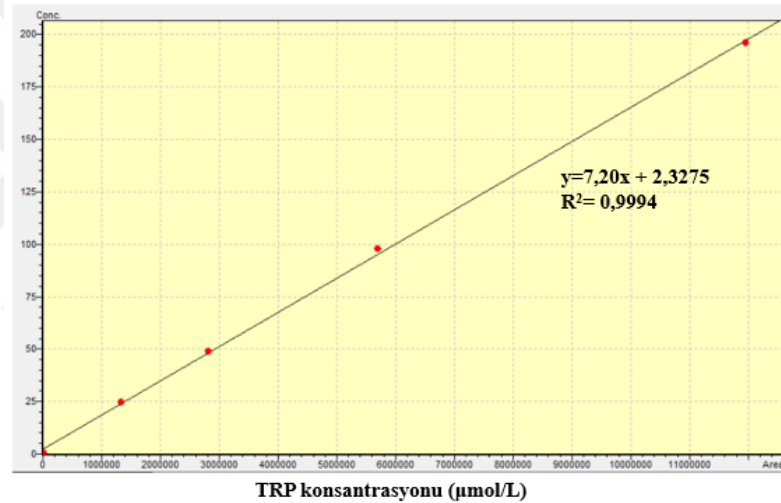
Hazırlanan 5 karışım standart çözeltisi HPLC sistemine 20 μL hacimde enjekte edilerek HPLC cihazının Shimadzu LC Solution programı ile kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 3-4).

Tablo 3-11: Kalibrasyon çözeltilerine ait konsantrasyonlar ve pik alanları

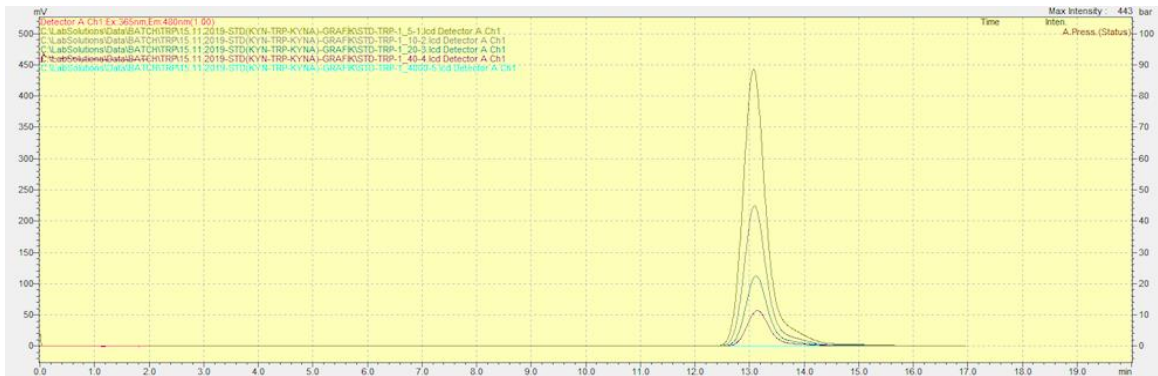
	Konsantrasyon ($\mu\text{mol/L}$)	Pik Alanı
Triptofan (TRP)		
1	195,8000	11965275
2	97,90000	5705455
3	48,95000	2813548
4	24,48000	1340150
5	0,2450000	10552
Kinürenin (KYN)		
1	96,00000	128878
2	48,00000	60960
3	24,00000	29610
4	1,200000	5466
5	0,0480000	38
Kinürenik Asit (KYNA)		
1	2,116000	295009
2	1,058000	144703

3	0,5290000	73647
4	0,0153000	3215
5	0,0010500	332

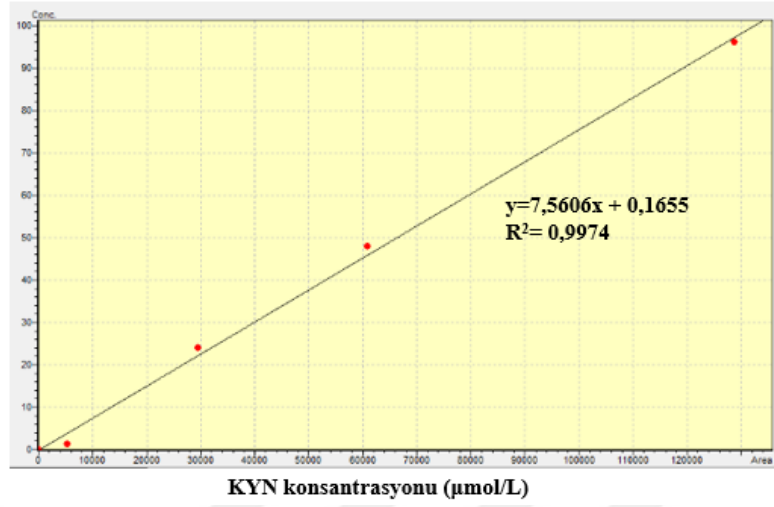
TRP, KYN ve KYNA moleküllerine ait standart kalibrasyon grafikleri $Y=aX+b$ denkleminde göre belirlenmiş olup Y konsantrasyon değerini verirken X alanı vermektedir. Hesaplanan kalibrasyon grafiğinde TRP, KYN ve KYNA'ya ait R^2 değerleri sırasıyla 0,9994, 0,9973 ve 0,9999 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3-5, Şekil 3-7, Şekil 3-9). Analiz için seçilen metodun dedeksiyon limitleri (LOD) TRP için 0.001 $\mu\text{mol/L}$, KYN için 0.0245 $\mu\text{mol/L}$ ve KYNA için 0.05 nmol/L olarak bulunmuştur.



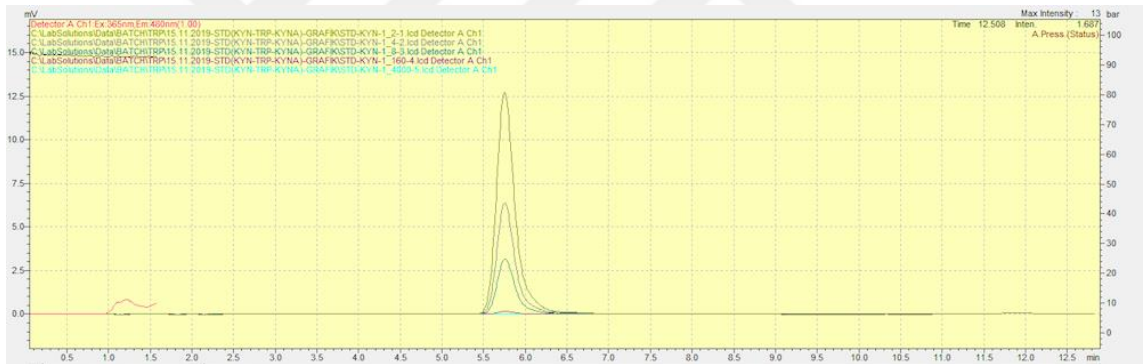
Şekil 3-4:Standart kalibrasyon grafiği (TRP)



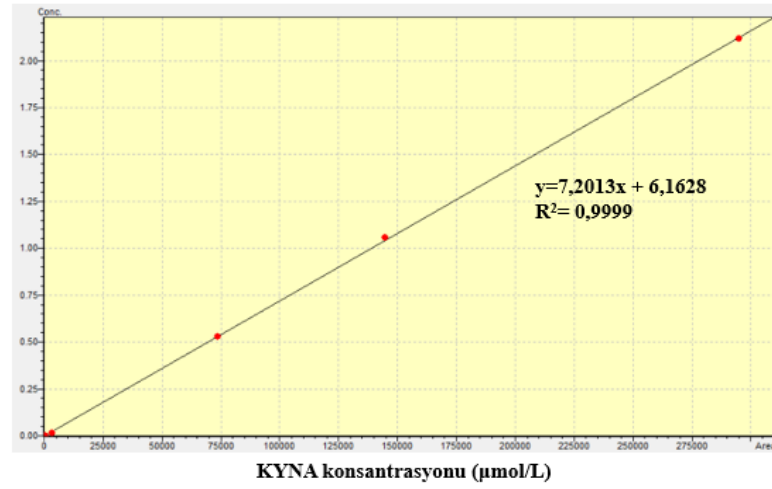
Şekil 3-5:Standart kalibrasyon grafiği (TRP) – R^2 değerleri



Şekil 3-6:Standart kalibrasyon grafiği (KYN)



Şekil 3-7:Standart kalibrasyon grafiği (KYN) – R² değerleri



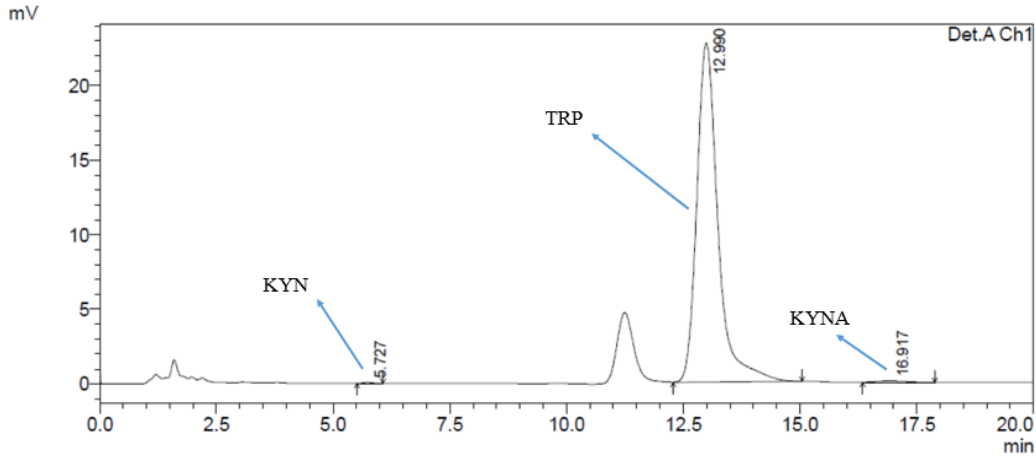
Şekil 3-8:Standart kalibrasyon grafiği (KYNA)



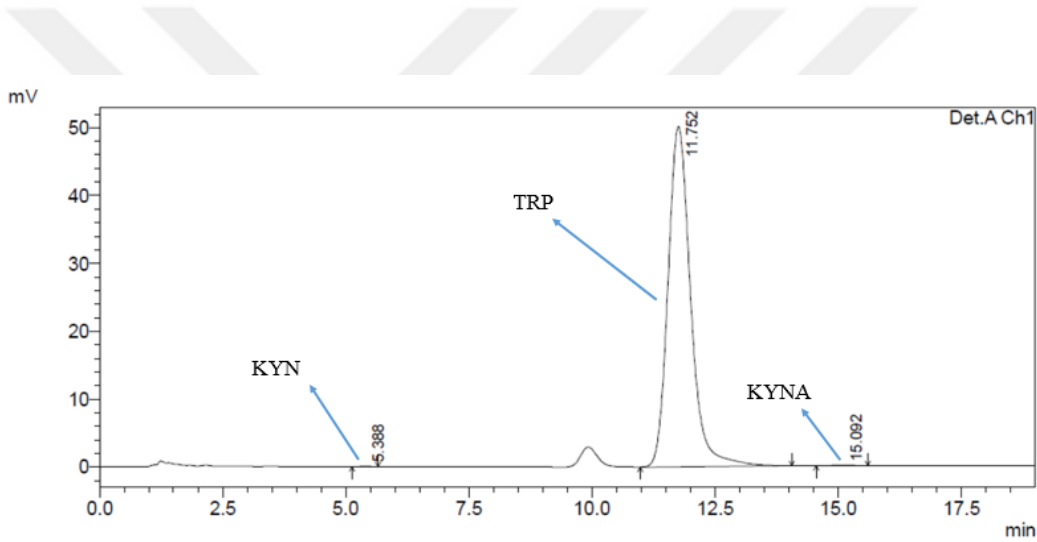
Şekil 3-9:Standart kalibrasyon grafiği (KYNA) – R^2 değerleri

3.2.5.1.3. Plazma örneklerinin hazırlanması

100 μL plazma üzerine proteinleri çöktürmek amacıyla 100 μL 0,624 mol/L perklorik asit çözeltisi ilave edilerek vortekslenildi. 10.000 g'de +4 °C'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra ayrılan süpernatant HPLC sistemine 20 μL hacimde enjekte edildi. Hasta ve kontrollere ait plazma kromatogram örnekleri Şekil 3-10 ve Şekil 3-11'de verilmiştir.



Şekil 3-10:Hasta örneğine ait kinürenin/ triptofan/ kinurenik asit kromatogramı



Şekil 3-11:Kontrol örneğine ait kinürenin/ triptofan/ kinurenik asit kromatogramı

3.3. İstatistiksel Analiz

Bu çalışma verileri SPSS Version 17.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak incelenmiştir. Genotip ve allellerin görülme frekansının gruplar arası farklılıklarının analizinde Ki Kare, Fisher's Exact Testi ve sayısal değerlendirmeler olarak Student-t ve Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. Çalışma gruplarının kendi içinde genotip dağılımlarına göre yapılan sayısal analizler Kruskal Wallis testi ile belirlenmiştir.

Hasta ve kontrollerin Foxp3 ekspresyon düzey karşılaştırmaları için GraphPad Prism (version 8.0.0) programı aracılı parametrik olmayan Man Whitney U analizi

uygulanmıştır. Foxp3 geninin tümör ve sağlıklı vre dokularda ekspresyon analiz sonuçları GraphPad Prism (version 8.0.0) programı tarafından ortaya konmuştur. Ayrıca, ROC (receiver operating characteristics curve) analizi yine SPSS Version 17.0 programı kullanılarak elde edilmiştir.

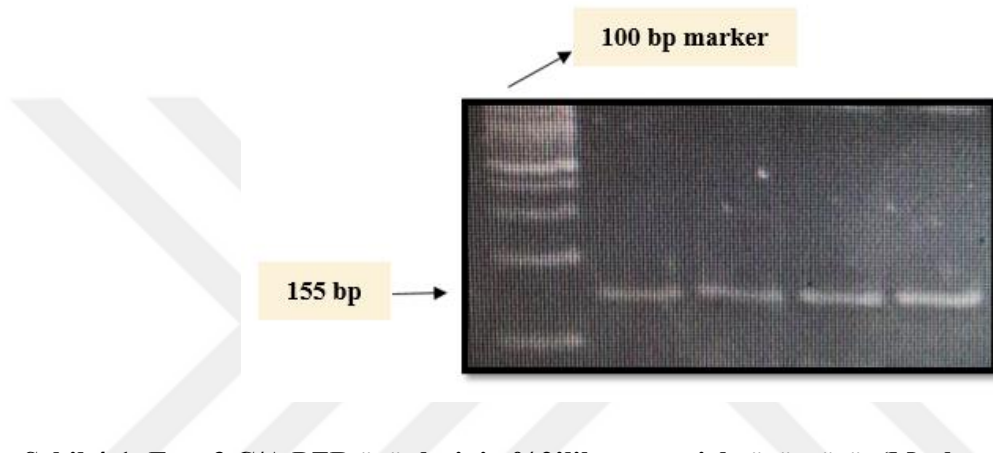


4. BULGULAR

4.1. PZR Ürünlerinin Kontrolüne ait Bulgular

4.1.1. Foxp3 rs3761548 C/A PZR Ürünü ile İlgili Bulgular

Foxp3 C/A gen bölgesinin PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde 155 bç'lik özgül PZR ürününe ait bant elde edildiği gözlemlendikten sonra **PstI** enzim kesimi gerçekleştirildi (Şekil 4-1).

