

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KOLOREKTAL KANSER RİSKİ İLE HİPOKSIYLA  
İNDÜKLENEN FAKTÖR-1ALFA (HIF-1 $\alpha$ ) VE VON HIPPEL  
LINDAU (VHL) GEN POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ  
İLİŞKİ**

**Uz. Dr. HASAN SAYGIN DEMİREL**

**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Yrd. Doç. Dr. A. Bülent TURHAN**

**KONYA-2013**

## TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Doktora Öğrencisi **Hasan Saygın DEMİREL**'in "Kolorektal Kanser Riski İle Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1alfa (HIF-1 $\alpha$ ) ve Von Hippel Lindau (VHL) Gen Polimorfizimleri Arasındaki İlişki" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA /08.01.2014

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. A. Bülent TURHAN

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İmzası



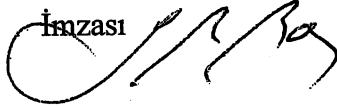
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Sadık BÜYÜKBAŞ

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İmzası



Jüri Üyesi

Doç. Dr. İbrahim Ömer BARLAS

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İmzası



Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. H. Gül DURSUN

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

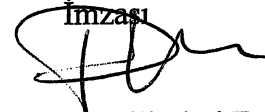
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İmzası



İmzası

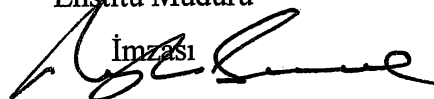


Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun...24.01.2014...tarikh ve 02/4.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neyhan Ergene

Enstitü Müdürü

İmzası



## APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**Colorectal Cancer Risk in Relation to Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and von Hippel-Lindau (VHL) Gene Polymorphisms**” by “**Hasan Saygı DEMİREL**” and that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of **Doctor of Philosophy** in the department of “**Medical Biology**” institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan .

KONYA /08.01.2014

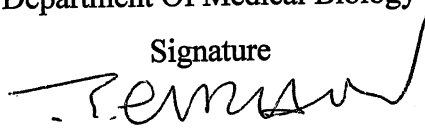
Principal Advisor

Assistant Professor A. Bülent TURHAN

Necmettin Erbakan University

Department Of Medical Biology

Signature



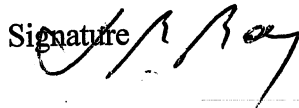
Examination Committee Member

Professor Sadık BÜYÜKBAŞ

Necmettin Erbakan University

Department Of Medical Biochemistry

Signature




Examination Committee Member

Associate Professor İbrahim Ömer BARLAS

Mersin University

Department Of Medical Biology

Signature



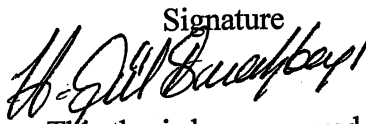
Examination Committee Member

Assistant Professor H. Gül DURSUN

Necmettin Erbakan University

Department Of Medical Biology

Signature



Examination Committee Member

Assistant Professor Pelin TAŞDEMİR

Necmettin Erbakan University

Department Of Medical Biology

Signature

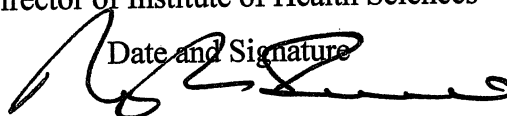


This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

24.01.2014  
Prof. Dr. Neyhan Ergene

Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature




## **Beyanat**

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

Tarih: 24.12. 2013

Öğrencinin Adı Soyadı: Uz. Dr. H. Saygın DEMİREL

İmzası



## **ÖNSÖZ**

Tezimi yapabilmem için tüm olanakları sağlayan ve akademik birikimi ile bana yardımcı olan tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. A. Bülent TURHAN'a, çalışmam süresince bilimsel yönlendirmeleri ile destekleyen Yrd. Doç. Dr. H. Gül DURSUN ve Yrd. Doç. Dr. Pelin TAŞDEMİR'e ve emekli olarak ayrılan önceki danışmanım Prof. Dr. S. Sennur DEMİREL'e

Tezin her aşamasında bana destek veren çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Sümeyra ÇETİNKAYA, Araş. Gör. İlkur ÇINAR ve doktora öğrencisi Serkan KÜÇÜKTÜRK'e,

Yoğun tempolarına rağmen vakalara ulaşmada ve çalışma gruplarının oluşturulmasında yardımlarını esirgemeyen Genel Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Tefik KÜÇÜKKARTALLAR'a,

Büyük bir özveri ile çalışmalarım boyunca bana destek veren aileme sonsuz sevgi ve teşekkürler.

## İÇİNDEKİLER

İç Kapak.....	i
Tez Onay Sayfası.....	ii
Tez Beyan Sayfası.....	iv
Önsöz .....	v
İçindekiler.....	vi
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi.....	ix
Şekiller Listesi.....	xi
Tablolar Listesi.....	xii
Özet.....	xiii
Abstract.....	xv
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
2.1. Tümör Büyümesi.....	2
2.1.1. Onkogenler, Tümör Baskılayıcı Genler ve Koruyucu Genler.....	3
2.2. Kolorektal Kanseler.....	5
2.2.1. Kolon ve Rektum Anatomisi.....	5
2.2.2. Etiyoloji.....	6
2.2.3. Kolorektal Kanser Oluşumu.....	7
2.2.4. Kolorektal Kanselerde Bazı Ortak Değişiklikler.....	8
2.2.5. Genetik Faktörler.....	9
2.2.5.1. Ailesel Adenomatöz Polipozis Koli (FAP).....	9
2.2.5.2. Kalıtsal Non-Polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC).....	11
2.2.5.3. Gardner Sendromu.....	12
2.2.5.4. Turcot Sendromu.....	12
2.2.6. Çevresel Faktörler.....	12
2.2.7. İltihabi Barsak Hastalıkları.....	15
2.2.8. Kolorektal Polipler ve Polipozis Sendromları.....	15
2.2.9. Kolorektal Tümörlerin Sınıflandırılması.....	16
2.2.10. Kolorektal Kanselerde Evreleme.....	16
2.2.11. Yüksek Risk Grupları.....	18
2.2.12. Semptom ve Belirtiler.....	18
2.2.13. Kolorektal Kanselerde Tanı Teknikleri.....	19
2.2.14. Tedavi ve İzlem.....	20