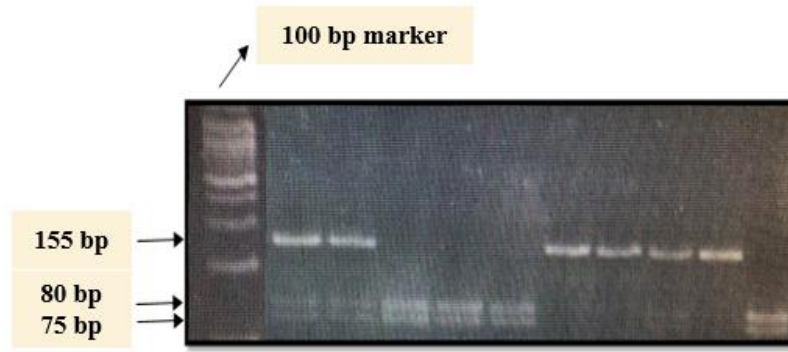


Şekil 4-1: Foxp3 C/A PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü. (Marker: GeneDirex 100 bp DNA Ladder RTU)

4.2. Kesim Ürünlerinin Kontrolüne ait Bulgular

4.2.1. PstI kesim Enzimi ile Foxp3 rs3761548 C/A Polimorfizim Bulguları

Foxp3 C/A PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenip kontrol edildikten sonra, PZR ürünlerine PstI enzim kesimi uygulandı. PstI “enzim kesimi sonrası kesim ürünleri %2'lük agaroz jel elektroforezde yürütüldü. PstI enzim kesimi sonrası agaroz jelde yürütülen PZR ürünlerinden CC genotipine sahip örnekler 80bç,75bç büyüklüğünde, AA mutasyonu içeren PZR ürünleri 155 bç büyüklüğünde, CA genotipine sahip PZR kesim ürünleri ise 155 bç, 80 bç, 75 bç olmak üzere üç band vermiştir (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: PstI enzim kesim ürünlerinin %2'lük agaroz jel görüntüsü. (Marker: GeneDirex 100 bp DNA Ladder RTU)

4.3. Foxp3 C/A Polimorfizm Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirmesi

Çalışmaya İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği ile İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'nda KRK tanısı konulan 159 KRK hastası ile bu klinikte tetkik edilen, kronik hastalık ya da malignite hikayesi bulunmayan 112 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Tüm bu olguların verileri kendi içinde sınıflandırılarak genotipleme ve gen ekspresyon, triptofan ve ilgili metabolit analizleri yapılarak, istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen KRK hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna ait özellikler Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4-1: Çalışma gruplarına ait veriler

Birey sayısı		KRK'lı Hastalar n (%)	Sağlıklı Kontroller n (%)	p
		(n=159)	(n=112)	
Yaş Ortalama ± (SH)		59,93±13,3	55,5±17,5	0,066
Cinsiyet	Erkek	97 (61,4)	57 (50,9)	0,086
	Kadın	61 (38,6)	55 (49,1)	
Tümör Lokalizasyonu				
Sol kolon		20 (16,5)		
Sağ kolon		25 (20,7)		
Transverskolon		2 (1,7)		
Sigmoid		36 (29,8)		
Çekum		6 (5)		
Rektum		29 (24)		
Rekto sigmoid		3 (2,5)		
Tümör Evresi				
I		6 (4,8)		
II		16 (12,8)		
III		64 (51,2)		
IV		39 (31,2)		
Lenf Nodu Metastaz Durumu				
N0		59 (47,2)		
N1		39 (31,2)		
N2		20 (16)		
N3		7 (5,6)		
Uzak Metastaz				
Var		25 (20)		
Yok		100 (80)		
Perinöral İnvazyon				
Var		40 (32,5)		
Yok		83 (67,5)		
Anjiolenfatik İnvazyon				
Var		32 (30,5)		
Yok		73 (69,5)		

n: birey sayısı; SH: Standart hata

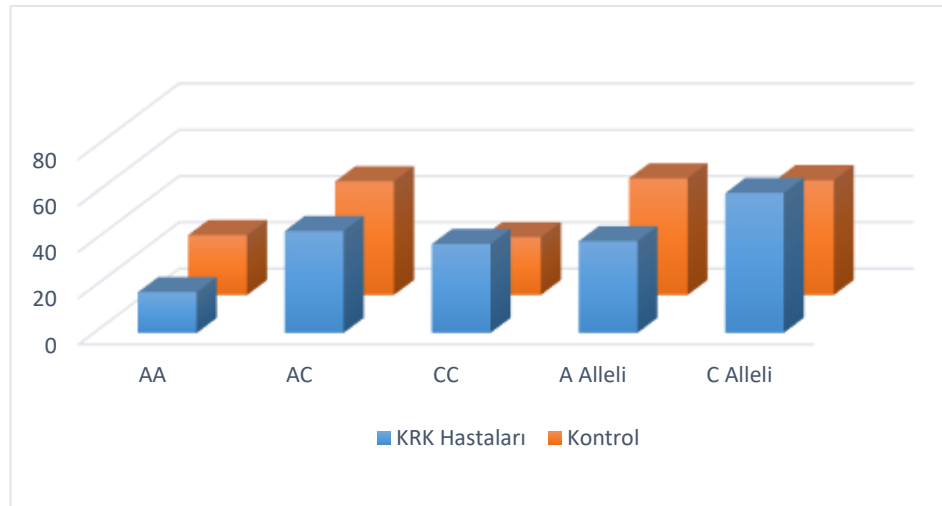
Çalışma grubuna ait KRK'lı bireyler ve sağlıklı kontrollerin Foxp3 rs3761548 C/A genotipleri ise Tablo 4-2'deki gibi detaylandırılmıştır.

Tablo 4-2: Kolorektal kanser hastalarında ve sağlıklı kontrollerde Foxp3 rs3761548 C/A genotipleri

Genotip ve Allel	KRK'lı hastalar n (%)	Sağlıklı Kontroller n (%)	<i>p</i>
Genotip			
CC (%)	61 (38,4)	28 (25)	0,048
AC (%)	70 (44)	55 (49,1)	
AA (%)	28 (17,6)	29 (25,9)	
AA+AC (%)	98 (61,6)	84 (75)	0,021
CC (%)	61 (38,4)	28 (25)	0,099
CC +AC (%)	131 (82,4)	83 (74,1)	
AA (%)	28 (17,6)	29 (25,9)	
Allel			
C (%)	192 (60,4)	111 (49,6)	0,012
A (%)	126 (39,6)	113 (50,4)	

*Gruplar arası farklılık kıkare (χ^2) ile incelenmiştir.

Foxp3 gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde AA, AC, CC genotip frekansları hasta grubunda sırasıyla %17,6, %44, %38,4 ve kontrol grubunda %25,9, %49,1, %25 olarak gözlenmiş olup, hasta ve kontrol grubu genotip dağılımı açısından incelendiğinde aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**p=0,048**).



Şekil 4-3:KRK hastaları ve kontrollerde Foxp3 C/A genotipleri

Foxp3 gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde C allel frekansının kolorektal kanserli hastalarda (%60,4) kontrol grubuna göre (%49,6) yüksek olduğu, A allel frekansının ise hasta grubunda (%39,6) kontrol grubuna (%50,4) göre düşük olduğu gözlenmiş olup, hasta ve kontrol grubu allel dağılımları açısından incelendiğinde aradaki farklılık ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur (**p=0,012**).

CC genotipi taşıma durumu hasta grubunda (%38,4) kontrol grubuna (%25) kıyasla yüksek bulunmuş olup aradaki fark istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulunmuş olup (p=0,021, OR:1,535 %95CI: 1.053-2.236), CC genotipine sahip olmanın hastalık riskini yaklaşık 1,535 kat artırdığı tespit edilmiştir.

C alleli taşıma durumu (CC+AC) hasta grubunda (%82,4) kontrol grubuna göre (%74,1) yüksek bulunmuş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (**p=0,099**).

Çalışma grubuna ait Foxp3 rs3761548 C/A genotiplerinin hastaların patolojik parametreleri ile karşılaştırılması Tablo 4-3'deki gibi detaylandırılmıştır.

Tablo 4-3: Foxp3 rs3761548 C/A genotipleri hastaların patolojik parametreleri ile karşılaştırılması

Parametre	Foxp3 rs3761548 Genotipleri		
	CC n (%)	CA n (%)	AA n (%)
Tümör Evresi			
III/IV	39 (37,9)	47 (45,6)	17 (16,5)
I/II	9 (40,9)	49 (40,9)	4 (18,2)
Lenf Nod Metastaz Durumu			
N+	26 (39,4)	32 (48,5)	8 (12,1)
N-	22 (37,3)	24 (40,7)	13 (22)
Uzak Metastaz			
Var	9 (36)	11 (44)	5 (20)
Yok	39 (39)	45 (45)	16 (16)
Perinöral İnvazyon			

Var	18 (45)	14 (35)	8 (20)
Yok	29 (34,9)	41 (49,4)	13 (15,7)

Nod Metastazı mevcut =N+

Nod Metastazı yok=N-

n: birey sayısı; Grupları arası istatistik analizi kıkare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

4.4. Foxp3 Gen Ekspresyon Düzeyinin Değerlendirilmesi

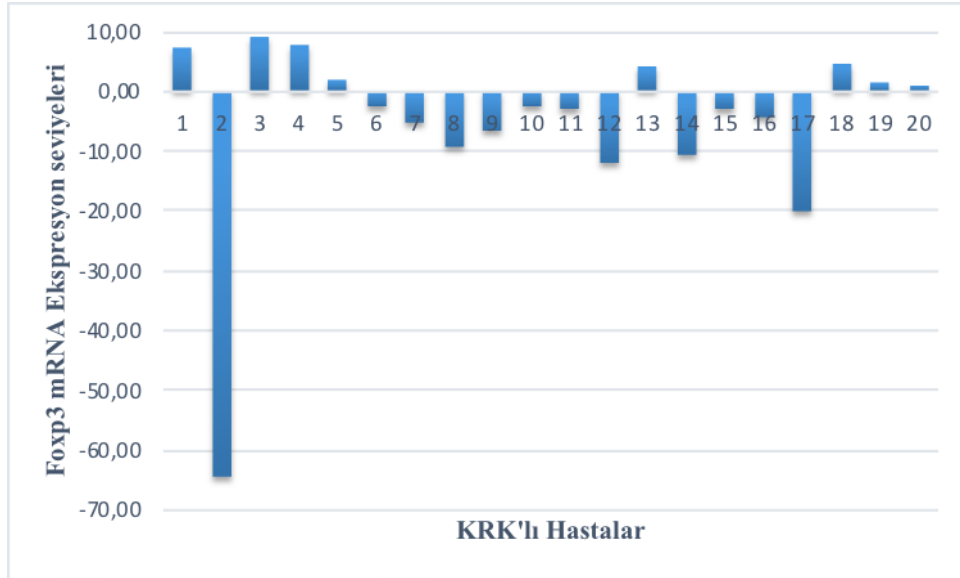
Çalışma grubumuzda yer alan 20 vakanın tümörlü ve sağlıklı evre dokularında Foxp3 mRNA ekspresyon düzeyi qPZR ile analiz edilmiştir. Elde edilen hedef gen olan Foxp3'e ait duplike çalışılmış ortalama Ct değerleri housekeeping olarak belirlenen GAPDH'e ait yine ortalama Ct değerlerinden çıkarılarak delta Ct değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra tümörlü dokuya ait delta Ct değeri control dokuya ait Ct değerinden çıkarılacak delta delta Ct değerleri elde edilmiştir. Kat değişimini ifadesi 2 üzeri delta delta Ct değerlerinin hesaplanmasıyla bulunmuş, delta delta Ct değerinin negatif ya da pozitif olması bu kat değişimine genin rölatif olarak düşük ya da yüksek oranda ekspresyonu olarak ifade edilmiştir. Duplike örneklerin kendi aralarındaki standart hataları da hesaplanmıştır (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Hastalarda Foxp3 mRNA ekspresyon incelemesi

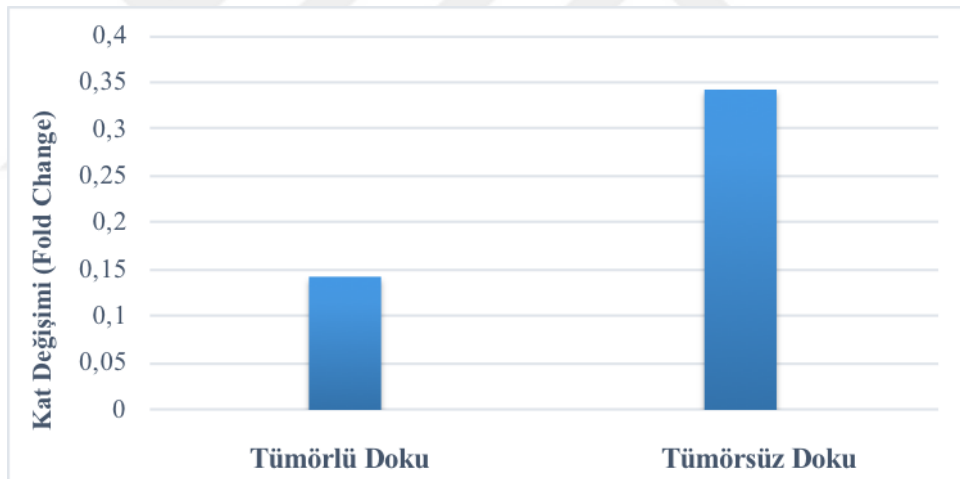
KRK'lı Hastalar	Foxp3 mRNA ekspresyonu	Katlı değişim
Vaka 1	Yüksek	7,35
Vaka 2	Düşük	-64,52
Vaka 3	Yüksek	9,31
Vaka 4	Yüksek	7,83
Vaka 5	Yüksek	1,85
Vaka 6	Düşük	-2,38
Vaka 7	Düşük	-5,14
Vaka 8	Düşük	-9,33
Vaka 9	Düşük	-6,42

Vaka 10	Düşük	-2,72
Vaka 11	Düşük	-2,85
Vaka 12	Düşük	-12,06
Vaka 13	Yüksek	4,08
Vaka 14	Düşük	-10,50
Vaka 15	Düşük	-2,89
Vaka 16	Düşük	-4,38
Vaka 17	Düşük	-19,86
Vaka 18	Yüksek	4,62
Vaka 19	Yüksek	1,48
Vaka 20	Yüksek	1,09

Çalışma grubumuzdaki hastalar arası Foxp3 mRNA ekspresyon düzeyi heterojendir. Gen ekspresyon düzeyleri valide edilmiştir. Kümülatif gen ekspresyon düzeyleri tümörlü ve tümörsüz dokular arasında kıyaslandığında Foxp3 geninin tümör dokusunda normal dokuya göre ekspresyonun 2,4 kat ifade edildiği fakat bu farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak belirlenmiştir (**p=0,048**).



Şekil 4-4: Hastaların kontrollere oranla FoXP3 mRNA ekspresyon düzeylerinin kümülatif incelenmesi



Şekil 4-5: FoXP3 geninin tümörsüz dokulara göre tümörlü dokularda fold change (Kat Değişimi) grafiği

Çalışma grubumuzdaki ileri ve erken tümör derecesine sahip hastalar arasındaki FoXP3 gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, ileri tümör derecesine sahip hastalarda FoXP3'ün erken tümör dereceli olanlara kıyasla daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir ($p=0,021$) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Hastaların patoloji bulguları ve Foxp3 ekspresyonu

Foxp3 ekspresyonu (Fold change)	Ortalama ± SH	<i>p</i> *
Tümör Evresi		
T3 + T4	2,22 ± 0,72	0,021
T1 + T2	0,05 ± 0,03	
Lenf Nod Durumu		
N+	2,51 ± 1,07	0,968
N-	1,5 ± 0,8	
Uzak Metastaz		
Var	2,16 ± 1,27	0,305
Yok	1,97 ± 0,76	
Perinöral İnvazyon		
Var	1,88±1,49	0,579
Yok	2,05 ± 0,74	

Nod Metastazı mevcut =N+

Nod Metastazı yok=N-

Tablodaki değerler X±SH (Standard Hata) olarak verilmiştir.

*Gruplar arası Foxp3 ekspresyon düzeyi karşılaştırması Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Foxp3 gen ekspresyon düzeylerinin Foxp3 rs3761548 A/C Genotipleri göre dağılımı incelendiğinde Foxp3 rs3761548 C/A gen polimorfizmine ait KRK'lı hasta grubunun tümör dokusundaki Foxp3 ekspresyonları ile hastaların taşıdıkları Foxp3 genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (**p=0,320**) (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Foxp3 3761548 C/A genotiplerine göre KRK hastalarda tümörlü doku Foxp3 ekspresyon düzeyleri

Foxp3 ekspresyonu	Foxp3 rs3761548 A/C Genotipleri			
	CC n (%)		CA n (%)	AA n (%)
	ortalama ± SH	<i>p</i> *	ortalama ± SH	ortalama ± SH
KRK Hastalar	2,77 ± 1,44	0,320	0,77 ± 0,55	2,89 ± 1,50

Tablodaki değerler X±SD (Standard Deviasyon) olarak verilmiştir.