2.3. Bir Tümör Baskılayıcı Gen Olan von Hippel-Lindau (VHL).....	21
2.3.1. İnsan VHL Geni ve Proteinleri.....	21
2.3.2. VHL Proteininin İşlevleri.....	21
2.3.3. VHL Hastalıklarının Genetik Mekanizmaları.....	23
2.3.4. Epigenetik Mekanizmalar ve Promotör Hipermetilasyonu.....	24
2.4. Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ).....	26
2.4.1. HIF-1 Genleri ve Proteinleri.....	26
2.4.2. HIF-1 Proteinlerinin İşlevleri.....	28
2.4.3. HIF-1 $\alpha$ ve VHL Protein Etkileşimi.....	29
2.4.4. Lizin Asetilasyonunun HIF-1 Degradasyonu Üzerine Etkisi .....	31
2.4.5. HIF-1'in Fosforilasyonu.....	32
2.4.6. HIF-1'in Hedef Genleri.....	32
2.4.6.1. Anjiyogenezis.....	33
2.4.6.2. Glukoz metabolizması.....	33
2.4.6.3. Hücre proliferasyonu ve sağkalım.....	33
2.4.6.4. Apoptozis.....	34
2.4.6.5. Embriyonik gelişim.....	34
2.4.6.6. Kanser gelişimi.....	34
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>37</b>
3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması.....	37
3.2. Hastadan Kan Alınması.....	37
3.3. Kullanılan Cihazlar.....	37
3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	38
3.5. Kullanılan Çözeltiler.....	38
3.6. Genomik DNA İzolasyonu.....	40
3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	41
3.8. Amplifikasyon Refraktör Mutasyon Sistemi (ARMS).....	41
3.9. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	42
3.10. Polimorfizm Seçimi.....	42
3.11. Agaroz Jel Hazırlama ve Görüntüleme.....	42
3.12. İstatistiksel Değerlendirme.....	43
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>44</b>
4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Kaydedilen Klinik Bilgileri.....	44
4.2.1. HIF-1 $\alpha$ C1772T Bölgesi ARMS - PZR Sonuçları.....	46

4.2.2. HIF-1 $\alpha$ G1790A bölgesi ARMS - PZR sonuçları.....	47
4.2.3. VHL rs779805 gen bölgesi PZR-RFLP sonuçları.....	49
4.3. HIF-1 $\alpha$ C1772T polimorfizminin genetik modellere göre frekansları.....	51
4.4. HIF-1 $\alpha$ G1790A polimorfizminin genotip frekansları.....	52
4.5. Kolorektal kanser ve kontrollerde VHL rs779805 polimorfizminin genetik modellere göre frekansları.....	54
4.6. Kolorektal kanserin klinik ve patolojik özelliklerinin genotiplere göre Dağılımı.....	57
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>58</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>67</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>91</b>
EK-1 Etik Kurul Onayı.....	91
EK-2 Hasta Onam Formu.....	92
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>93</b>



## ***KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ***

Akt:	Protein-serin/treonin kinaz
APC:	Tümör baskılayıcı gen
ARD1:	Asetiltransferaz
ARMS:	Amplifikasyon Refraktör Mutasyon Sistemi
ARNT:	Aril Hidrokarbon Nükleer Translokator
bHLH:	Basic helix-loop-helix protein
BHT:	Böbrek hücreli tümörler
CBP:	Bağlayıcı protein
CEA:	Karsino embriyogenik antijen
CRP:	C-reaktif protein
CpG:	Sitozin-fosfoguanin
C-TAD:	C-terminal transaktivasyon domeyn
DCC:	Tümör baskılayıcı gen
E2:	Ubikütin Konjugasyon Enzimi
E3:	Ubikütin Ligaz
Elongin B:	Fonksiyonel regülatör protein
Elongin C:	Fonksiyonel regülatör protein
EMT:	Epitelyal dokunun mezenkimal fenotipe dönüşümü
Epo:	Eritropoietin
Eritropoez:	Alyuvar oluşumunu
FAP:	Ailesel Adenomatöz Polipozis Koli
FIH:	Faktör Engelleyici HIF
HIF-1 $\alpha$ :	Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 alfa
HNPCC:	Kalıtsal polipsiz kolorektal kanser
HER2:	Reseptör tirozin kinaz
HRE:	Hipoksi cevap elementi
ID:	İnhibitör domeyn
IPAS:	İnhibitör PAS domeyn proteini
K-ras:	Protoonkogen
MAPK:	Mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz
Mdm2:	Ubikütin ligaz
MIF:	Makrofaj migrasyon inhibitör faktör

MSI:	Mikrosatellit instabilite testi
NLS:	Nükleer lokalizasyon sinyali
N-TAD:	N-terminal transaktivasyon domeyn
ODD:	Oksijen bağımlı degradasyon domeyn
PAS:	Per-Arnt-Sim ailesi proteinleri
P53:	Tümör baskılayıcı gen
PHD:	Prolil hidroksilaz
PI3K:	Fosfatidilinositol 3 kinaz
PTEN:	Tümör baskılayıcı gen (beyin tümörleri, melanom, prostat, endometrium, böbrek ve akciğer karsinomları)
pVHL:	VHL proteini
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rbx1:	Ubiküitin ligaz
RFLP:	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
SNP:	Tek nükleotid değişimi
STRP:	DNA'da kısa baz tekrarları
TCA:	Trikarboksilik asit döngüsü
TGF- $\alpha$ :	Transforming büyüme faktörü- $\alpha$
TPA:	Doku polipeptid antijeni
TPS:	Doku polipeptid spesifik antijeni
VCB:	VHL/elonginC/Cul2 kompleksi
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VHL:	von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı gen
VNTR:	DNA'da değişken sayıda ardışık tekrar
V-Src:	Retroviral onkogen (Rous sarkom)
Wnt:	Frizzled reseptörleri
XP:	Kseroderma pigmentozum
XPA-XPG:	DNA onarım genleri

## ***ŞEKİLLER LİSTESİ***

Şekil 2.2.1. Kolon ve rektumun yapısı .....	6
Şekil 2.2.2. Tipik bir kolon kanserinde adenomun enine kesiti.....	8
Şekil 2.2.3. Kolorektal kanser gelişiminde öngürülen genetik değişimler.....	11
Şekil 2.3.1. VHL gen yapısı ve protein domeynleri.....	21
Şekil 2.3.2. HIF-1 $\alpha$ nın VHL ve oksijen bağımlı ubikütinasyonu.....	23
Şekil 2.4.1. HIF-1 $\alpha$ geninin ve proteininin yapısı.....	26
Şekil 2.4.2. İnsan HIF- $\alpha$ ve HIF-1 $\beta$ domeyn yapıları .....	27
Şekil 2.4.3. HIF-1 $\alpha$ 'nın yapısı .....	28
Şekil 2.4.4. HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$ heterodimerinin hipoksi cevap elementlerine (HRE) bağlanması ve hedef genleri.....	29
Şekil 2.4.5. HIF-1 stabilizasyonu ve transaktivasyonunun oksijen-bağımlı regülasyonu.....	31
Şekil 4.1. C1772T gen bölgesi ARMS – PZR sonucu oluşan genotipler.....	46
Şekil 4.2. G1790A gen bölgesi 60-70 °C sıcaklık gradient PZR görüntüsü.....	48
Şekil 4.3. G1790A gen bölgesi ARMS-PZR sonucu oluşan genotipler.....	48
Şekil 4.4. VHL geni rs779805 gen bölgesi 71-75 °C sıcaklık gradient PZR görüntüsü.....	50
Şekil 4.5. VHL geni rs779805 polimorfizminin PZR-RFLP sonuçları.....	50

## ***TABLolar LİSTESİ***

Tablo 2.2.1. Kolorektal Kanser Hücreleride Bulunan Bazı Genetik Anomaliler...	12
Tablo 2.2.2. Kolorektal Kanserde Evreleme.....	18
Tablo 4.1. Hasta ve Kontrollerin Demografik Bilgileri.....	45
Tablo 4.2. C1772T bölgesi için PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları.....	47
Tablo 4.3. G1790A bölgesi için PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları.....	49
Tablo 4.4. VHL (rs779805) gen bölgesi PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları .....	51
Tablo 4.5. Kolorektal kanser ve kontrol bireylerinde HIF-1 $\alpha$ C1772T polimorfizminin genetik modellere göre frekansları.....	53
Tablo 4.6. Kolorektal kanser ve kontrollerde HIF-1 $\alpha$ G1790A polimorfizminin genotip frekansları.....	54
Tablo 4.7. Kolorektal kanser ve kontrollerde VHL rs779805 polimorfizminin genetik modellere göre frekansları.....	55
Tablo 4.8. Kolorektal kanserin klinik ve patolojik özelliklerinin genotiplere göre dağılımı.....	56

## ÖZET

N. E. Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ / KONYA 2013

Uz. Dr. H. Saygın DEMİREL

### **Kolorektal Kanser Riski ile Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1Alfa (HIF-1 $\alpha$ ) ve von Hippel-Lindau (VHL) Gen Polimorfizmleri Arasındaki İlişki**

Kolorektal kanser insanda sık görülen dört kanser türü arasında yer alır ve ölüme götüren kanserler içerisinde ikinci sıradadır. Kolorektal kanser oluşumunda çevresel ve genetik faktörler etkilidir. Birçok kanser türünün gelişmesinde etkili olduğu düşünülen HIF-1 $\alpha$  geni hücrenin hipoksiye cevabının anahtar regülatörüdür. VHL tümör baskılayıcı bir gen dir ve hipoksiye cevap yolağında önemli rol alır. Bu çalışmanın amacı, HIF-1 $\alpha$  geninin C1772T (rs11549465) ve G1790A (rs11549467) polimorfizmleri ile HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijen-bağımlı degradasyonunu regüle eden VHL genin 5'UTR bölgesindeki fonksiyonel rs779805 polimorfizminin ve ayrıca yaş, cinsiyet, ailede kanser öyküsü, sistemik hastalıklar, beyaz toprak maruziyeti, sigara ve alkol tüketiminin kolorektal kanser riski ile ilişkisini araştırmaktır.

Çalışmaya, kolorektal kanser tanısı almış 92 hasta ile kontrol grubu olarak 101 birey alındı. DNA izolasyonu için periferik kan kullanıldı. HIF-1 $\alpha$  genindeki rs11549465 C>T ve rs11549467 G>A polimorfizm değişimlerini genotiplemek için ARMS-PZR; VHL rs779805 A>G polimorfizm değişimini genotiplemek için PZR-RFLP moleküler tanı yöntemleri kullanıldı.