*Grupların genotipleri arasındaki Foxp3 ekspresyon düzeyi Kruskal Wallis Test analizi ile gerçekleştirilmiştir (**p=0,320**)

4.5. Plazma Triptofan, Kinürenin ve Kinürenik Asit Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Triptofan ve triptofan metabolitleri olan kinürenin ve kinürenik asit plazma miktar düzeylerinin belirlenmesi için, kolorektal kanserli hastalar ve kontrol örneklerinden alınan plazmalar Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) metodu ile analiz edilmiştir. HPLC yöntemi bir sıvıda çözülmüş bileşenlerin, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girmesi, bu sayede kolon içinde farklı hızlarla hareket etmeleri sonucu olarak da farklı zamanlarda (R_f , alıkonma zamanı) kolonu terk ederek birbirlerinden ayrılması temeline dayanır. Hasta ve kontrol grubunda, plazma triptofan, kinürenin ve kinürenik asit düzeylerinin tayin edilmesi amacıyla, öncelikle önceden belirlenmiş ve hesaplanmış standart çözeltilerinden elde edilen karışım çözeltileri Tablo 3-9'da verilen şekliyle hazırlandı. Elde edilen sonuçlarla kalibrasyon grafiği çizilerek ilgili kalibrasyon grafiği değerleri hesaplandı daha sonra bu kalibrasyon değerleri baz alınarak hasta ve kontrol örneklerinin metabolit miktarları hesaplandı.

Hasta ve kontrol grubu arasında yapılan değerlendirmede, hasta grubunda triptofan ve kinürenin, kinürenik asit konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla p değerleri sırasıyla $p<0,001$; $p=0,003$; $p=0,163$ olarak bulunmuştur.

Hasta ve kontrol grubu arasında yapılan değerlendirmede; hasta grubunda TRP ve KYN konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla düşük bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamı bulunmuş olup p değerleri sırasıyla $p<0,001$; $p=0,003$ olarak tespit edilmiştir (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: KRK hastaları ve sağlıklı kontrollerde plazma TRP/ KYN/ KYNA düzeyleri

Parametre ($\mu\text{mol/L}$)	KRK Hastalar	Sağlıklı Kontroller	p^*
	Ortalama \pm SH	Ortalama \pm SH	
Plazma TRP	14,32 \pm 1,09	26,82 \pm 1,04	$p<0,001$
Plazma KYN	1,33 \pm 0,02	1,42 \pm 0,02	0,003
Plazma KYNA	0,01 \pm 0,001	0,008 \pm 0,001	0,163

Tablodaki değerler $X \pm SH$ (Standart Hata) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasındaki TRP/KYN/KYNA düzeylerinin karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

KRK'lı hastaların patoloji bulguları ve TRP konsantrasyonları değerlendirildiğinde, patolojik olgular ile TRP düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 4-8).

Tablo 4-8: Hastaların patoloji bulguları ve Plazma TRP düzeyleri

Plazma TRP düzeyleri ($\mu\text{mol/L}$)	Ortalama \pm SH	p^*
Tümör Evresi		
T3 + T4	14,12 \pm 1,12	0,853
T1 + T2	15,56 \pm 5,95	
Lenf Nod Metastaz Durumu		
N+	14,41 \pm 1,58	0,853
N-	14,22 \pm 1,61	
Uzak Metastaz		
Var	14,23 \pm 2,62	0,076
Yok	14,35 \pm 1,23	
Perinöral İnvazyon		
Var	11,72 \pm 1,48	0,479
Yok	15,41 \pm 1,36	

Tablodaki değerler $X \pm SH$ (Standart Hata) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasındaki TRP düzeylerinin patolojik parametrelerle karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

KRK'lı hastaların patoloji bulguları ve KYN konsantrasyonları değerlendirildiğinde, patolojik bilgiler ile KYN düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkilendirme bulunmamıştır (Tablo 4-9).

Tablo 4-9: Hastaların patoloji bulguları ve Plazma KYN düzeyleri

Plazma KYN düzeyleri ($\mu\text{mol/L}$)	Ortalama \pm SH	p^*
Tümör Evresi		
T3 + T4	1,32 \pm 0,02	0,263
T1 + T2	1,46 \pm 0,13	

Lenf Nod Durumu		
N+	1,33 ± 0,03	0,853
N-	1,33±0,04	
Uzak Metastaz		
Var	1,28 ± 0,04	0,305
Yok	1,34 ± 0,027	
Perinöral İnvazyon		
Var	1,29±0,06	0,659
Yok	1,35 ±0,026	

Tablodaki değerler X±SH (Standart Hata) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasındaki TRP/KYN/KYNA düzeylerinin karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

KRK'lı hastaların patoloji bulguları ve KYNA konsantrasyonları değerlendirildiğinde, patolojik olgular ile KYNA düzeyleri arasında istatistiksel bir ilişkilendirme yapılamamıştır (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: Hastaların patoloji bulguları ve Plazma KYNA düzeyleri

Plazma KYN düzeyleri (µmol/L)	Ortalama ± SH	p*
Tümör Evresi		
T3 + T4	0,01 ±0,001	0,674
T1 + T2	0,01 ± 0,003	
Lenf Nod Durumu		
N1, N2, N3	0,01±0,002	0,247
N0	0,009 ±0,0009	
Uzak Metastaz		
Var	0,01 ± 0,002	0,842
Yok	0,01 ± 0,001	
Perinöral İnvazyon		
Var	0,01 ± 0,002	0,969
Yok	0,01 ± 0,001	

Tablodaki değerler X±SH (Standart Hata) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasındaki TRP/KYN/KYNA düzeylerinin karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

4.6. ROC Eğrisi Analizi

Bir testin tanısal performansı veya hastalıklı vakaları normal vakalardan ayırt etmek için bir testin doğruluğu, Alıcı Çalışma Karakteristik (receiver operating characteristic curve, ROC) eğrisi analizi kullanılarak değerlendirilir.

Bu çalışmada HPLC sonucunda elde edilen plazma triptofan düzeylerinin doğruluğunu KRK hasta ve sağlıklı grup arasında belirginliğini kuvvetlendirmek adına ROC eğrisi analizine başvurulmuştur. Sonuç olarak, plazma triptofan parametresinde 20,44 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üstündeki değerler için %92 duyarlılık, %80 özgünlükle hasta grubumuzun olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-6) (Tablo 4-11).

Tablo 4-11: KRK hasta ve sağlıklı kontroller arasında plazma TRP düzeyleri için ROC eğrisi analizi

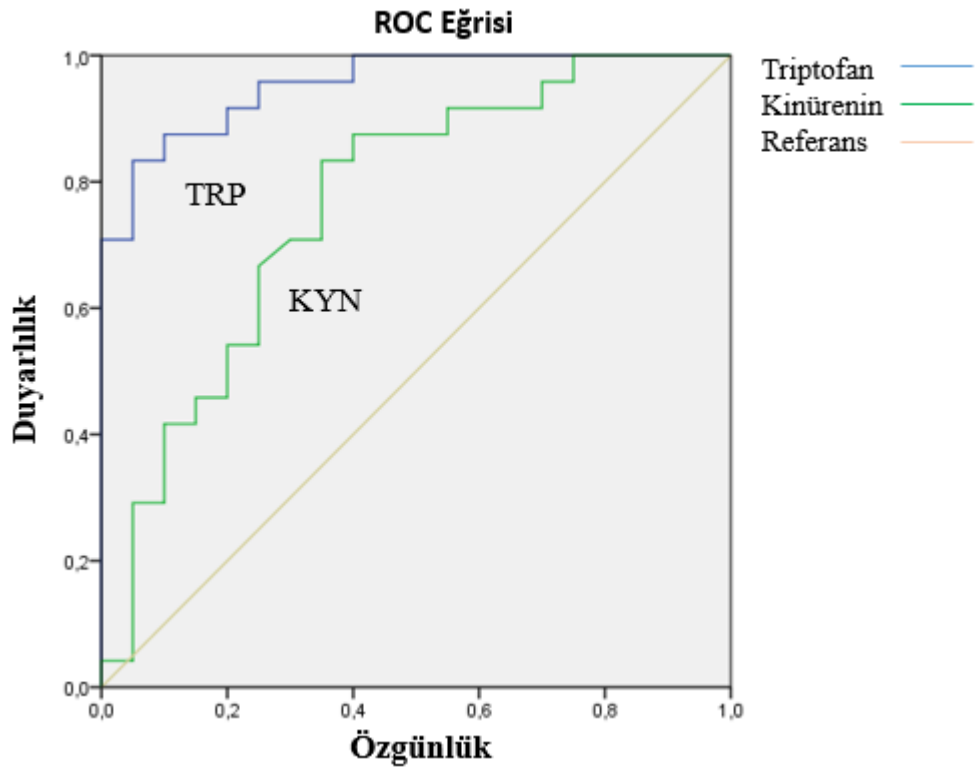
Alan	SH	p	95 % CI
0,954	0,027	0,000	0,901- 1,000

Bu çalışmada HPLC sonucunda elde edilen plazma kinürenin düzeylerinin doğruluğunu KRK hasta ve sağlıklı grup arasında belirginliğini kuvvetlendirmek adına ROC eğrisi analizine başvurulmuştur. Sonuç olarak da plazma kinürenin parametresinde 1,37 $\mu\text{mol/L}$ 'nin üstündeki değerler için %71 duyarlılık, %70 özgünlükle hasta grubumuzun olduğu söylenebilir (Şekil 4-6) (Tablo 4-12).

Tablo 4-12: KRK hasta ve sağlıklı kontroller arasında plazma KYN düzeyleri için ROC eğrisi analizi

Alan	SH	p	95% CI
0,766	0,074	0,003	0,621-0,910

Bu çalışmada HPLC sonucunda elde edilen plazma kinürenik asit düzeylerinin doğruluğunu KRK hasta ve sağlıklı grup arasında belirginliğini kuvvetlendirmek adına ROC eğrisi analizine başvurulmuştur. Ancak, yapılan analizde plazma kinürenik asit parametresinde elde edilen ROC eğrisi sonrası test için yüksek duyarlılık ve özgüllük saptanamamıştır.



Şekil 4-6: KHK hasta ve sağlıklı kontroller arasında plazma TRP ve KYN düzeyleri için ROC eğrisi

5. TARTIŞMA

Kolorektal kanser (KRK), kadınlarda ve erkeklerde dünya çapında en yaygın üçüncü kanser olarak literatürde yerini almaktadır. Daha çok batı toplumlarında izlenen kolorektal kanser, kötü beslenme alışkanlıkları, sigara içme, bağırsak iltihabı hastalığı, polipler, genetik faktörler ve yaşlanma gibi risk faktörleri ile ilişkili bulunmuştur [287]. Multifaktöriyel sebeplere bağlı olarak gelişen KRK karsinogenez mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla pek çok bilimsel çalışma yapılmasına rağmen tedavi başarısı halen istenilen kapsamda olamamaktadır. Tedavi yöntemlerinde hedef alınan gerek çevresel gerekse genetik-moleküler faktörlerin mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bireylerdeki genetik ve moleküler farklılıklar metabolizma değişikliklerine neden olmaktadır. Biyolojik sistemlerdeki metabolizma farklılıklarının kemoterapi, radyoterapi gibi geleneksel tedavilere yanıtındaki başarısızlığın yerine immünoterapi gibi kişiye özgü tedavi yöntemleri ile çözülebileceğini düşündürmektedir. Kişiye özgü immünoterapi uygulamaları için deneysel anlamda kapsamlı bilimsel çalışmalar yürütülmektedir. Günümüz itibariyle immünoterapi çalışmaları ancak yarım yüzyıllık bir geçmişe sahip olsa da geleneksel kanser terapileri ile karşılaştırıldığında daha etkili tedavi seçenekleri olduğu gösterilmiştir. Ancak, kanser immünoterapi uygulamalarının da başarısını sınırlayan tedaviye direnç ve yan etki mekanizmalarının oluşması gibi çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlerin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve çözülebilmesi durumunda gerek KRK gerekse diğer kanserlerin tedavilerinde yeni bir dönem başlayacağını sinyalleri tüm dünyada umut vadeci bulunmaktadır.

Kolorektal kanserde tümör mikroçevresi, tümör gelişimi sırasında meydana gelen somatik mutasyonel ve epigenetik durumlardan etkilenmektedir [288]. İmmün kontrol noktaları, immün aktiviteyi modüle etmek ve kendi antijenlerine karşı toleransı desteklemek için bir dizi doğal ve adaptif düzenleyici mekanizmadır. Bu mekanizmalar, immün hücre aracılı tahribata karşı direnci arttırmak için tümörlerde aşırı ifade edilmektedir [289],[290]. Tümör mikroçevresi (TME), kanserin baskılanması ve gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Kolorektal kanserde çeşitli mekanizmalar immün baskılanmaya neden olmaktadır. Foxp3+ T

düzenleyici (Treg) hücrelerin artışı ve tip 2 makrofajlara karşı inhibitör moleküllerin aşırı ekspresyonu ile antijen sunan hücrelerin baskılanması tümör hücrelerinin immün sistemde kaçma yöntemlerini ifade etmektedir [291]. Karsinogenez sırasında tümöral immün kaçış hücrelerel immün cevabı bozan önemli bir süreçtir [292]. Etkili bir hücresele bağışıklık cevabında, efektör ve Foxp3+ düzenleyici T hücrelerinin varlığı veya yokluğu oldukça önemlidir.

İmmün metabolizmada ortaya çıkan çeşitli değişiklikler, kolorektal kanserde olduğu gibi diğer solid tümörlerde de bölgesel metastazlarla ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir [293],[294]. İnflamasyon, kolorektal kanserlerin ortak bir özelliğidir. İnflamasyonda ve yeterli oksijen varlığında metabolik yolların glikoliz lehine değiştirilmesi (warburg etkisi) ile tümör hücrelerinin hayatta kalması ve çoğalması sağlanmaktadır [148]. Böylece anabolik yolların düzenlenmesi ile birlikte, genellikle artan asitlik, düşük oksijen seviyeleri, besin maddeleri için rekabet ve atık substratların oluşumu nedeniyle T hücrelerine aleyhine olan bir ortama yol açılmaktadır [291],[295]. Aktif T hücrelerinde, immün kontrol noktaları olarak adlandırılan inhibitörler ortak reseptörleri ifade etmektedirler. İnhibitörler, antijen sunan hücrelerde ve immün mikroçevredeki diğer hücrelerde bulunan ligandlara bağlandıklarında, enflamatuar yanıtı düşürmektedirler. Böylece, kendine toleransı korumak ve bağışıklık aracılı doku hasarını sınırlandırmak için doğal bir mekanizma ortaya çıkmaktadır [296]. Ayrıca, bu sürecin toksik hücre metabolit üretimini arttırdığı ve efektör hücre aktivitesini daha da baskılayan Foxp3+ Treg hücre aktivitesini indüklediği görülmektedir [297]. Ortaya çıkan immün hücre infiltrasyonuna rağmen, kolorektal tümörler immün sürveyanstan kaçınarak immün aracılı harabiyete direnç göstermektedir.

Triptofan metabolizması ve immün sistem arasındaki bağlantı üzerine iki önemli mekanizma öne sürülmüştür. Birincisi, triptofan değregasyonuna bağlı olarak lokal doku çevresinde triptofanın azalması nedeniyle T hücre proliferasyonunun azalması, ikincisi ise bu yolda IDO sonrası basamaklarda oluşan ürünlerin yani genel ifadeyle kinüreninlerin efektör T hücre veya diğer hücrelerle doğrudan etkileşerek immün reaktiviteyi baskılamasıdır. Bu metabolitlerin bazıları Foxp3+ Treg hücrelerin artışı ile in vitro T hücre proliferasyonunu baskılamakta, T hücre apoptozuna neden olmakta ve doğal

öldürücü hücrelerin fonksiyonunu etkileyebilmektedir [41], [298]. Bir çalışmada, triptofan metabolizmasındaki kinurenine yolağının (KP), birçok kanserde inflamasyon ve neoplastik progresyon arasında bir bağlantı sağladığı rapor edilmiştir [118]. Bu nedenlerle, triptofan metabolizmasını ve immün moleküller ile bağlantısını aydınlatmak yeni immünoterapötiklerin geliştirilmesinde oldukça önemlidir. KRK'da triptofan metabolizması ve ilgili immün moleküller arasındaki ilişkinin tespit edilmesi bu durumun etkili bir klinik prognostik belirteç olarak kullanma potansiyelini sağlayacaktır.

Tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) kolorektal kanser etyopatogenezine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Tek nükleotid polimorfizmlerinin, genetik varyantların protein fonksiyonunu ve bireyin kansere duyarlılığını değiştirebileceği tespit edilmiştir. Tümör duyarlılığına neden olan SNP'lerin genetik ve epigenetik mekanizmalarının belirlenmesi, farklı kanser tiplerinin moleküler patogenezinin anlaşılmasında oldukça yüksek öneme sahiptir. Klinik açıdan, tek nükleotid polimorfizmler birçok kanser türünde potansiyel teşhis ve tedavi edici biyobelirteçler olarak kabul edilmektedirler. Foxp3 transkripsiyon faktörü Treg hücrelerinin fonksiyonu için kritik olarak tanımlanmış önemli bir belirteçtir. Foxp3 gen polimorfizmleri, Treg hücrelerini fonksiyonel veya kantitatif olarak değiştirebilmektedir [267],[268]. Son yapılan çalışmalar, Foxp3 geninde ortaya çıkan mutasyonların immün cevap anormallikleri ile ilişkili karsinogenez sürecine katkıda bulunabileceğini göstermiştir. Tümör hücrelerine infiltre olan Treg hücreleri prognozla ilişkilendirilmiştir. Bu sebeple, Foxp3 geninin biyolojisini anlamak yeni immünoterapötiklerin geliştirilmesinde oldukça önemlidir [299].

Düzenleyici T (Treg) hücreler, immün sisteminin ana bileşenlerinden biri sayılmaktadır. Foxp3 proteini, Treg (CD4 + / CD25 + veya CD4 + / CD25 -) hücrelerinin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde eksprese edilmektedir [299]. Malignant tümörlerdeki artmış Foxp3 ekspresyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Yapılan pek çok çalışma kapsamında, erken evre (I/II) ve geç evre (III/IV) KRK hastalarından alınan doku örnekleri karşılaştırılmış, erken evre örneklerinin geç evre örneklerine göre mRNA düzeyinde artmış Foxp3 ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu ayrıca, lenf nodu metastazı olan hastaların, lenf nodu metastazı olmayanlara göre daha yüksek Foxp3 mRNA

ekspresyonuna sahip olduğunu göstermektedir. Artan Foxp3+ Treg hücreleri, immün reaksiyonu inhibe ederek tümörün immün sistemden kaçmasına neden olmaktadır [276]. Foxp3+ Treg hücreleri ve tümör hücreleri, IL-10 ve TGF- β gibi sitokinler salgılayarak, naif T ve aktif T hücrelerinin çoğalmasını önlemektedir. Sonuç olarak, tümöre karşı istenilen immün yanıt oluşturulamamakta ve tümör hücresi lenf nodu metastazı desteklenmektedir [299]. Yapılan çalışmalar, Treg hücrelerinde ifade edilen Foxp3 geninin mRNA düzeyindeki artmış ekspresyonu Foxp3'ün moleküler etki mekanizmasını açıklamıştır ancak tümör hücrelerindeki ekspresyon farklılıkları halen tam olarak aydınlatılmamıştır.

Shen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Foxp3'ün rs3761548 AA genotipinin, transkripsiyon faktörleri E47 / c-Myb'e bağlanmasını önleyen genin hatalı transkripsiyonuna sebep olduğu ve bunun sonucunda Foxp3 proteininin düşük miktarlarda üretildiği bildirmiştir. Düzenleyici T hücrelerinin immün yanıtları baskılama mekanizmalarında Foxp3'ün rolü oldukça önemlidir. Düşük Foxp3 proteinin üretimi, Treg hücre fonksiyon bozukluğuna ve pro-enflamatuar tepkilerin ortaya çıkmasına neden olabileceği düşünülmektedir [300]. Tez çalışmamız kapsamında, Foxp3'ün böylesi moleküler mekanizmalarındaki değişikliklerin, tümör hücrelerinden ya da Treg hücrelerinden kaynaklandığını tespit edemesekte KRK'lı vakalarda toplam Foxp3 ifadesinin, tümörlü dokulara göre daha düşük ekspresyona sahip olduğunu belirledik. Elde edilen sonuçlar, çalışma grubumuzda bulunan ileri evre hastalarının erken evre hastalarına kıyasla daha yüksek Foxp3 ekspresyonuna sahip olmasının, Foxp3'ün tümör hücrelerinde de Treg hücrelerindeki rolüne benzer olarak tümör büyümesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Foxp3 transkripsiyonunun altında yatan moleküler mekanizmaların daha fazla belirlenmesi, Foxp3 transkripsiyonel düzenleme kanser ve otoimmün hastalıkların özelliklerini geliştirmek için alternatif terapötik stratejiler hakkında yeni bilgiler sağlayabilecektir. Bu sebeple, Foxp3 genine ait ekspresyon farklılıklarının moleküler mekanizmasını açıklığa kavuşturmak amacıyla kolorektal kanser ve / veya diğer kanser türleri üzerine geniş kapsamlı moleküler çalışmalar gerekmektedir.

Foxp3 genindeki varyasyonların, kanserler ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumlarla da ilişkili olduğu tespit edilmiştir [301],[302]. Bu tez çalışmasında hiçbir tedavi almamış KRK hasta ve sağlıklı kontrollerden oluşan olgularda Foxp3 gen varyasyon dağılımı ve ekspresyonunu tayin edilip spesifik polimorfizm (rs3761548) ile hastaların klinik ve patolojik verileri ile ilişkilendirilerek Foxp3 genini KRK hastalarında muhtemel biyobelirteç olarak önerme amaçlanmıştır. Foxp3 geninin promotör, ekson ve intron gibi çeşitli bölgelerinde, gen ekspresyonu, miRNA ekspresyonu, gen splice mekanizması veya kodlanmış protein yapısı ve aktivitesi ile ilişkili fazla 100'lerce (tek nükleotid polimorfizmi) tanımlanmıştır. Foxp3 rs3761548 gen varyantı Foxp3 geninin promotör bölgesinde bulunmaktadır [303].

Çalışma kapsamındaki olguların demografik bilgileri analiz edildiğinde hasta ve kontrol grubunda yaş farkında anlamlılık saptanmamıştır. Öte yandan cinsiyet dağılımına bakıldığında hastaların yüzde 61,4 erkek iken yüzde 38,6'lık geri kalan kısmı kadınlardan oluşmaktadır.

Foxp3 genine ait tek nükleotitlerin KRK ve kontrol grubu arasında allel ve genotip dağılımı incelendiğinde rs3761548 varyantının hastalık riskine yönelik anlamlı bir rolüne bu çalışma grubunda ulaşılamamıştır.

Bu çalışma kapsamında Foxp3 C/A gen polimorfizm analizi sonucuna göre genotip ve allel dağılımı açısından çalışma grubumuz incelendiğinde; KRK hastaları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır. Analiz sonucu yapılan değerlendirmede, çalışmamızda yer alan 159 KRK hastasında A allel frekansının kontrol grubuna göre düşük olduğu ve C allel frekansının ise hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, CC genotipi taşıma durumu hastalarda olup kontrollere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Aradaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Yan-Qi He ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalığı (KHDAK) ve Foxp3 C/A rs3761548 gen polimorfizmi arasındaki ilişki araştırılmış ve anlamlı sonuçlar bulunmuştur. 192 hasta ve 259 kontrol üzerinde yapılan bir çalışmada, A allel taşıyıcılığının KHDAK riskini artırdığı ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur. Ayrıca çalışma sonuçlarına göre; AA

ya da AC genotipi taşıyıcısı olmak da benzer şekilde yüksek risk KHDAK hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Klinik ve patolojik parametrelere göre yapılan değerlendirmede, A allel taşıyıcılığına evre II KHDAK hasta grubunda daha fazla rastlandığı istatistiksel olarak ortaya konulmuştur [304].

Nazanin ve ark. tarafından erkekler üzerinde prostat kanseri ve Foxp3 ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hasta grubunda AA genotip ve A allel taşıyıcılığının kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunduğu tespit edilmiş olup AA genotip ve A allel taşıyıcılığının prostat kanseri riskini artırabildiği istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Ayrıca CC genotip ve C allel taşıyıcılığının hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, Foxp3 rs3761548 gen varyantı prostat kanserine yakınlıkla ilişkilendirilmiştir [305].

Weichao Jiang ve ark. tarafından differansiye tiroid kanseri üzerine yapılan bir araştırmada, A allel görülme sıklığının hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca AC genotip taşıyıcılığının da hastalığa ait risk parametrelerinden biri olduğu ifade edilmiştir. Klinik ve patolojik parametrelere göre yapılan incelemede, tümör çapı 1 cm üzeri olan hastalarda A allel taşıyıcılığının daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, Foxp3 rs3761548 gen varyantının hastalığa ait agresif tümör büyümesi ile ilişkilendirilebileceği ifade edilmiştir [301].

Lei Chen ve ark. tarafından kolorektal kanserli hastalar ile Foxp3 rs3761548 gen varyantı arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada; AA, AC genotip taşıyıcılığının hastalığa ait risk parametrelerinden olduğu ifade edilirken, A allel taşıyıcılığının hastalığa ait yakınlığı artırdığı ifade edilmiştir. Çalışmada klinik parametrelere ait herhangi bir istatistiksel bulguya rastlanmamıştır [302].

Çekin ve ark. tarafından türk popülasyonu üzerinde yapılan bir çalışmada, romatoid artrit hasta vakalarında Foxp3 rs3671548 SNP'leri araştırılmış ve romatoid artrit hastalarında C alleli taşımanın yüksek risk taşıdığı istatistiksel olarak ispatlanmıştır [306]. Türk popülasyonunda Foxp3 rs3761548 SNP'i yapılan başka bir çalışmada ise, Foxp3 rs3671548 SNP'i Multiple skleroz (MS) olgularında, A allel frekansı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş olup bu fark

istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur [307]. Foxp3 geni rs3671548 SNP'leri üzerinde yapılan pekçok çalışma, aynı popülasyonda dahi farklı allel frekansları gösterebilmektedir. Çalışmalarda ortaya çıkan bu genotip farklılıklarının nedeninin Foxp3 rs3671548 SNP'lerinin dinamik mutasyona uğraması sebebiyle olabileceğini düşündürmektedir.

Foxp3 polimorfizmlerinin Türk popülasyonları için genotip dağılımına dair bir veri olmadığı için, sağlıklı kontrol grubunun allel sıklığı sonuçlarını diğer etnik grupların sağlıklı kontrolleri ile karşılaştırdık. Foxp3 rs3671548 C allel frekansı farklı etnik kökenlere göre %4 ile %57 arasında değişen farklılıklar göstermektedir. Çalışmamızda, Foxp3 rs3671548 SNP'inin C allel frekansını %49,6 olduğunu tespit ettik.

Bu çalışma kapsamında Foxp3 gen ekspresyonu sonuçları değerlendirildiğinde; hastaların kolorektal tümörlü ve sağlıklı çevre doku örneklerinde Foxp3 gen ekspresyonunu incelediğimizde hastalar arası heterojen bir ekspresyon profil gözlemlenmektedir. Hastaların tümör büyüklüğü, lenf nodu metastazı, perinöral invazyon ve anjiyolenfatik invazyon gibi patolojik parametreleri ile Foxp3 gen ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Çalışma grubumuzdaki bazı hasta ve kontrollerin doku Foxp3 ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında hasta Foxp3 gen ekspresyon düzeyinin artması tümör büyüklüğü patolojik bulgusu açısından ile hastaların klinik ve tümöral özellikleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığına rastlanmıştır ($p=0,021$).

Bu bağlamda Foxp3 mRNA düzeyindeki ekspresyon tespitlerinin hastaların klinik ve tümöral özelliklerine bakılmaksızın serbest tanı veya tarama testlerine yararlı ek bir prognostik araç olarak tamamlayıcı belirteçler olabileceği düşünülebilir. Tümör mikroçevresi ve kanser hücreleri, belirli koşullar altında, IL-10 veya TGF- β 'ye maruziyetten sonra, sitotoksik T hücrelerini inhibe etmesiyle efektör yanıtlarını sınırlayan Foxp3+ Treg hücrelerinin gelişimini başlatabilir, böylece anti-tümör immünesini bozabilmektedir [308].

Derynck ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, TGF- β sinyal yolağının sağlıklı dokularda ve erken evre KRK olgu dokularında, hücreyi apoptozise yönlendirerek hücre proliferasyonunu azalttığı ve ayrıca immortalizasyon

inhibisyonu yoluyla tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını fakat ileri evre kolorektal karsinomalarda TGF- β sinyal yolağının fonksiyon kaybı ile kolorektal tümörogenezisi desteklediği gösterilmiştir [309].

Xu ve Pasche'nin yaptığı bir çalışmada, tümör büyüklüğü arttıkça TGF- β sinyal yolağının tümör baskılayıcı özelliklerinin kaybolduğu belirlenmiştir [310]. Kolorektal karsinogenezin geç evrelerinde, TGF- β sinyal yolağının onkogenik aktivitesi ortaya çıkmasıyla kanser ilerlemesi, invazyon ve tümör metastazı desteklediği rapor edilmiştir. Tümör mikroçevresi ile Foxp3+ Treg'lerin etkileşimleri sonucunda tümöral immün kaçış ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, Foxp3'ün sitoplazma veya nükleustaki dağılımı onun spesifik rolünü etkilediği de bilinmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalar, KRK'lı tümör dokuları üzerinde yapılan immün boyamalarda evresine bağlı olarak Foxp3'ün KRK'lı dokularda daha az ekspresyonu ve kanser evresi ilerleyişi ile Foxp3 ekspresyonunun çekirdekten sitoplazmaya kaydığı gösterilmiştir, ancak literatürde kanser hücre tipine bağlı olarak Foxp3 gen ekspresyonu değişkenlik göstermektedir [311]. Tümör hücrelerindeki Foxp3 gen ekspresyon düzeylerindeki bu değişimler prognostik bir faktör olarak klinik önem potansiyeli olmasına rağmen, ortaya çıkan Foxp3 gen ifadesi değişikliklerinin nedeni tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan birçok çalışma, Foxp3'ün bu ekspresyon farklılıklarının nedenini çözmeye odaklanmakta olup, Foxp3'ün biyobelirteçler ve terapötik hedefler olarak kullanılmasını amaçlamaktadır [140], [148].

Çalışmamızın en önemli kısıtlılıkları arasında hasta sayısının yeterli olmayışı ve hasta örneklerinde patoloji sonrası çalışma kriterleri dışı durumlar, numunelerdeki öngörülmeyen geçersiz örnek kaybı ve numune eşleştirmelerine bağlı olarak bazı hastaların çalışma dışı bırakılmaları yer alabilir.

Foxp3 geni, bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesinde en önemli genlerden biri olduğundan, KRK kanser hastalarında bu genin ekspresyonunun önemli olduğu sonucuna varılabilir. Bu Tek Nükleotit Polimorfizmi, genin promotor bölgesinde yer aldığından Foxp3 proteinin ekspresyon seviyesini etkileyebilir. Foxp3'ün genetik polimorfizmi yararlı bir klinik prognostik belirteç olarak kullanmak ve

moleküler mekanizmasını açıklığa kavuşturmak amacıyla kolorektal kanser ve diğer kanser türleri hakkında geniş çaplı klinik çalışmalar gerekmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında elde edilecek bu muhtemel kazanımların, KRK hastalarında Foxp3 molekülünün dahil edilebileceği hastalık risk ve progresyonunda önerilecek önemli biyobelirteçlerden biri olup olamayacağı konusuna ışık tutarak, Foxp3 ile ilgili moleküler kanser mekanizmaları araştıran literatürlere temel oluşturabileceği kanaatindeyiz. Çalışmamız kolorektal kanserlerde Foxp3 SNP, ekspresyon düzeyinin bir arada araştırıldığı özgün bir çalışma niteliğindedir.

Bu çalışma kapsamında kolorektal kanser vakalarında plazma Kinürenin (KYN), Triptofan (TRP) ve Kinürenik asit (KYNA) düzeyleri değerlendirildiğinde; plazma TRP, KYN ve KYNA düzeyleri kolorektal tümörlü ve sağlıklı kontrol örnekleriyle kıyaslandığında, hasta olgularında düşük plazma TRP ve KYN düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup KYNA düzeyleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla $p < 0,001$; $p = 0,003$; $p = 0,163$).

Çalışma grubumuzdaki bazı hasta ve kontrollerin plazma Kinürenin, Triptofan ve Kinürenik asit seviyeleri tümör evresi, lenf nod durumu, uzak metastaz ve perinöral invazyon gibi çeşitli patolojik bulguların açısından değerlendirildiğinde hasta olgularındaki plazma KYN, TRP ve KYNA düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel bir bulguya yansımamıştır. Bu çalışma kapsamında, plazma TRP düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulunmuş olan hastalara ait analiz sonucu ROC eğrisi ile test edilmiş ve plazma TRP düzeyinin $20,44 \mu\text{mol/L}$ 'nin altında kalmasının kolorektal kanserde risk göstergesi olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, bir diğer metabolit olan KYN için de "ROC eğrisi" analizi yapılmış ve plazma kinürenin parametresinde de $1,37 \mu\text{mol/L}$ 'nin altındaki değerler için KRK'da risk oluşturabileceği öngörülmüştür.