Hasta ve kontrollerde HIF-1 $\alpha$  geni C1772T, G1790A ve VHL geni rs779805 polimorfizmlerinin genetik modellere göre frekansları belirlendi. HIF-1 $\alpha$  C1772T polimorfizminin CT/TT genotipleri hasta grubunda daha fazla sayıda bulundu (P<0.05). Odds oranı %95 güven aralığında hesaplandı ve 1.96 (1.02-3.77) olarak bulundu; ancak yaş, cinsiyet, ailede kanser öyküsü, beyaz toprak maruziyetine göre ayarlanmış olan odds oranı (AOR) %95 güven aralığında 4.79 (1.07-21.48) olarak bulundu. Çalışmamızda saptadığımız bu bulgu CT/TT genotiplerine sahip bireylerde kolorektal kanser riskinin artmış olduğunu göstermektedir. Ayrıca ileri yaş, erkek cinsiyet, ailede kanser öyküsü, eşlik eden hastalıklar ve beyaz toprak maruziyetinin kolorektal kanser için birer risk faktörü olduğu istatistiksel analizlerle belirlendi

( $P < 0.05$ ). Hastalarda TNM evrelemesinin genotip dağılımları ile ilişkisine bakıldı, gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı ( $P > 0.05$ ).

Çalışmamızın sonuçları; ileri yaş, erkek cinsiyet, ailede kanser öyküsü, eşlik eden hastalıklar ve beyaz toprak maruziyeti gibi risk faktörlerine ilaveten, HIF-1 $\alpha$  C1772T polimorfizmi CT/TT genotip taramasının, kolorektal kanserin erken tanısında avantaj sağlayabilir birer risk belirteci olabileceklerini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** HIF-1 $\alpha$ , VHL, Polimorfizm; rs11549465, rs11549467, rs779805, Kolorektal kanser.

## **ABSTRACT**

### ***Colorectal Cancer Risk in Relation to Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) and von Hippel-Lindau (VHL) Gene Polymorphisms***

Colorectal cancers are among the four most frequently seen cancers in humans and the 2<sup>nd</sup> in terms of fatality. Environmental and genetic factors have role in the formation of colorectal cancer. HIF-1 $\alpha$  gene, which is thought to have role on development of many cancer types, is the key regulator of cell's response to hypoxia. VHL is a tumor-suppressive gene and has critical role along the pathway of hypoxia response. The aim of this study is to investigate the relation of the C1772T (rs11549465) and G1790A (rs11549467) polymorphisms of HIF-1 $\alpha$  gene and the functional rs779805 polymorphism of 5'UTR region of the VHL gene, regulating the oxygen-dependent degradation of HIF-1 $\alpha$ , and age, gender, cancer history of family, co-existing diseases, exposure to white soil, consumption of cigarette and alcohol with the risk of colorectal cancer.

In the study, 92 patients who have been diagnosed to have colorectal cancer and 101 healthy controls were included. Peripheral blood was used for isolating DNA. ARMS-PZR and PZR-RFLP molecular diagnostic methods were used respectively, to genotype the HIF-1 $\alpha$  gene's rs11549465 C>T and rs11549467 G>A, and VHL gene's rs779805 A>G polymorphism transformations.

The frequencies of HIF-1 $\alpha$  gene's C1772T and G1790A, and VHL gene's rs779805 polymorphisms in patients and controls were determined, according to genetic models. CT/TT genotypes of HIF-1 $\alpha$  C1772T polymorphism were found to increase the risk of colorectal cancer in patients ( $p < 0.05$ ). Odds ratio was computed as 1.96 (1.02-3.77) within 95% confidence interval (AOR; Adjusted Odds ratio) was computed as 4.79 (1.07-21.48). This finding in our study shows that colorectal cancer risk increases in patients having CT/TT. Additionally, it was demonstrated via statistical analyses that higher age, male gender, cancer history in family, co-existing diseases, and exposure to white soil stands to be risk factors of colorectal cancer ( $p < 0.05$ ). No significant relation was found between patients' TNM stages and distributions of genotype ( $p > 0.05$ ).

The findings from our study demonstrates that, in addition to risk factors for colorectal cancer, of higher age, male gender, cancer story in family, co-existing diseases, and exposure to white soil, scanning CT/TT genotypes of HIF-1 $\alpha$  C1772T polymorphism can be advantageous in early-diagnosis of colorectal cancer.

**Keywords:** HIF-1 $\alpha$ , VHL, Polymorphism; rs11549465, rs11549467, rs779805, Colorectal cancer.



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yapılan araştırmalar kolorektal kanser sıklığıının tüm kanser vakaları içerisinde üçüncü, kanser sebebiyle olan ölümlerin ikinci sırasında yer aldığını ortaya koymaktadır (Knechtel ve ark. 2010). Kolorektal kanser riskini çevresel ve genetik faktörler etkilemektedir. Oksijen homeostazında kritik bir rol oynayan Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 (HIF-1) heterodimerik bir protein olup HIF-1 $\alpha$  ve HIF-1 $\beta$  alt ünitelerinden oluşmaktadır. Nükleusda bulunan  $\beta$ -alt ünitesi yapısal, sitoplazmada bulunan  $\alpha$ -alt ünitesi regülatör bileşen olarak işlev görmektedir. Hücrede HIF-1 $\alpha$ 'nın degradasyonu oksijen-bağımlı hidroksilasyonla regüle edilmektedir ve bu regülasyon bir tümör baskılayıcı gen olan von Hippel-Lindau (VHL) proteini tarafından gerçekleştirilmektedir. Birçok fizyolojik ve patofizyolojik olayın gen seviyesindeki düzenlenmeleri ile hücrelerin oksijensiz ortamda oksijenlenmeyi sağlayacak yeni damar oluşumu, alyuvarların üretiminde artış ve anaerobik glikolizise kadar çeşitli metabolizma değişikliklerinin hipoksiyle düzenlendiği bilinmektedir (Semenza 2009) Deneysel çalışmalarda, HIF-1 $\alpha$ 'nın normoksik koşullarda bulunan hücrelerde hızla yıkılırken çeşitli kanser hücrelerinde ekspresyonunda artış saptanmıştır (Ohh ve ark. 2000; Maynard ve Ohh 2004; Semenza 2009; Qin ve ark. 2012). HIF-1 $\alpha$  ve VHL polimorfizmlerinin kanser riski üzerindeki etkileri birçok defa çalışılmıştır (Illingworth ve ark. 2010; Knechtel ve ark. 2010; Domene ve ark. 2012); ancak kolorektal kanser riski üzerindeki rolü hala belirsizdir.

Bu çalışmanın amacı; öncelikli olarak HIF-1 $\alpha$  geninde tanımlanan C1772T (rs11549465) ve G1790A (rs11549467) polimorfizmleri ile oksijen varlığında sitozolde HIF-1 $\alpha$  yıkımı ile ilişkilendirilen tümör baskılayıcı VHL geninde fonksiyonel rs779805 genetik polimorfizminin kolorektal kanser açısından bir risk faktörü olup olmadığını araştırmaktır. Ayrıca çalışmaya dahil edilen bireylerin yaşı, cinsiyeti, ailede kanser öyküsü, sistemik hastalıkları, beyaz toprak maruziyeti, sigara ve alkol kullanımı gibi risk faktörlerini kaydederek hasta ve kontrol gruplarındaki sıklığını karşılaştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Hücrenin moleküler biyolojisi, tüm biyolojik bilimlere temel olan ve hızla büyüyen aktif bir araştırma alanıdır. Watson ve Crick'in DNA yapısını tanımlayan tarihsel makalelerinin yayımlanmasından elli yıl sonra, 2001'de insan genom dizisi öntaslağının tanıtımını takiben 2003'de dizinin yüksek kalite versiyonu tamamlanmıştır (Knudson 2001; Balmain 2003). İnsan genomu dizisinin şifresinin çözülmesi, gen işlevi ve düzenlenmesi çalışmalarına yeni yaklaşımlar getirmekte ve kanser genetiğinin gelişimindeki tarihsel köşe taşları izlenebilmektedir. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler 1980'lerden günümüze yoğun araştırmaların odağı olmuş insan neoplazmalarında bulunan birçok stimülatör "onkogenler" ve baskılayıcı "tümör supressör genler" hem tümörögenезisin hem de normal düzenleyici büyüme yollarının ne kadar karmaşık olduğunun anlaşılmasını sağlamıştır (Macleod 2000; Nowell 2002). Ayrıca bu hızlı moleküler bilgi artışı tıp uygulamalarında yeni ufuklar açmış kanserden korunma ve tedavi konusunda etkili olanaklar sunmuştur (Vogelstein ve Kinzler 2004; Vescovi ve ark. 2006; Apessos ve ark. 2008).

### 2.1. Tümör Büyümesi

Tümör, hücrenin fizyolojik davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz çoğalmaya başlamaları sonucu oluşur. Bir tümör benign veya malign olabilir (Komarova ve ark. 2003). Malign tümörler benign olanlarından birçok şekilde farklılık gösterirler; malign tümör hücrelerinin temel farklılığı invaziv oluşları ve metastaz yapmalarıdır. Malign bir tümör oluşumu için hücrede en azından 3 ila 5 mutasyon gerekirken, benign tümörlerde sadece 1 veya 2 mutasyon bulunabilir (Nowell 2002).

Moleküler çalışmalardan elde edilen kanıtlar, tümörögenезisin çok aşamalı bir süreç olarak geliştiğini göstermektedir. Bu süreç içerisinde, genetik değişimler sonucu, normal bir hücre sürekli transformasyonla malign bir tümöre dönüşebilmektedir (Renan 1993; Hanahan ve Weinberg 2000; Knudson 2002). Hücre fizyolojisindeki 6 temel değişimin malign tümör oluşumunu sağladığı hakkında birçok veri mevcuttur. Bunlar hücre bölünmesini baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, kendi kendine yeterlilik (otokrin uyarım), programlı hücre ölümünden kaçış, limitsiz yenilenme potansiyeli, sürekli anjiogenesisiz, doku invazyonu ve metastaz olarak belirtilmektedir (Hanahan ve Weinberg 2000).

### **2.1.1. Onkogenler, Tümör Baskılayıcı Genler ve Koruyucu Genler**

Hücre çoğalmasının fizyolojisi hücre bölünmesi, farklılaşması, büyüme blokajı ve apoptozu kontrol eden ilgili moleküler yollarla regüle edilmektedir. Homeostazisin sağlanması için bu olayların sıkı kontrolü gerekir ve birçok genin işlevini içerir. Bu genlerden bazılarının düzensiz regülasyonu patolojik durumların ortaya çıkmasına yol açtığı kadar maligniteye de sebep olmaktadır. Tümörögenezisten onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve genetik kararlılığı sağlayan genler sorumludurlar (Vogelstein ve Kinzler 2004). Genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan hücresel genlere protoonkogenler denir. Protoonkogenlerdeki değişimler, somatik veya germ hücre mutasyonlarıyla oluşabilir. Hücrenin çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen sinyal ileti yollarında işlevsel bir genin mutasyonundan sonra bir protoonkogen aktifleşip ekspresyonu değişebilir, yani bir onkogen haline gelebilir (Alberts ve ark. 2008).