Triptofan metabolizması, bağışıklık sürveyansından kaçınmak için kanserler tarafından kullanılan önemli bir mekanizmadır [312],[313]. Birçok çalışma, triptofan ve triptofan metabolitleri olan KYN ve KYNA'nın, zihinsel bozukluklar, böbrek hastalığı, bağışıklık sistemi gibi hastalıkların gelişimi ile ilişkili olduğunu

göstermiştir [314], [315]. Triptofan metabolizmasının kinürenin yolağı boyunca ilerleyen triptofan (TRP), indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO1 / IDO2) ve triptofan metabolizmasının başlangıç adımı (TRP) olan tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) tarafından N-formil-kinurenine (NFK) dönüştürülür. Triptofan bu metabolik yolağında kinüreninin oluşumunun, IDO enzimi ile kritik etkileşimi nedeniyle serum veya plazma kinürenin konsantrasyonunun triptofan konsantrasyonuna oranı, IDO enzim aktivitesinin önemli bir belirteci olabilmektedir. IDO aktivitesindeki artışa bağlı olarak Kyn/Trp oranının arttığı hipotezini güçlendiren veriler çeşitli immünoinflamatuvar hastalıklarda ve son yıllarda bazı kanserlerde yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur [316], [317].

Jong ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, over kanserli hasta serumlarında Kyn/Trp oranları incelendiğinde, hastalarda kontrollere kıyasla daha yüksek Kyn/Trp oranı tespit edilmiştir. Bu çalışmada, KYN ve Kyn/Trp oranının over kanserinde ileri evrede anlamlı düzeyde yüksek Kyn/Trp oranı olduğu tespit edilmiştir [316]. Lyon ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmadan elde edilen bulgular Kyn/Trp oranının meme kanserli hastalarda yüksek olduğunu göstermiştir [318]. Winkler ve ark. Tarafından jinekolojik kanserler üzerinde yapılan bir çalışmada ise hastalarda yüksek Kyn/Trp oranı olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir [317]. Engin ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, kolorektal kanser hastalarında azalmış triptofan seviyelerini ve artmış kinürenin yolağı metabolitleri tespit edilmiş, artmış Kyn/Trp oranının sonucunda IDO1 aktivitesinde artış olduğu tespit edilmiştir [319].

IDO ve TDO aktiviteleri, oranın her iki bileşenini de etkileyerek plazma Kyn/Trp oranını belirleyebildiği ve ayrıca potansiyel bir üçüncü grup olan kinürenin yolağı enzimleri (KMO, KYNU ve KAT) ise KYN seviyelerini doğrudan etkileyebildikleri gösterilmiştir. Ayrıca, KMO, KYNU ve KAT'in ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları ile dolaşımda ve dokuda KYN'de bir azalmaya yol açabilmekle birlikte Kyn / Trp oranını düşürebildiği ispatlanmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler bu açıdan literature göre desteklenmektedir [320].

Bu metabolik yolak ile ilgili olan immünoterapi çalışmalarındaki deneysel parametre ölçümleri, TRP durumunun daha iyi anlaşılmasını ve Kyn/Trp oranının tanısal değerini güçlendirmesine katkı sağlama potansiyeli mevcuttur. KYNA düzeylerinin kolorektal kanserli hastalarda değerlendirildiğinde ise, çalışma grubumuzda hasta ve kontrol arasında istatistiksel anlamlılığa ulaşılmamasındaki en önemli sebebinin olgu sayısının kısıtlılığı olarak düşünülmüştür.

Çalışmamız sonunda ortaya çıkan verilerimiz doğrultusunda, Foxp3 genetik polimorfizminin etkili bir teşhis faktörü olabilmesi ve hastalığın patolojik verileriyle korelasyon göstermesi durumunda bir biyo-belirteç olarak kullanmak için kolorektal kanser ve / veya diğer kanser türleri üzerinde planlanacak geniş çaplı klinik çalışmalarla Foxp3'ün karmaşık moleküler mekanizmasını aydınlatmak gerekmektedir. Bu çalışma bağlamında triptofan metabolizmasına ait elde edilmiş olan bilimsel veriler KKK hastalarında TRP, KYN ve KYNA metabolitlerinin dahil edilebileceği hastalık risk ve progresyonunda önerilecek önemli biyobelirteçlerden biri olup olmayacağı konusuna ışık tutarak, triptofan metabolizması ile ilgili kanser mekanizmaları araştıran literatürlere çalışmamızın temel oluşturabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683-691. doi:10.1136/gutjnl-2015-310912
2. American Cancer Society. *Colorectal Cancer Facts and Figures 2017-2019*.; 2017. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9
3. Brenk M, Scheler M, Koch S, et al. Tryptophan Deprivation Induces Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4 on Dendritic Cells Favoring the Induction of Human CD4 + CD25 + Foxp3 + T Regulatory Cells . *J Immunol*. 2009;183(1):145-154. doi:10.4049/jimmunol.0803277
4. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* (80-). 1998;281(5380):1191-1193. doi:10.1126/science.281.5380.1191
5. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999;189(9):1363-1372. doi:10.1084/jem.189.9.1363
6. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):836-848. doi:10.1038/nri1961
7. Huang A, Fuchs D, Widner B, Glover C, Henderson DC, Allen-Mersh TG. Serum tryptophan decrease correlates with immune activation and impaired quality of life in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2002;86(11):1691-1696. doi:10.1038/sj.bjc.6600336
8. Centelles JJ. General Aspects of Colorectal Cancer. *ISRN Oncol*. 2012;2012:1-19. doi:10.5402/2012/139268
9. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2010;53(7):1099. doi:10.1007/DCR.0b013e3181d60a51

10. Colorectal Cancer: Statistics | Cancer.Net. <https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/statistics>. Accessed November 28, 2019.
11. Watanabe T, Muro K, Ajioka Y, et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2016 for the treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2018;23(1):1-34. doi:10.1007/s10147-017-1101-6
12. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Yoldi MJR. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1). doi:10.3390/ijms18010197
13. Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. In: *Gastroenterology*. ; 1999. doi:10.1016/S0016-5085(99)70510-X
14. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(9):1423-1431. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x
15. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008;37(1):1-24, v. doi:10.1016/j.gtc.2007.12.002
16. Power DG, Glogowski E, Lipkin SM. Clinical genetics of hereditary colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(5):837-859. doi:10.1016/j.hoc.2010.06.006
17. Ferrari P, Jenab M, Norat T, et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2007. doi:10.1002/ijc.22966
18. Boyle P (Peter), Levin B, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. *World Cancer Report 2008*. International Agency for Research on Cancer; 2008.
19. Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, et al. Cancer is a preventable disease

- that requires major lifestyle changes. *Pharm Res.* 2008;25(9):2097-2116. doi:10.1007/s11095-008-9661-9
20. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009;22(4):191-197. doi:10.1055/s-0029-1242458
 21. Amersi F, Agustin M, Ko CY. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and health services. *Clin Colon Rectal Surg.* 2005;18(3):133-140. doi:10.1055/s-2005-916274
 22. Burt, M.D RW, DiSario, M.D JA, Cannon-Albright, Ph.D L. GENETICS OF COLON CANCER: Impact of Inheritance on Colon Cancer Risk. *Annu Rev Med.* 1995. doi:10.1146/annurev.med.46.1.371
 23. Butler LM, Sinha R, Millikan RC, et al. Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study. *Am J Epidemiol.* 2003;157(5):434-445. doi:10.1093/aje/kwf221
 24. Kampman E, Slattery ML, Bigler J, et al. Meat consumption, genetic susceptibility, and colon cancer risk: a United States multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(1):15-24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9950235>. Accessed October 19, 2019.
 25. Baron JA, Beach M, Mandel JS, et al. *Calcium Supplements for the Prevention of Colorectal Adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group.* Vol 340.; 1999. doi:10.1056/NEJM199901143400204
 26. Norat T, Bingham S, Ferrari P, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: The European prospective investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(12):906-916. doi:10.1093/jnci/dji164
 27. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, et al. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA.* 2005;293(2):172-182. doi:10.1001/jama.293.2.172
 28. Kakiuchi H, Watanabe M, Ushijima T, et al. Specific 5'-GGGA-3' → 5'-GGA-3' mutation of the Apc gene in rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-

- phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(3):910-914. doi:10.1073/pnas.92.3.910
29. Stürmer T, Glynn RJ, Lee IM, Christen WG, Hennekens CH. Lifetime cigarette smoking and colorectal cancer incidence in the Physicians' Health Study I. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(14):1178-1181. doi:10.1093/jnci/92.14.1178
 30. Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR. Cigarette smoking and colorectal carcinoma mortality in a cohort with long-term follow-up. *Cancer*. 2004;100(2):288-293. doi:10.1002/cncr.11923
 31. Zisman AL, Nickolov A, Brand RE, Gorchow A, Roy HK. Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Arch Intern Med*. 2006;166(6):629-634. doi:10.1001/archinte.166.6.629
 32. Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(7):725-731.
 33. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*. 2008;134(2):388-395. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.007
 34. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, et al. Alcohol Intake and Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 8 Cohort Studies. *Ann Intern Med*. 2004;140(8). doi:10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00007
 35. Hu FB, Manson JAE, Liu S, et al. Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(6):542-547. doi:10.1093/jnci/91.6.542
 36. Wiseman M. Nutrition Society and BAPEN Medical Symposium on ' Nutrition support in cancer therapy ' The Second World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research Expert Report . Food , Nutrition , Physical Activity , and the Prevention of Cancer : A. *Proc Nutr Soc*. 2008;67(3):253-256.

doi:10.1017/S002966510800712X

37. Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. Colon Cancer: A Review of the Epidemiology. *Epidemiol Rev.* 1993;15(2):499-545. doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a036132
38. Potter JD. Colorectal cancer: Molecules and populations. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(11):916-932. doi:10.1093/jnci/91.11.916
39. Arnold M, Pandeya N, Byrnes G, et al. Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: A population-based study. *Lancet Oncol.* 2015;16(1):36-46. doi:10.1016/S1470-2045(14)71123-4
40. Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res.* 2008;28(6 A):3815-3826.
41. Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers complicating inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2015;372(15):1441-1452. doi:10.1056/NEJMra1403718
42. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut.* 2001;48(4):526-535. doi:10.1136/gut.48.4.526
43. Rozen P, Fireman Z, Figer A, Legum C, Ron E, Lynch HT. Family history of colorectal cancer as a marker of potential malignancy within a screening program. *Cancer.* 1987. doi:10.1002/1097-0142(19870715)60:2<248::AID-CNCR2820600223>3.0.CO;2-G
44. Søndergaard JO, Bülow S, Lynge E. Cancer incidence among parents of patients with colorectal cancer. *Int J cancer.* 1991;47(2):202-206. doi:10.1002/ijc.2910470207
45. Winawer SJ. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. Colorectal cancer screening. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007;21(6):1031-1048. doi:10.1016/j.bpg.2007.09.004
46. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, et al. Mutation of a mutL homolog in

- hereditary colon cancer. *Science*. 1994;263(5153):1625-1629. doi:10.1126/science.8128251
47. Desai TK, Barkel D. Syndromic colon cancer: lynch syndrome and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008;37(1):47-72, vi. doi:10.1016/j.gtc.2007.12.006
48. Nyström-Lahti M, Parsons R, Sistonen P, et al. Mismatch repair genes on chromosomes 2p and 3p account for a major share of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families evaluable by linkage. *Am J Hum Genet*. 1994;55(4):659-665. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7942843>. Accessed October 19, 2019.
49. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*. 1993;71(3):677-685. doi:10.1002/1097-0142(19930201)71:3<677::AID-CNCR2820710305>3.0.CO;2-#
50. Groen EJ, Roos A, Muntinghe FL, et al. Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(9):2439-2450. doi:10.1245/s10434-008-9981-3
51. Grady WM, Markowitz SD. Hereditary colon cancer genes. *Methods Mol Biol*. 2003;222:59-83. doi:10.1385/1-59259-328-3:059
52. Lee Y, Kim H, Kim W, Yoon J-H, Jeong SH, Jung Y. Colon-specific delivery of celecoxib is a potential strategy to improve toxicological and pharmacological properties of the selective Cox-2 inhibitor: implication in treatment of familiar adenomatous polyposis. *J Drug Target*. 2012;20(6):524-534. doi:10.3109/1061186X.2012.693498
53. de Tomás J, Al Lal Y, Pérez Díaz MD, Sanz M. [Chronic polyps in the stomach and jejunum in a patient with familial adenomatous polyposis]. *Gastroenterol Hepatol*. 2011;34(10):683-685. doi:10.1016/j.gastrohep.2011.06.006
54. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, et al. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(7):525-533. doi:10.1093/jnci/93.7.525

55. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med*. 1999;340(3):169-176. doi:10.1056/NEJM199901213400301
56. Schatzkin A, Lanza E, Corle D, et al. Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N Engl J Med*. 2000;342(16):1149-1155.
57. Bazensky I, Shoobridge-Moran C, Yoder LH. Colorectal cancer: an overview of the epidemiology, risk factors, symptoms, and screening guidelines. *Medsurg Nurs*. 2007;16(1):46-51; quiz 52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17441631>. Accessed October 19, 2019.
58. de Jong AE, Morreau H, Nagengast FM, et al. Prevalence of adenomas among young individuals at average risk for colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(1):139-143. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.41000.x
59. Peleg II, Maibach HT, Brown SH, Wilcox CM. Aspirin and Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use and the Risk of Subsequent Colorectal Cancer. *Arch Intern Med*. 1994;154(4):394-400. doi:10.1001/archinte.1994.00420040050009
60. Logan RF, Little J, Hawtin PG, Hardcastle JD. Effect of aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs on colorectal adenomas: case-control study of subjects participating in the Nottingham faecal occult blood screening programme. *BMJ*. 1993;307(6899):285-289. doi:10.1136/bmj.307.6899.285
61. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med*. 1994;121(4):241-246. doi:10.7326/0003-4819-121-4-199408150-00001
62. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/0001669840>. Accessed October 19, 2019.
63. Boyle P, Leon ME. Epidemiology of colorectal cancer. *Br Med Bull*. 2002;64:1-25. doi:10.1093/bmb/64.1.1

64. Cancer statistics, 2012. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237781>. Accessed October 19, 2019.
65. Neugut AI, Jacobson JS, Suh S, Mukherjee R, Arber N. The epidemiology of cancer of the small bowel. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7(3):243-251.
66. Cancer statistics of SSK Okmeydanı Training and Research Hospitals Department of Oncology from 1999 to 2004 | Request PDF. https://www.researchgate.net/publication/42437299_Cancer_statistics_of_SSK_Okmevdani_Training_and_Research_Hospitals_Department_of_Oncology_from_1999_to_2004. Accessed October 19, 2019.
67. Speights VO, Johnson MW, Stoltenberg PH, Rappaport ES, Helbert B, Riggs M. Colorectal cancer: Current trends in initial clinical manifestations. *South Med J.* 1991;84(5):575-578.
68. Rex DK, Rahmani EY, Haseman JH, Lemmel GT, Kaster S, Buckley JS. Relative sensitivity of colonoscopy and barium enema for detection of colorectal cancer in clinical practice. *Gastroenterology.* 1997;112(1):17-23. doi:10.1016/S0016-5085(97)70213-0
69. Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology.* 1997;112(2):594-642. doi:10.1053/gast.1997.v112.agast970594
70. Müge Soytürk. *Kolorektal Kanser Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri.*
71. Ohtani H. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human colorectal cancer. *Cancer Immun.* 2007;7:4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311363>. Accessed October 19, 2019.
72. Weng D, Song B, Durfee J, et al. Induction of cytotoxic T lymphocytes against ovarian cancer-initiating cells. *Int J cancer.* 2011;129(8):1990-2001. doi:10.1002/ijc.25851
73. Takahara A, Koido S, Ito M, et al. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1

- expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(9):1289-1297. doi:10.1007/s00262-011-1033-3
74. Weng D, Song B, Koido S, Calderwood SK, Gong J. Immunotherapy of radioresistant mammary tumors with early metastasis using molecular chaperone vaccines combined with ionizing radiation. *J Immunol.* 2013;191(2):755-763. doi:10.4049/jimmunol.1203286
75. Grande C, Firvida JL, Navas V, Casal J. Interleukin-2 for the treatment of solid tumors other than melanoma and renal cell carcinoma. *Anticancer Drugs.* 2006;17(1):1-12. doi:10.1097/01.cad.0000182748.47353.51
76. Noguchi T, Ritter G, Nishikawa H. Antibody-based therapy in colorectal cancer. *Immunotherapy.* 2013;5(5):533-545. doi:10.2217/imt.13.35
77. Scott N, Quirke P. Molecular biology of colorectal neoplasia. *Gut.* 1993;34(3):289-292. doi:10.1136/gut.34.3.289
78. Meltzer SJ, Ahnen DJ, Battifora H, Yokota J, Cline MJ. Protooncogene abnormalities in colon cancers and adenomatous polyps. *Gastroenterology.* 1987;92(5 Pt 1):1174-1180. doi:10.1016/s0016-5085(87)91074-2
79. Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature.* 327(6120):298-303. doi:10.1038/327298a0
80. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319(9):525-532. doi:10.1056/NEJM198809013190901
81. Losi L, Benhattar J, Costa J. Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1992;28A(6-7):1115-1120. doi:10.1016/0959-8049(92)90468-h
82. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, et al. Association of the APC gene product with β -catenin. *Science (80-).* 1993;262(5140):1731-1734. doi:10.1126/science.8259518

83. Jen J, Kim H, Piantadosi S, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1994;331(4):213-221. doi:10.1056/NEJM199407283310401
84. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2059-2072. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.065
85. Boland C.R. Microsatellite instability in colorectal cancer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5938532/>. Accessed October 19, 2019.
86. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(4):261-268. doi:10.1093/jnci/djh034
87. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(12):686-700. doi:10.1038/nrgastro.2011.173
88. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006;38(7):787-793. doi:10.1038/ng1834
89. Inamura K. Colorectal cancers: An update on their molecular pathology. *Cancers (Basel).* 2018;10(1). doi:10.3390/cancers10010026
90. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330-337. doi:10.1038/nature11252
91. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol.* 3, 433–438 (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol.* 2001;3(4):433-438. doi:10.1038/35070129
92. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology.*

2015;148(1):88-99. doi:10.1053/j.gastro.2014.09.041

93. Baba Y, Huttenhower C, Nosho K, et al. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. *Mol Cancer*. 2010;9:125. doi:10.1186/1476-4598-9-125
94. Inamura K, Yamauchi M, Nishihara R, et al. Tumor LINE-1 methylation level and microsatellite instability in relation to colorectal cancer prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(9). doi:10.1093/jnci/dju195
95. Scott EC, Gardner EJ, Masood A, Chuang NT, Vertino PM, Devine SE. A hot L1 retrotransposon evades somatic repression and initiates human colorectal cancer. *Genome Res*. 2016;26(6):745-755. doi:10.1101/gr.201814.115
96. Nagai Y, Sunami E, Yamamoto Y, et al. LINE-1 hypomethylation status of circulating cell-free DNA in plasma as a biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(7):11906-11916. doi:10.18632/oncotarget.14439
97. Lee D-W, Han S-W, Cha Y, et al. Association between mutations of critical pathway genes and survival outcomes according to the tumor location in colorectal cancer. *Cancer*. 2017;123(18):3513-3523. doi:10.1002/cncr.30760
98. Inamura K, Yamauchi M, Nishihara R, et al. Prognostic significance and molecular features of signet-ring cell and mucinous components in colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(4):1226-1235. doi:10.1245/s10434-014-4159-7
99. Jones RP, Sutton PA, Evans JP, et al. Specific mutations in KRAS codon 12 are associated with worse overall survival in patients with advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2017;116(7):923-929. doi:10.1038/bjc.2017.37
100. Takane K, Akagi K, Fukuyo M, Yagi K, Takayama T, Kaneda A. DNA methylation epigenotype and clinical features of NRAS-mutation(+) colorectal cancer. *Cancer Med*. 2017;6(5):1023-1035. doi:10.1002/cam4.1061
101. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium

- analysis. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):753-762. doi:10.1016/S1470-2045(10)70130-3
102. Mouradov D, Domingo E, Gibbs P, et al. Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(11):1785-1793. doi:10.1038/ajg.2013.292
103. Passiglia F, Bronte G, Bazan V, Galvano A, Vincenzi B, Russo A. Can KRAS and BRAF mutations limit the benefit of liver resection in metastatic colorectal cancer patients? A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;99:150-157. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.12.015
104. Sinicrope FA, Mahoney MR, Yoon HH, et al. Analysis of Molecular Markers by Anatomic Tumor Site in Stage III Colon Carcinomas from Adjuvant Chemotherapy Trial NCCTG N0147 (Alliance). *Clin Cancer Res.* 2015;21(23):5294-5304. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0527
105. van Brummelen EMJ, de Boer A, Beijnen JH, Schellens JHM. BRAF Mutations as Predictive Biomarker for Response to Anti-EGFR Monoclonal Antibodies. *Oncologist.* 2017;22(7):864-872. doi:10.1634/theoncologist.2017-0031
106. Xu J-M, Wang Y, Wang Y-L, et al. PIK3CA Mutations Contribute to Acquired Cetuximab Resistance in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(16):4602-4616. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2738
107. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522398>. Accessed October 21, 2019.
108. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. *JAMA.* 2009;302(6):649-658. doi:10.1001/jama.2009.1112
109. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med.* 2012;367(17):1596-1606. doi:10.1056/NEJMoa1207756
110. Gray RT, Cantwell MM, Coleman HG, et al. Evaluation of PTGS2 Expression,

- PIK3CA Mutation, Aspirin Use and Colon Cancer Survival in a Population-Based Cohort Study. *Clin Transl Gastroenterol.* 2017;8(4):e91. doi:10.1038/ctg.2017.18
111. Hua X, Phipps AI, Burnett-Hartman AN, et al. Timing of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Use Among Patients With Colorectal Cancer in Relation to Tumor Markers and Survival. *J Clin Oncol.* 2017;35(24):2806-2813. doi:10.1200/JCO.2017.72.3569
112. Nan H, Hutter CM, Lin Y, et al. Association of aspirin and NSAID use with risk of colorectal cancer according to genetic variants. *JAMA.* 2015;313(11):1133-1142. doi:10.1001/jama.2015.1815
113. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2059-2072. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.065
114. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998;396(6712):643-649. doi:10.1038/25292
115. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* 2015;5(1):43-51. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0863
116. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med.* 2015;21(8):938-945. doi:10.1038/nm.3909
117. Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA, et al. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma. *Cell Rep.* 2016;15(4):857-865. doi:10.1016/j.celrep.2016.03.075
118. Di Caro G, Marchesi F, Laghi L, Grizzi F. Immune cells: plastic players along colorectal cancer progression. *J Cell Mol Med.* 2013;17(9):1088-1095. doi:10.1111/jcmm.12117
119. Tran E, Robbins PF, Lu Y-C, et al. T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(23):2255-2262.

doi:10.1056/NEJMoa1609279

120. Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* (80-). 2017;357(6349):409-413. doi:10.1126/science.aan6733
121. Kather JN, Poleszczuk J, Suarez-Carmona M, et al. In Silico Modeling of Immunotherapy and Stroma-Targeting Therapies in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 2017;77(22):6442-6452. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2006
122. Nebot-Bral L, Brandao D, Verlingue L, et al. Hypermutated tumours in the era of immunotherapy: The paradigm of personalised medicine. *Eur J Cancer.* 2017;84:290-303. doi:10.1016/j.ejca.2017.07.026
123. Roelands J, Kuppen PJK, Vermeulen L, et al. Immunogenomic classification of colorectal cancer and therapeutic implications. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10). doi:10.3390/ijms18102229
124. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(17):1627-1639. doi:10.1056/NEJMoa1507643
125. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25891174>. Accessed October 21, 2019.
126. Masugi Y, Nishihara R, Yang J, et al. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cells in colorectal cancer. *Gut.* 2017;66(8):1463-1473. doi:10.1136/gutjnl-2016-311421
127. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science.* 2012;338(6103):120-123. doi:10.1126/science.1224820
128. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science.* 2015;348(6230):80-86. doi:10.1126/science.aaa4972
129. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer.*

2013;13(11):800-812. doi:10.1038/nrc3610

130. Lucas C, Barnich N, Nguyen HTT. 1. Lucas C, Barnich N, Nguyen HTT. Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Jun 20 [cited 2018 May 31];18(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28632155>Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6). doi:10.3390/ijms18061310
131. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res*. 2012;22(2):292-298. doi:10.1101/gr.126573.111
132. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009989>. Accessed October 21, 2019.
133. Yang Y, Weng W, Peng J, et al. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- κ B, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology*. 2017;152(4):851-866.e24. doi:10.1053/j.gastro.2016.11.018
134. Alwers E, Jia M, Kloor M, Bläker H, Brenner H, Hoffmeister M. Associations Between Molecular Classifications of Colorectal Cancer and Patient Survival: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(3):402-410.e2. doi:10.1016/j.cgh.2017.12.038
135. Linsalata M, Russo F. Nutritional factors and polyamine metabolism in colorectal cancer. *Nutrition*. 2008;24(4):382-389. doi:10.1016/j.nut.2007.12.014
136. Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biol Ther*. 2006;5(10):1265-1269. doi:10.4161/cbt.5.10.3296
137. Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr*. 2002;88(S1):s39-s49. doi:10.1079/bjn2002628

138. Ishikawa H, Akedo I, Otani T, et al. Randomized trial of dietary fiber and Lactobacillus casei administration for prevention of colorectal tumors. *Int J cancer*. 2005;116(5):762-767. doi:10.1002/ijc.21115
139. Martin KR. Targeting apoptosis with dietary bioactive agents. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231(2):117-129. doi:10.1177/153537020623100201
140. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
141. Heiden MG Vander, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science (80-)*. 2009;324(5930):1029-1033. doi:10.1126/science.1160809
142. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*. 2008;13(6):472-482. doi:10.1016/j.ccr.2008.05.005
143. Reeves R, Beckerbauer L. HMGI/Y proteins: Flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr*. 2001;1519(1-2):13-29. doi:10.1016/S0167-4781(01)00215-9
144. Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(12):899-910. doi:10.1038/nrc2271
145. Resar LMS. The high mobility group A1 gene: transforming inflammatory signals into cancer? *Cancer Res*. 2010;70(2):436-439. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1212
146. Grade M, Hörmann P, Becker S, et al. Gene expression profiling reveals a massive, aneuploidy-dependent transcriptional deregulation and distinct differences between lymph node-negative and lymph node-positive colon carcinomas. *Cancer Res*. 2007;67(1):41-56. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1514
147. Belton A, Gabrovsky A, Bae YK, et al. HMGA1 induces intestinal polyposis in transgenic mice and drives tumor progression and stem cell properties in colon cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(1). doi:10.1371/journal.pone.0030034

148. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol.* 1927;8(6):519-530. doi:10.1085/jgp.8.6.519
149. Keibler MA, Wasylenko TM, Kelleher JK, Iliopoulos O, Vander Heiden MG, Stephanopoulos G. Metabolic requirements for cancer cell proliferation. *Cancer Metab.* 2016;4(1). doi:10.1186/s40170-016-0156-6
150. Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family-Structure and functional characterization. *IUBMB Life.* 2012;64(1):1-9. doi:10.1002/iub.573
151. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4(11):891-899. doi:10.1038/nrc1478
152. High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence, and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers | Cancer Research. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/60/4/916.short>. Accessed October 23, 2019.
153. Chae YK, Kang WY, Kim SH, Joo JE, Han JK, Hong BW. Combining information of common metabolites reveals global differences between colorectal cancerous and normal tissues. *Bull Korean Chem Soc.* 2010;31(2):379-383. doi:10.5012/bkcs.2010.31.02.379
154. Piotto M, Moussallieh FM, Dillmann B, et al. Metabolic characterization of primary human colorectal cancers using high resolution magic angle spinning 1H magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics.* 2009;5(3):292-301. doi:10.1007/s11306-008-0151-1
155. Williams MD, Reeves R, Resar LS, Hill HH. Metabolomics of colorectal cancer: Past and current analytical platforms. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(15):5013-5030. doi:10.1007/s00216-013-6777-5
156. Williams MD, Zhang X, Belton AS, et al. HMGA1 drives metabolic reprogramming of intestinal epithelium during hyperproliferation, polyposis, and colorectal carcinogenesis. *J Proteome Res.* 2015;14(3):1420-1431. doi:10.1021/pr501084s

157. Bardot V, Dutrillaux AM, Delattre JY, et al. Purine and pyrimidine metabolism in human gliomas: relation to chromosomal aberrations. *Br J Cancer*. 1994;70(2):212-218. doi:10.1038/bjc.1994.282
158. Durak I, Cetin R, Canbolat O, Cetin D, Yurtarslani Z, Unal A. Adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase and cytidine deaminase activities in gastric tissues from patients with gastric cancer. *Cancer Lett*. 1994;84(2):199-202. doi:10.1016/0304-3835(94)90376-x
159. Canbolat O, Durak I, Cetin R, Kavutcu M, Demirci S, Oztürk S. Activities of adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase, and cytidine deaminase enzymes in cancerous and non-cancerous human breast tissues. *Breast Cancer Res Treat*. 1996;37(2):189-193. doi:10.1007/bf01806500
160. Stevens AP, Spangler B, Wallner S, et al. Direct and tumor microenvironment mediated influences of 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine on tumor progression of malignant melanoma. *J Cell Biochem*. 2009;106(2):210-219. doi:10.1002/jcb.21984
161. Hellerbrand C, Mühlbauer M, Wallner S, et al. Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2006;27(1):64-72. doi:10.1093/carcin/bgi201
162. Brihimi-Horn MC, Pouyssegur J. HIF at a glance. *J Cell Sci*. 2009;122(8):1055-1057. doi:10.1242/jcs.035022
163. Kaidi A, Qualtrough D, Williams AC, Paraskeva C. Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia. *Cancer Res*. 2006;66(13):6683-6691. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0425
164. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: New forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J*. 2004;18(7):790-804. doi:10.1096/fj.03-0645rev

165. Denkert C, Weichert W, Winzer K-J, et al. Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5580-5586. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0070
166. Denkert C, Winzer K-J, Hauptmann S. Prognostic impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2004;4(6):428-433. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023244>. Accessed October 24, 2019.
167. Aledo JC, Segura JA, Medina MA, Alonso FJ, Núñez de Castro I, Márquez J. Phosphate-activated glutaminase expression during tumor development. *FEBS Lett.* 1994;341(1):39-42. doi:10.1016/0014-5793(94)80236-x
168. Mazurek S, Eigenbrodt E. The tumor metabolome. *Anticancer Res.* 23(2A):1149-1154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820363>. Accessed October 24, 2019.
169. Dröge W, Eck HP, Betzler M, Näher H. Elevated plasma glutamate levels in colorectal carcinoma patients and in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Immunobiology.* 1987;174(4-5):473-479. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3679279>. Accessed October 24, 2019.
170. Qiu Y, Cai G, Su M, et al. Urinary metabolomic study on colorectal cancer. *J Proteome Res.* 2010;9(3):1627-1634. doi:10.1021/pr901081y
171. Ludwig C, Ward DG, Martin A, et al. Fast targeted multidimensional NMR metabolomics of colorectal cancer. *Magn Reson Chem.* 2009;47(SUPPL. 1). doi:10.1002/mrc.2519
172. Li S, Zhao X, Wu Z, et al. Polymorphisms in arachidonic acid metabolism-related genes and the risk and prognosis of colorectal cancer. *Fam Cancer.* 2013;12(4):755-765. doi:10.1007/s10689-013-9659-2
173. Nishiumi S, Kobayashi T, Ikeda A, et al. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach for colorectal cancer. *PLoS One.* 2012;7(7). doi:10.1371/journal.pone.0040459

174. Williams MD, Zhang X, Park JJ, et al. Characterizing metabolic changes in human colorectal cancer. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(16):4581-4595. doi:10.1007/s00216-015-8662-x
175. Duthie SJ. Folate and cancer: How DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):101-109. doi:10.1007/s10545-010-9128-0
176. Jerby L, Wolf L, Denkert C, et al. Metabolic associations of reduced proliferation and oxidative stress in advanced breast cancer. *Cancer Res.* 2012;72(22):5712-5720. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2215
177. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM. L-tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *Int J Tryptophan Res.* 2009;2(1):45-60. doi:10.4137/ijtr.s2129
178. Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine pathway metabolites in humans: Disease and healthy states. *Int J Tryptophan Res.* 2009;2(1):1-19. doi:10.4137/ijtr.s2097
179. Botting NP. Chemistry and neurochemistry of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism. *Chem Soc Rev.* 1995;24(6):401-412. doi:10.1039/cs9952400401
180. Takikawa O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase- initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(1):12-19. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.032
181. Qin Y, Wang N, Zhang X, Han X, Zhai X, Lu Y. IDO and TDO as a potential therapeutic target in different types of depression. *Metab Brain Dis.* 2018;33(6):1787-1800. doi:10.1007/s11011-018-0290-7
182. Myint A-M, Kim YK, Verkerk R, Scharpé S, Steinbusch H, Leonard B. Kynurenine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection. *J Affect Disord.* 2007;98(1-2):143-151. doi:10.1016/j.jad.2006.07.013
183. Terentis AC, Thomas SR, Takikawa O, et al. The heme environment of