Onkogenik bir aktivasyon, kromozomal translokasyon, bir gen amplifikasyonu veya genlerden birinde kritik bir mutasyonla, gen aktivasyonunu regüle eden bir etkinin ortaya çıkması sonucu oluşabilir (Rowley 1983; Knudson 1985; Balmain 2003). Hücrede bazı değişimlere eklenen, bir protoonkogenin bir allelindeki aktive edici somatik bir mutasyon, hücreye genellikle seçici bir çoğalma avantajı sağlamaya yeterli olabilir. Örnek vermek gerekirse *MET* geni kalıtsal papiller karsinoma için predispozandır, akciğer, over ve idrar kesesi karsinomalarında *K-ras* geni yer alırken, baş ve boyun kanserlerinde *N-ras* geni mutasyonları yaygındır (Vogelstein ve Kinzler 2004).

Genetik değişimler tümör baskılayıcı genleri zıt yönde etkilerler; gen ürünlerinin aktivitelerini azaltarak veya ortadan kaldırarak gen fonksiyonlarının kaybına sebep olurlar (Knudson 2002; Vogelstein ve Kinzler 2004). Bu tür inaktivasyonları, protein aktivitesi için esansiyel lokasyonlarda olan yanlış anlamalı mutasyonlar (missense mutations), dur kodonu ile kesilen ve hızlı yıkılan protein oluşumuna sebep olan mutasyonlar (nonsense mutations), bir baz kaybıyla çerçeve kayması mutasyonları (frameshift mutations), farklı büyüklüklerde delesyon veya insersiyonlar, ya da genin epigenetik davranışındaki farklılıklar oluşturabilir. Hücreye seçici bir avantaj kazandırmak için gerekli diğer bir mutasyon ise tümör baskılayıcı genlerin maternal veya paternal alellerini etkileyen genetik (epigenetik de olabilir) değişimlerdir. Böyle bir durumda inaktivasyon, bir allelin delesyonu ya da kalıtsal olarak heterozigotluğu üzerine diğer allelinde somatik mutasyonuyla tümör

baskılayıcı genin her iki allelinde etkinsizleşmesinden kaynaklanabilir (Knudson 2002; Cvetkovic ve ark. 2004).

Kanser genlerinin, mutasyona uğradığında tümörögenезisi tamamen farklı bir yoldan kolaylaştıran üçüncü bir sınıfı ise stabiliteyi koruyucu genlerdir. Bu grup, yanlış eşleşme hatalarını doğrudan tersine çeviren onarım (mismatch repair), hasarlı tek baz çıkarma onarımı (base-excision repair), yanlış nükleotid kesip çıkarma (nucleotide-excision repair) onarımı genlerini içerir. Bunlar normal DNA replikasyonu sırasında oluşan yanlışlık veya mutajenlere maruz kalma sonucu indüklenen yanlışlıkların düzeltilmesinden sorumludurlar. İnsanlarda XPA'dan XPG'ye kadar simgeleşmiş yedi farklı onarım geni tanımlanmıştır. Kseroderma pigmentozum (XP) ve herediter nonpoliposis kolon kanseri (HNPCC) bu genlerin mutasyonlarından kaynaklanan genomik kararsızlık hastalıklarına örnektirler (Friedberg 2003; Cooper ve Hausman 2004; Cvetkovic ve ark. 2004; Alberts ve ark. 2008; Apeşos ve ark. 2008).

Birçok araştırmacı tümör hücrelerinin klonal gelişiminde ve klinik ilerlemelerinde genetik kararsızlığın önemini göstermişlerdir (Friedberg 2003; Cvetkovic ve ark. 2004). Son yıllarda ilgili yayınlardaki artış, tümörögenезisde genomik instabilitenin rolünü tartışmayı gerektirmektedir (Sieber ve ark. 2005). Artık kanserin, hücre bölünmesini direk olarak kontrol eden genlerdeki mutasyon birikiminin sonucu ortaya çıktığını kabul edenler oldukça fazladır. Bununla birlikte bu mutasyonların mekanizmaları tartışılmaya devam etmektedir. Kanserinde temelinde yatan çoklu mutasyonların birbirini izlemesi için özellikle genetik kararsızlığın gerekliliği vurgulanmıştır. Genetik kararsızlık neoplazi için gerekli olan karmaşık bir takım değişikliğin hücrede birikmesini hızlandırmaktadır (Lengauer ve ark. 1998; Sieber ve ark. 2005; Apeşos ve ark. 2008).

Hücresele DNA kimyasal, iyonizan radyasyon, ısı, tümör indükleyen virüsler, enzimatik hatalar vb. birçok kaynaktan gelen uyarıların etkisi altındadır. Ancak DNA da oluşan hasarların etkili onarımı ile genetik stabilite muhafaza edilir. Stabilite genleri genetik değişimleri minimuma indirir, şayet bu genler inaktive olurlarsa diğer genlerde daha yüksek oranlarda mutasyonlar meydana gelebilir (Elias 1998; Friedberg 2003). Mutasyonlardan potansiyel olarak bütün genler etkilenir; ancak sadece onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerindeki mutasyonlar net olarak hücre büyümesini ve bölünmesini etkileyerek mutant hücreye seçici bir çoğalma avantajı sağlayabilirler (Volgelstein ve Kinzler 2004).

## **2.2. Kolorektal Kanserler**

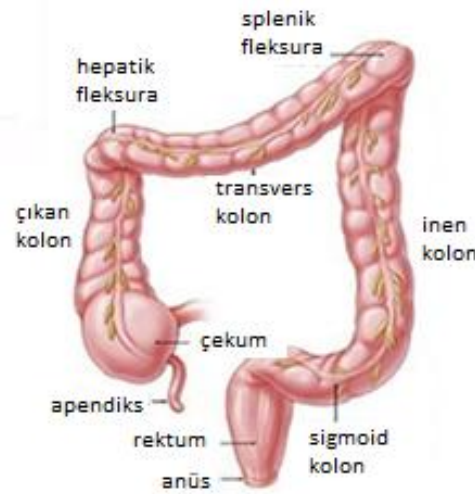
Kolon ve rektumun kanserlerine kolorektal kanserler denir. Kolon ve rektumu kaplayan epitelyum katmanından köken alırlar. Batı ülkelerinde en yaygın kanser tipleri arasındadır. Birleşik devletlerde her yıl yaklaşık 140.000 olgu rapor edilmekte ve toplam kanser ölümlerinin yaklaşık % 11'ini oluşturmaktadır (Cooper ve Hausman 2004; Alberts ve ark. 2008). T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı'nın istatistiklerine göre ülkemizde kolorektal kanserler, akciğer kanseri, meme kanseri ve mide kanserini takiben 4. sırada yer almaktadır. Ülkemizde kolorektal kanser sıklığı % 7,7'dir. Erkeklerde daha sık olmak üzere her iki cinsiyette de görülür. Hastaların % 59'u erkek, % 41'i kadındır. Erkek/Kadın oranı 1.44'dür. Erkeklerde kolorektal kanser, akciğer ve mide kanserlerinden sonra 3. sırada yer alırken, kadınlarda meme, deri, mide ve ovaryum kanserlerini takiben 5. sırada yer almaktadır. Kolorektal kanserlerin en sık görüldüğü yaş aralığı 50 -75'dir ve yaş ilerledikçe kanser riski yükselmektedir (Topuz ve Aykan 1998; Phalman ve ark. 1999).

### **2.2.1. Kolon ve Rektum Anatomisi**

Ortalama 150 cm uzunluğunda olan kalın barsaklar çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum bölümleri ile ince barsaklara bir çerçeve oluşturacak şekilde, anüse kadar uzanır. Duodenumun önünden geçen dikey bir planla sağ ve sol kolon olmak üzere ikiye ayrıldığı varsayılır. Sağ kolon; çekum, apendiks, çıkan kolon, fleksura hepatica ve transvers kolon başlangıcına kadar, sol kolon; transvers kolonun distali, splenik fleksura, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdan oluşur. Kalın barsağın başlangıcı ve en geniş yeri olan çekumun iç arka yüzüne ince barsağın ileum bölümü ve apendiks birer delik aracılığıyla açılmaktadırlar. İleumun distal ucu ile çekum arasındaki geçiş yerinde iki dudaklı bir kapakçık bulunur. Bu kapakçığa kolon kapakçığı veya ileoçekal valv denir. İleoçekal valv barsak dokusunun kendi üzerinde bir kez kıvrılmasıyla oluşmaktadır. Yapısındaki düz kaslar sfinkter görevini görür. İleoçekal valv, ince barsaktan kalın barsağa olan akışın daima tek yönlü olmasına katkıda bulunan önemli bir oluşumdur (Arıncı ve Elhan 2001; Drake ve ark. 2007) .

Kolon duvarının katları: mukoza, submukoza, sirküler kas tabakası, longitudinal kas tabakası ve serozadır. Başlıca fonksiyonunun içindeki muhtevanın suyunu emmek olan kalın barsaklar histolojik tabakalar açısından ince barsaklara

benzerler; ancak plika sirkularis ve villus içermemeleri ile farklıdır. Lümen çok sayıda goblet hücresi içeren tek katlı prizmatik epitelyum ile kaplıdır. Kolondan sonra gelen ve asıl görevi depolamak olan rektum anal kanalla devam eder ve dışarı açılır (Şekil 2.2.1) Anal kanalın iç ve dış olmak üzere 2 adet sfinkteri vardır. İç sfinkter istemsiz çalışan kaslardan oluşur ve açılması rektum içindeki basınca bağlıdır, dış sfinkter ise istemli olarak çalışan kaslardan oluşmaktadır (Arıncı ve Elhan 2001; Eşrefoğlu 2004; Gourley ve Gering 2005).



Şekil 2.2.1. Kolon ve rektumun yapısı (Drake ve ark. 2007).

### 2.2.2. Etiyoloji

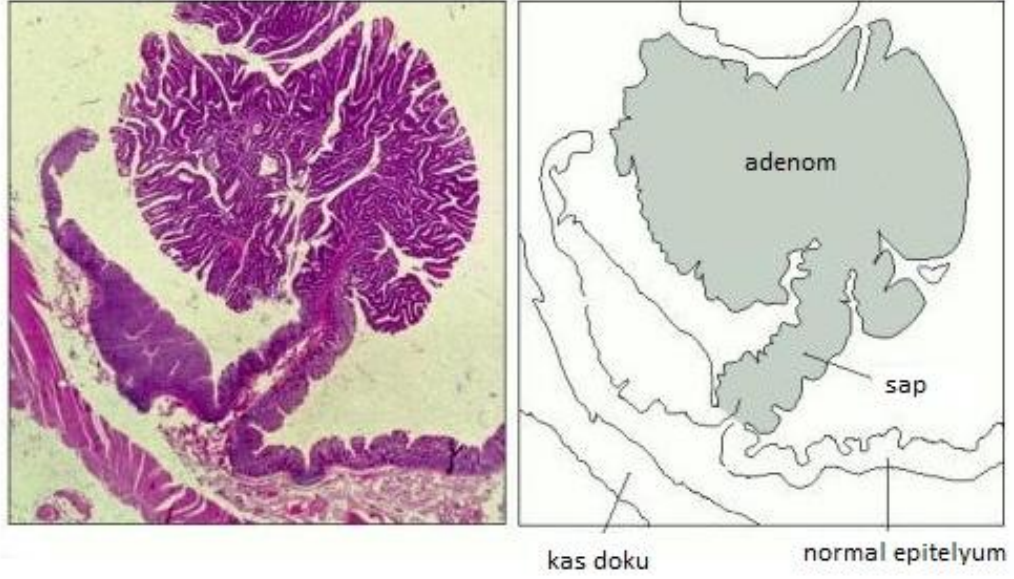
Günümüzde süregelen çalışmalara rağmen tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaya devam eden kolorektal kanserlerin etiyojisi kesin olarak bilinmemekte; ancak bazı faktörler suçlanmaktadır. Araştırmalar kolorektal kanserlerin kolonik mukozayı etkileyen genetik ve çevresel faktörlerin katkılarıyla gelişen multifaktöriyel bir hastalık olduğunu göstermiştir (Malazgirt 1996; Clinton ve ark. 1997; Le Marchand 1999; Sayek 2004; Landi ve ark. 2005).