- recombinant human indoleamine 2,3-dioxygenase. Structural properties and substrate-ligand interactions. *J Biol Chem.* 2002;277(18):15788-15794. doi:10.1074/jbc.M200457200
184. Sandyk R. L-tryptophan in neuropsychiatry disorders: A review. *Int J Neurosci.* 1992;67(1-4):127-144. doi:10.3109/00207459208994781
185. Melatonin and its influence on immune system. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18212405>. Accessed October 25, 2019.
186. Davies, Christmas D, Potokar J. A biological pathway linking inflammation and depression: activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropsychiatr Dis Treat.* July 2011;431. doi:10.2147/ndt.s17573
187. Kurz K, Schroecksnadel S, Weiss G, Fuchs D. Association between increased tryptophan degradation and depression in cancer patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14(1):49-56. doi:10.1097/MCO.0b013e328340d849
188. Carpenedo R, Chiarugi A, Russi P, et al. Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anticonvulsant activities. *Neuroscience.* 1994;61(2):237-243. doi:10.1016/0306-4522(94)90227-5
189. Santhanam S, Alvarado DM, Ciorba MA. Therapeutic targeting of inflammation and tryptophan metabolism in colon and gastrointestinal cancer. *Transl Res.* 2016;167(1):67-79. doi:10.1016/j.trsl.2015.07.003
190. Löb S, Königsrainer A, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: Can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer.* 2009;9(6):445-452. doi:10.1038/nrc2639
191. Platten M, von Knebel Doeberitz N, Oezen I, Wick W, Ochs K. Cancer immunotherapy by targeting IDO1/TDO and their downstream effectors. *Front Immunol.* 2015;6(JAN). doi:10.3389/fimmu.2014.00673
192. Peters JC. Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol 294. ; 1991:345-358. doi:10.1007/978-1-

4684-5952-4_32

193. Austin CJD, Rendina LM. Targeting key dioxygenases in tryptophan-kynurenine metabolism for immunomodulation and cancer chemotherapy. *Drug Discov Today*. 2015;20(5):609-617. doi:10.1016/j.drudis.2014.11.007
194. Opitz CA, Litztenburger UM, Sahm F, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011;478(7368):197-203. doi:10.1038/nature10491
195. Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V, et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(7):2497-2502. doi:10.1073/pnas.1113873109
196. Platten M, Wick W, Van Den Eynde BJ. Tryptophan catabolism in cancer: Beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res*. 2012;72(21):5435-5440. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0569
197. Liu X, Shin N, Koblish HK, et al. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood*. 2010;115(17):3520-3530. doi:10.1182/blood-2009-09-246124
198. Ferdinande L, Decaestecker C, Verset L, et al. Clinicopathological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(1):141-147. doi:10.1038/bjc.2011.513
199. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res*. 2006;12(4):1144-1151. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1966
200. Gao YF, Peng RQ, Li J, et al. The paradoxical patterns of expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in colon cancer. *J Transl Med*. 2009;7. doi:10.1186/1479-5876-7-71
201. Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-

22. *Immunity*. 2013;39(2):372-385. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.003
202. Jobin G, Rodriguez-Suarez R, Betito K. Association Between Natural Killer Cell Activity and Colorectal Cancer in High-Risk Subjects Undergoing Colonoscopy. *Gastroenterology*. 2017;153(4):980-987. doi:10.1053/j.gastro.2017.06.009
203. Trotta AM, Ottaiano A, Romano C, et al. Prospective Evaluation of Cetuximab-Mediated Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity in Metastatic Colorectal Cancer Patients Predicts Treatment Efficacy. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(4):366-374. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0184
204. Ottaiano A, Napolitano M, Capozzi M, Tafuto S, Avallone A, Scala S. Natural killer cells activity in a metastatic colorectal cancer patient with complete and long lasting response to therapy. *World J Clin Cases*. 2017;5(11):390. doi:10.12998/wjcc.v5.i11.390
205. Legitimo A, Consolini R, Failli A, Orsini G, Spisni R. Dendritic cell defects in the colorectal cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(11):3224-3235. doi:10.4161/hv.29857
206. Kajihara M, Takakura K, Kanai T, et al. Dendritic cell-based cancer immunotherapy for colorectal Cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(17):4275-4286. doi:10.3748/wjg.v22.i17.4275
207. Dierssen JWF, de Miranda NFCC, Ferrone S, et al. HNPCC versus sporadic microsatellite-unstable colon cancers follow different routes toward loss of HLA class I expression. *BMC Cancer*. 2007;7. doi:10.1186/1471-2407-7-33
208. Sillo TO, Beggs AD, Morton DG, Middleton G. Mechanisms of immunogenicity in colorectal cancer. *Br J Surg*. 2019:1283-1297. doi:10.1002/bjs.11204
209. Bacac M, Klein C, Umana P. CEA TCB: A novel head-to-tail 2:1 T cell bispecific antibody for treatment of CEA-positive solid tumors. *Oncoimmunology*. 2016;5(8). doi:10.1080/2162402X.2016.1203498
210. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010;236(1):219-242. doi:10.1111/j.1600-

065X.2010.00923.x

211. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med*. 2010;207(10):2187-2194. doi:10.1084/jem.20100643
212. Dempke WCM, Fenchel K, Uciechowski P, Dale SP. Second- and third-generation drugs for immuno-oncology treatment—The more the better? *Eur J Cancer*. 2017;74:55-72. doi:10.1016/j.ejca.2017.01.001
213. Kosmaczewska A, Ciszak L, Potoczek S, Frydecka I. The significance of Treg cells in defective tumor immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008;56(3):181-191. doi:10.1007/s00005-008-0018-1
214. Oldenhove G, De Heusch M, Urbain-Vansanten G, et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2003;198(2):259-266. doi:10.1084/jem.20030654
215. Cui G, Florholmen J. Polarization of cytokine profile from Th1 into Th2 along colorectal adenoma-carcinoma sequence: Implications for the biotherapeutic target? *Inflamm Allergy - Drug Targets*. 2008;7(2):94-97. doi:10.2174/187152808785107589
216. Bueter M, Gasser M, Schramm N, et al. T-cell response to p53 tumor-associated antigen in patients with colorectal carcinoma. *Int J Oncol*. 2006;28(2):431-438. doi:10.3892/ijo.28.2.431
217. Golgher D, Jones E, Powrie F, Elliott T, Gallimore A. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol*. 2002;32(11):3267-3275. doi:10.1002/1521-4141(200211)32:11<3267::AID-IMMU3267>3.0.CO;2-1
218. Sakaguchi S. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000;101(5):455-458. doi:10.1016/S0092-8674(00)80856-9
219. Mills KHG. Regulatory T cells: Friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev*

- Immunol.* 2004;4(11):841-855. doi:10.1038/nri1485
220. Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med.* 2004;10(1):29-30. doi:10.1038/nm975
221. Jakowlew SB. Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(3):435-457. doi:10.1007/s10555-006-9006-2
222. Zhang Q, Lou Y, Bai XL, Liang TB. Immunometabolism: A novel perspective of liver cancer microenvironment and its influence on tumor progression. *World J Gastroenterol.* 2018;24(31):3500-3512. doi:10.3748/wjg.v24.i31.3500
223. Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MS. The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci Rep.* 1985;5(5):393-400. doi:10.1007/bf01116556
224. Jacobs SR, Herman CE, MacIver NJ, et al. Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *J Immunol.* 2008;180(7):4476-4486. doi:10.4049/jimmunol.180.7.4476
225. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, et al. The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation. *Immunity.* 2011;35(6):871-882. doi:10.1016/j.immuni.2011.09.021
226. Peng M, Yin N, Chhangawala S, Xu K, Leslie CS, Li MO. Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science.* 2016;354(6311):481-484. doi:10.1126/science.aaf6284
227. Chang C-H, Curtis JD, Maggi LB, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell.* 2013;153(6):1239-1251. doi:10.1016/j.cell.2013.05.016
228. Gubser PM, Bantug GR, Razik L, et al. Rapid effector function of memory CD8⁺ T cells requires an immediate-early glycolytic switch. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1064-1072. doi:10.1038/ni.2687

229. Finlay D, Cantrell DA. Metabolism, migration and memory in cytotoxic T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):109-117. doi:10.1038/nri2888
230. Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, et al. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat Commun*. 2013;4:2834. doi:10.1038/ncomms3834
231. Navarro MN, Cantrell DA. Serine-threonine kinases in TCR signaling. *Nat Immunol*. 2014;15(9):808-814. doi:10.1038/ni.2941
232. Chou C, Pinto AK, Curtis JD, et al. c-Myc-induced transcription factor AP4 is required for host protection mediated by CD8+ T cells. *Nat Immunol*. 2014;15(9):884-893. doi:10.1038/ni.2943
233. Araki K, Ellebedy AH, Ahmed R. TOR in the immune system. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(6):707-715. doi:10.1016/j.ccb.2011.08.006
234. Araki K, Turner AP, Shaffer VO, et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*. 2009;460(7251):108-112. doi:10.1038/nature08155
235. Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*. 2009;460(7251):103-107. doi:10.1038/nature08097
236. Renner K, Geiselhöringer A-L, Fante M, et al. Metabolic plasticity of human T cells: Preserved cytokine production under glucose deprivation or mitochondrial restriction, but 2-deoxy-glucose affects effector functions. *Eur J Immunol*. 2015;45(9):2504-2516. doi:10.1002/eji.201545473
237. Christie DA, Mitsopoulos P, Blagih J, et al. Stomatin-like protein 2 deficiency in T cells is associated with altered mitochondrial respiration and defective CD4+ T cell responses. *J Immunol*. 2012;189(9):4349-4360. doi:10.4049/jimmunol.1103829
238. Dziurla R, Gaber T, Fangradt M, et al. Effects of hypoxia and/or lack of glucose on cellular energy metabolism and cytokine production in stimulated human CD4+ T lymphocytes. *Immunol Lett*. 2010;131(1):97-105. doi:10.1016/j.imlet.2010.02.008
239. Sena LA, Li S, Jairaman A, et al. Mitochondria Are Required for Antigen-Specific

- T Cell Activation through Reactive Oxygen Species Signaling. *Immunity*. 2013;38(2):225-236. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.020
240. Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J Exp Med*. 2002;195(1):59-70. doi:10.1084/jem.20010659
241. Beier UH, Angelin A, Akimova T, et al. Essential role of mitochondrial energy metabolism in Foxp3⁺ T-regulatory cell function and allograft survival. *FASEB J*. 2015;29(6):2315-2326. doi:10.1096/fj.14-268409
242. Lochner M, Berod L, Sparwasser T. Fatty acid metabolism in the regulation of T cell function. *Trends Immunol*. 2015;36(2):81-91. doi:10.1016/j.it.2014.12.005
243. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cells. *J Immunol*. 2011;186(6):3299-3303. doi:10.4049/jimmunol.1003613
244. Basu S, Hubbard B, Shevach EM. Foxp3-mediated inhibition of Akt inhibits Glut1 (glucose transporter 1) expression in human T regulatory cells. *J Leukoc Biol*. 2015;97(2):279-283. doi:10.1189/jlb.2AB0514-273RR
245. Foxp3 and Toll-like receptor signaling balance Treg cell anabolic metabolism for suppression. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27695003>. Accessed October 25, 2019.
246. De Rosa V, Galgani M, Porcellini A, et al. Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. *Nat Immunol*. 2015;16(11):1174-1184. doi:10.1038/ni.3269
247. Buck MD, O'Sullivan D, Klein Geltink RI, et al. Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell*. 2016;166(1):63-76. doi:10.1016/j.cell.2016.05.035

248. Phan AT, Doedens AL, Palazon A, et al. Constitutive Glycolytic Metabolism Supports CD8⁺ T Cell Effector Memory Differentiation during Viral Infection. *Immunity*. 2016;45(5):1024-1037. doi:10.1016/j.immuni.2016.10.017
249. Ardawi MSM, Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochem J*. 1983;212(3):835-842. doi:10.1042/bj2120835
250. Carr EL, Kelman A, Wu GS, et al. Glutamine Uptake and Metabolism Are Coordinately Regulated by ERK/MAPK during T Lymphocyte Activation. *J Immunol*. 2010;185(2):1037-1044. doi:10.4049/jimmunol.0903586
251. Spittler A, Winkler S, Gotzinger P, et al. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes. *Blood*. 1995;86(4):1564-1569.
252. He L, Weber KJ, Schilling JD. Glutamine Modulates Macrophage Lipotoxicity. *Nutrients*. 2016;8(4):215. doi:10.3390/nu8040215
253. Swamy M, Pathak S, Grzes KM, et al. Glucose and glutamine fuel protein O-GlcNAcylation to control T cell self-renewal and malignancy. *Nat Immunol*. 2016;17(6):712-720. doi:10.1038/ni.3439
254. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res*. 2010;70(1):68-77. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2587
255. Van de Velde L-A, Subramanian C, Smith AM, et al. T Cells Encountering Myeloid Cells Programmed for Amino Acid-dependent Immunosuppression Use Rictor/mTORC2 Protein for Proliferative Checkpoint Decisions. *J Biol Chem*. 2017;292(1):15-30. doi:10.1074/jbc.M116.766238
256. Geiger R, Rieckmann JC, Wolf T, et al. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell*. 2016;167(3):829-842.e13. doi:10.1016/j.cell.2016.09.031
257. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. 2003;9(10):1269-1274. doi:10.1038/nm934

258. Bronte V, Kasic T, Gri G, et al. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med*. 2005;201(8):1257-1268. doi:10.1084/jem.20042028
259. Choi B-S, Martinez-Falero IC, Corset C, et al. Differential impact of L-arginine deprivation on the activation and effector functions of T cells and macrophages. *J Leukoc Biol*. 2009;85(2):268-277. doi:10.1189/jlb.0508310
260. Ball K, Bouzom F, Scherrmann JM, Walther B, Declèves X. Comparing translational population-PBPK modelling of brain microdialysis with bottom-up prediction of brain-to-plasma distribution in rat and human. *Biopharm Drug Dispos*. 2014;35(8):485-499. doi:10.1002/bdd.1908
261. Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer*. 2002;101(2):151-155. doi:10.1002/ijc.10645
262. Theate I, Van Baren N, Pilotte L, et al. Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(2):161-172. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0137
263. Litzenburger UM, Opitz CA, Sahm F, et al. Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget*. 2014;5(4):1038-1051. doi:10.18632/oncotarget.1637
264. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *J Immunol*. 2017;198(3):981-985. doi:10.1126/science.1079490
265. Yamagami W, Susumu N, Tanaka H, et al. Immunofluorescence-detected infiltration of CD4+FOXP3+ regulatory T cells is relevant to the prognosis of patients with endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21(9):1628-1634. doi:10.1097/IGC.0b013e31822c271f
266. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2017;198(3):986-992.

doi:10.1038/ni904

267. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol.* 2008;9(3):239-244. doi:10.1038/ni1572
268. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005;22(3):329-341. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.016
269. Min L, Mu X, Tong A, et al. The association between HOTAIR polymorphisms and cancer susceptibility: an updated systemic review and meta-analysis. *Oncotargets Ther.* 2018;11:791-800. doi:10.2147/OTT.S151454
270. Fazelzadeh Haghghi M, Ali Ghayumi M, Behzadnia F, Erfani N. Investigation of FOXP3 genetic variations at positions -2383 C/T and IVS9+459 T/C in southern Iranian patients with lung carcinoma. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(5):465-471. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124932>. Accessed October 25, 2019.
271. You D, Wang Y, Zhang Y, et al. Association of Foxp3 promoter polymorphisms with susceptibility to endometrial cancer in the Chinese Han women. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(18):e0582. doi:10.1097/MD.00000000000010582
272. Zheng J, Deng J, Jiang L, et al. Heterozygous genetic variations of FOXP3 in Xp11.23 elevate breast cancer risk in Chinese population via skewed X-chromosome inactivation. *Hum Mutat.* 2013;34(4):619-628. doi:10.1002/humu.22284
273. Chen L, Yu Q, Liu B, Zhu L. Association of FoxP3 rs3761548 polymorphism with susceptibility to colorectal cancer in the Chinese population. *Med Oncol.* 2014;31(12):1-4. doi:10.1007/s12032-014-0374-0
274. Jiang L-L, Ruan L-W. Association between FOXP3 promoter polymorphisms and cancer risk: A meta-analysis. *Oncol Lett.* 2014;8(6):2795-2799. doi:10.3892/ol.2014.2585
275. Chen Y, Qi X, Bian C, et al. The association of FOXP3 gene polymorphisms with cancer susceptibility: A comprehensive systemic review and meta-analysis. *Biosci*

- Rep.* 2019;39(3):1-11. doi:10.1042/BSR20181809
276. Grimmig T, Kim M, Germer CT, Gasser M, Waaga-Gasser AM. The role of FOXP3 in disease progression in colorectal cancer patients. *Oncoimmunology*. 2013;2(6):2-3. doi:10.4161/onci.24521
277. Kim M, Grimmig T, Grimm M, et al. Expression of Foxp3 in Colorectal Cancer but Not in Treg Cells Correlates with Disease Progression in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2013;8(1). doi:10.1371/journal.pone.0053630
278. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*. 2006;12(18):5423-5434. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0369
279. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg H-H, et al. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res*. 2007;67(17):8344-8350. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3304
280. Löb S, Königsrainer A, Zieker D, et al. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(1):153-157. doi:10.1007/s00262-008-0513-6
281. Immunology IV: Clinical Applications in Health and Disease by Joseph A. Bellanti. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3651157/>. Accessed October 27, 2019.
282. Sommariva M, De Cecco L, Tagliabue E, Balsari A. Modulation of DNA repair genes induced by TLR9 agonists: A strategy to eliminate “altered” cells? *Oncoimmunology*. 2012;1(2):258-259. doi:10.4161/onci.1.2.18343
283. Nugent JL, McCoy AN, Addamo CJ, Jia W, Sandler RS, Keku TO. Altered tissue metabolites correlate with microbial dysbiosis in colorectal adenomas. *J Proteome Res*. 2014;13(4):1921-1929. doi:10.1021/pr4009783
284. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting

- DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215. doi:10.1093/nar/16.3.1215
285. Liu Y, Xia T, Jin C, et al. FOXP3 and CEACAM6 expression and T cell infiltration in the occurrence and development of colon cancer. *Oncol Lett.* 2016;11(6):3693-3701. doi:10.3892/ol.2016.4439
286. Nelson david L, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry, 7th Edition.* 7th Editio. (Nelson david L, Cox MM, eds.); 1392.
287. Inamura K, Mármol I, Sánchez-de-Diego C, et al. Colorectal cancer: a review. *Cancers (Basel).* 2017;31(1):4667. doi:10.18203/2320-6012.ijrms20174914
288. Taube JM, Galon J, Sholl LM, et al. Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Mod Pathol.* 2018;31(2):214-234. doi:10.1038/modpathol.2017.156
289. Siska PJ, Rathmell JC. T cell metabolic fitness in antitumor immunity. *Trends Immunol.* 2015;36(4):257-264. doi:10.1016/j.it.2015.02.007
290. Valentini AM, Di Pinto F, Cariola F, et al. PD-L1 expression in colorectal cancer defines three subsets of tumor immune microenvironments. *Oncotarget.* 2018;9(9):8584-8596. doi:10.18632/oncotarget.24196
291. Allison KE, Coomber BL, Bridle BW. Metabolic reprogramming in the tumour microenvironment: a hallmark shared by cancer cells and T lymphocytes. *Immunology.* 2017;152(2):175-184. doi:10.1111/imm.12777
292. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol.* 2002;3(11):999-1005. doi:10.1038/ni1102-999
293. Zhou E, Huang Q, Wang J, et al. Up-regulation of Tim-3 is associated with poor prognosis of patients with colon cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(7):8018-8027.
294. Zheng X, Song X, Shao Y, et al. Prognostic Role of Tumor-Infiltrating

- Lymphocytes in Esophagus Cancer: a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(2):720-732. doi:10.1159/000487164
295. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(2):85-95. doi:10.1038/nrc2981
296. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*. 2015;33(17):1974-1982. doi:10.1200/JCO.2014.59.4358
297. OuYang L-Y, Wu X-J, Ye S-B, et al. Tumor-induced myeloid-derived suppressor cells promote tumor progression through oxidative metabolism in human colorectal cancer. *J Transl Med*. 2015;13:47. doi:10.1186/s12967-015-0410-7
298. Arthur JC, Gharaibeh RZ, Mühlbauer M, et al. Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nat Commun*. 2014;5. doi:10.1038/ncomms5724
299. Szyllberg A, Karbownik D, Marszaek A. The role of FOXP3 in human cancers. *Anticancer Res*. 2016;36(8):3789-3794.
300. Shen Z, Chen L, Hao F, Wang G, Liu Y. Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. *J Cell Mol Med*. 2010;14(1-2):226-241. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20414968>. Accessed December 11, 2019.
301. le cu lar Bio lo M, Jiang W, Zheng L, et al. an open access journal Molecular Biology Association between FOXP3, FOXE1 Gene Polymorphisms and Risk of Differentiated Thyroid Cancer in Chinese Han Population. *Mol Biol*. 2015;4:3. doi:10.4172/2168-9547.1000131
302. Chen L, Yu Q, Liu B, Zhu L. Association of FoxP3 rs3761548 polymorphism with susceptibility to colorectal cancer in the Chinese population. *Med Oncol*. 2014;31(12):1-4. doi:10.1007/s12032-014-0374-0
303. Marques CR, Costa RS, Costa GN de O, et al. Genetic and epigenetic studies of FOXP3 in asthma and allergy. *Asthma Res Pract*. 2015;1(1). doi:10.1186/s40733-015-0012-4

304. He YQ, Bo Q, Yong W, Qiu ZX, Li YL, Li WM. FoxP3 genetic variants and risk of non-small cell lung cancer in the Chinese Han population. *Gene*. 2013;531(2):422-425. doi:10.1016/j.gene.2013.08.066
305. Chatrabnous N, Ghaderi A, Ariafar A, Razeghinia MS, Nemati M, Jafarzadeh A. Serum concentration of interleukin-35 and its association with tumor stages and FOXP3 gene polymorphism in patients with prostate cancer. *Cytokine*. 2019;113:221-227. doi:10.1016/j.cyto.2018.07.006
306. Cekin N, Pinarbasi E, Bildirici AE, et al. FOXP3 rs3761548 polymorphism is associated with knee osteoarthritis in a Turkish population. *Int J Rheum Dis*. 2018;21(10):1779-1786. doi:10.1111/1756-185X.13337
307. Yildiz KO. Association between Multiple Sclerosis and FOXP3 Gene promoter region mutations Multiple Skleroz ile FOXP3 geni promotor bölge mutasyonları arasındaki ilişki. *Cumhur Med J*. 2018;(3):226-232. doi:10.7197/223.vi.419261
308. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: Friends or foes? *Lab Invest*. 2006;86(3):231-245. doi:10.1038/labinvest.3700389
309. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*. 2001;29(2):117-129. doi:10.1038/ng1001-117
310. Katz LH, Likhter M, Jogunoori W, Belkin M, Ohshiro K, Mishra L. TGF- β signaling in liver and gastrointestinal cancers. *Cancer Lett*. 2016;379(2):166-172. doi:10.1016/j.canlet.2016.03.033
311. Uva V, Sfondrini L, Triulzi T, Casalini P, Tagliabue E, Balsari A. FOXP3 expression in tumor cells and its role in cancer progression. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2015;19(3):234-239. doi:10.4267/2042/56419
312. Prendergast GC, Smith C, Thomas S, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(7):721-735. doi:10.1007/s00262-014-1549-4
313. Prendergast GC. Cancer: Why tumours eat tryptophan. *Nature*. 2011;478(7368):192-194. doi:10.1038/478192a

314. Hoshi M, Ito H, Fujigaki H, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is highly expressed in human adult T-cell leukemia/lymphoma and chemotherapy changes tryptophan catabolism in serum and reduced activity. *Leuk Res.* 2009;33(1):39-45. doi:10.1016/j.leukres.2008.05.023
315. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1147-1154. doi:10.1172/JCI31178
316. De Jong RA, Nijman HW, Boezen HM, et al. Serum tryptophan and kynurenine concentrations as parameters for indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with endometrial, ovarian, and vulvar cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21(7):1320-1327. doi:10.1097/IGC.0b013e31822017fb
317. Schroecksadel K, Winkler C, Fuith LC, Fuchs D. Tryptophan degradation in patients with gynecological cancer correlates with immune activation. *Cancer Lett.* 2005;223(2):323-329. doi:10.1016/j.canlet.2004.10.033
318. Lyon DE, Walter JM, Starkweather AR, Schubert CM, McCain NL. Tryptophan degradation in women with breast cancer: A pilot study. *BMC Res Notes.* 2011;4. doi:10.1186/1756-0500-4-156
319. Engin AB, Karahalil B, Karakaya AE, Engin A. Helicobacter pylori and serum kynurenine-tryptophan ratio in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2015;21(12):3636-3643. doi:10.3748/wjg.v21.i12.3636
320. Badawy AAB, Guillemin G. The Plasma [Kynurenine]/[Tryptophan] Ratio and Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Time for Appraisal. *Int J Tryptophan Res.* 2019;12. doi:10.1177/1178646919868978

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın ismi '**Kolorektal Kanserde Triptofan Metabolizması ve Foxp3 Arasında İmmün Sisteme Yönelik Bağlantının Araştırılması**'dır.

Bu çalışmada, kolorektal kanserli dokularda ekspres olan FOXP3 molekülü ile triptofan metabolizması arasında anlamlı bir ilişki bulunup bulunmadığı araştırılacaktır. FOXP3 molekülünün kolorektal kanserli dokularda ekspresyonunun saptanması durumunda, belirlemede önemli bir belirteç olacağını düşündürmektedir.

Bu araştırma için öngörülen süre 24 ay olup, çalışmada yer alacak gönüllülerin sayısı 100 kişidir.

Bu araştırma ile ilgili olarak biz araştırmacılara kol damarınızdan kan örneklerinin alınmasına izin verip, verdiğiniz doku ve kan örneklerinde çalışma yapmamıza yardımcı olmanız ve çalışmanın sonucunda bilgi almanız sizin sorumluluklarınızdır.

Bu çalışmada sizin için herhangi bir risk ve rahatsızlık söz konusu değildir. Ayrıca sizin bu çalışmaya katılımınız; kolorektal kanserine yatkınlık oluşturan nedenlerin incelenmesi çalışmalarına ve dolayısıyla bu etmenlere yönelik tanı ve tedavi seçeneği geliştirilmesi çalışmalarına yarar sağlayacak olup, yardımlarınız ile dolaylı yönden bilim dünyasına katkıda bulunmuş olacaksınız.

Bu çalışmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır. Ayrıca, bu çalışma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Bu çalışmada uygulama sırasında herhangi bir rahatsızlıkla ve riskle karşılaşmanız söz konusu değildir ve yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Çalışmada yer almayı reddedebilirsiniz veya herhangi bir aşamada çalışmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel olacak bir duruma yol açmayacaktır. Araştırmacı bilginiz dahilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan

tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu çalışmada sizin hiçbir hukuki ve mali sorumluluğunuz bulunmayıp tüm sorumluluklar araştırmacı ve destekleyiciye aittir. Arzunuz üzere mali ve hukuki yükümlülüğünüz olmaksızın çalışmadan ayrılabilirsiniz. Elde edilen doku ve serum örneğiniz bu çalışma dışında başka bir işlem için kullanılmayacaktır.

Başka bir çalışmada sizin doku ve serumlarınızın kullanılması gerektiğinde sizden izin alınacaktır. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir. Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayımlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0532 412 54 78 nolu telefondan Prof. Dr. İlhan YAYLIM'a veya 0531 717 36 82 no'lu telefondan Ebru Nur AY'a ulaşabilirsiniz.

Sayın Doç Dr. Soykan ARIKAN tarafından İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği'nde, Prof Dr. Filiz Akyüz tarafından İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağını belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağını bilincindeyim). Ayrıca tıbbi

durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışında tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği'nden Doç. Dr. Soykan ARIKAN'ı, 0212 459 66 23 numaralı telefondan, İstanbul Tıp Fakóltesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'ndan Prof Dr. Filiz Akyüz'ü 0212 414 20 00/ 32975 no'lu telefondan arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün;

Adı-soyadı:

Tarih:

Adresi:

Telefon no:

İmzası:

Araştırma ekibinde yer alan ve yetkin bir araştırmacının;

Adı-soyadı:

Tarih:

Adresi:

Telefon No:

İmzası:

Araştırma ekibinde yer alan ve yetkin bir araştırmacının;

Adı-soyadı:

Tarih:

Adresi:

Telefon No:

İmzası:

**Olur alma işleme başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/
görüşme tanığının,**

Adı-Soyadı:

Tarih:

Adresi:

Telefon no:

İmzası:

ETİK KURUL KARARI

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



Sayı : 479

Konu: Prof. Dr. İlhan YAYLIM hk.

Tarih : 27.03.2018

Sayın Prof. Dr. İlhan YAYLIM
Moleküler Tıp

İlgilendiren : Moleküler Tıp Anabilim Dalının 19/03/2018 gün ve 104159 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Doktora Öğr. Ebru Nur AY' in yürüteceği 2018/452 dosya numaralı "Kolorektal Kanserde Triptofan Metabolizması ve Foxp3 Arasında İmmün Sisteme Yönelik Bağlantının Araştırılması" başlıklı çalışma kurumumuzun 23/03/2018 tarih ve 06 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KOLOREKTAL KANSERDE TRİPTOFAN METABOLİZMASI VE FOXP3 ARASINDA İMMÜN SİSTEME YÖNELİK BAĞLANTININ ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 3	% 1	% 8
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 6
2	www.tihud.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	www.roche.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Yeditepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	kubtuam.kku.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ebru Nur	Soyadı	AY
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	18.04.1987
Email	ebrunur_ay@hotmail.com	Uyruğu	T.C

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi	
Yük.Lis.	Yıldız Teknik Üniversitesi	2015
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2012

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
.	Öğr. Gör.	İstinye Üniversitesi	2016-Halen
.	Ar. Gör.	Yeni Yüzyıl Üniversitesi	2015-2016

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS/YÖKDİL Puanı
İngilizce	Iyi	Iyi	Iyi	85

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar

- Hepokur C., Kariper İ.A, Mısır S., **Ay E.N.**, Tunaoğlu S., Süleymanoğlu M., Zeybek Ü., Kuruca S., Yaylım İ. (2019), ‘‘Silver Nanoparticle Capecitabine for Breast Cancer Cell Treatment’’ Toxicology in Vitro, DOI: 10.1016/j.tiv.2019.104600
- Bildiren Ö., Cevatemre B., **Ay E.N.**, Özen G., Hepokur C., Erkisa M., Küçüküseyin Ö., Ulukaya E., Kuruca S., Yaylım İ. (2018), ‘‘An Investigation of Anticancer Effects of Doxorubicin and Calcitriol Combination on MCF-7 Cells’’ Experimed, DOI: 10.26650/experimed.2018.18001
- Çalışkan Z., **Ay E.N.** (2018), ‘‘Synthesis of Dihydrobenzofuranone Derivatives with Biotechnological Methods’’ Jotcsa, DOI: 10.18596/jotcsa.448551

Sertifikalalar

- **August 2019**, ‘‘SHIMADZU HPLC General Useage Training’’ Ant Technical Company, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul University, İstanbul, Turkey
- **October 2018**, ‘‘ Cell Death / cytotoxicity workshop’’ Prof. Dr. Engin Ulukaya, 7st Multidisciplinary Cancer Research and 1st Basic Oncology Congress, Izmir, Turkey
- **May 2018**, ‘‘BIO-RAD- V3 Western Workflow & Total Protein Normalization Practical Training’’ Gen Era Diagnostic company, İstinye University, Istanbul, Turkey
- **February 2017**, ‘‘New technologies in Cell Death Workshop’’ Gebze Technical University, Kocaeli, Turkey
- **February 2017**, ‘‘Bioinformatics Approaches in Cell Death Workshop’’ Gebze Technical University, Kocaeli, Turkey
- **May 2016**, ‘‘ I. Autophagia Practical Course’’ Prof. Devrim Gözüaçık, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Sabancı University, Istanbul, Turkey
- **June 2009**, ‘‘MATLAB Training’’ Akiza Information Technology Academy, Istanbul, Turkey