Kanserlerin patogenezi hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve sağ kalımı gibi genel gereksinimlerin düzenlenmesi işlevlerinde anahtar görev üstlenen genlerin mutasyonlarından etkilenmekte ve hastalık çeşitli faktörler sonucu bir seri somatik mutasyonun birbirini izlemesiyle gelişmektedir (Ciani ve ark. 2003; Cooper ve Hausman 2004; Volgelstein ve Kinzler 2004; Stickle ve ark. 2005; Drake ve ark. 2007; Alberts ve ark. 2008; Wei ve ark. 2012).

### **2.2.3. Kolorektal Kanser Oluşumu**

Kolon kanserlerinin çoğu kalıtsal bir hastalık değildir. Diğer kanserler gibi, kolorektal kanserlerin de başlangıçta mutasyona uğrayan somatik bir hücreden kaynaklandığı ve bu hücrenin nesillerinin ilave mutasyonlarla genetik kararsızlık kazanarak kontrolsüz çoğalmaya başlamaları ile geliştiği düşünülmektedir. Genetik kararsızlık, neoplazi ve kötü huyluluk için gerekli olan karmaşık bir takım değişikliğin hücrede birikmesini hızlandırmaktadır (Alberts ve ark. 2008). Kanserin çok aşamalı bir süreç olduğunu gösteren davranışlardan biri de geç yaşlarda (%90'ı 55 yaşından sonra) ortaya çıkmasıdır. Çalışmalar, kolorektal kanserin görülme sıklığının 30 ila 50 yaşları arasında on kattan fazla, 50 ile 70 yaşları arasında bir on kat daha arttığını göstermektedir (Sonnenberg ve ark. 2000; Peto 2001; Cooper ve Hausman 2004).

Kolorektal kanser gelişiminin en erken aşamasında barsak epitelyum hücrelerinin çoğalma hızı artar ve çok aşamalı bu süreçte klonal seçilimle, daha hızlı çoğalan, daha baskın bir nitelik kazanırlar. Giderek bu hücrelerden polip adı verilen doku çıkıntıları şeklinde adenomlar ya da küçük iyi huylu tümörler oluşur. Bu adenomatöz poliplerin büyük çoğunluğunun kolorektal kanserlerin öncüleri olabileceğine inanılmaktadır. Çapı 1 cm'den daha küçük poliplerde, hücreler ve bunların epitelyum içindeki düzenlerinin bölgesel detayları genellikle bütünüyle normal gözükmemektedir. Polip büyüdükçe, farklılaşmamış görünen ve düzensiz yapılar oluşturan hücreleri içermeye başlamaktadır. Hastalığın gelişimi genellikle çok yavaş olup, gittikçe daha büyük ve hücre çoğalma hızı yüksek yeni adenomlar gelişmektedir (Şekil 2.2.2). Daha sonra tümör hücrelerinin epitelyum bazal laminasını geçerek altındaki bağ dokusuna ulaşmasıyla, benign adenomlardan malign karsinomların gelişimi izlenir. Çoğalmayı sürdüren bu hücreler, barsağı çevreleyen kas tabakası içinde de ilerleyerek, sonunda barsak duvarını aşar, karın boşluğundaki mesane, ince barsak ve karaciğer gibi diğer organlara yayılırlar. Aynı zamanda kan damarlarına ve lenf yollarına da giren kanser hücreleri, akciğer ve vücudun diğer bölgelerine de metastaz yapma olanağına kavuşarak istilacı hale gelmektedirler (Telatar ve Şimşek 1993; Cooper ve Hausman 2004; Vogelstein ve Kinzler 2004; Landi ve ark. 2005; Vescovi ve ark. 2006; Alberts ve ark. 2008).



Şekil 2.2.2. Tipik bir kolon kanserinde adenomun enine kesiti (Alberts ve ark. 2008)

#### **2.2.4. Kolorektal Kanserlerde Bazı Ortak Değişiklikler**

Kanserlerin çoğunda, hücrenin normal davranışını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz biçimde çoğalmaya neden olan bazı onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu kritik adımlar olarak tanımlanmıştır. Kolorektal kanserlerde p53, K-ras ve APC genlerinin sıklıkla mutasyona uğradığı saptanmış; ancak daha başka kritik görevleri olan genlerin belirlenmesinin gerekli olduğu vurgulanmıştır (Alberts ve ark. 2008).

Bunlardan biri de bizim çalışmamızda fonksiyonel rs779805 genetik varyasyonunu incelediğimiz von Hippel-Lindau (VHL) tümör baskılayıcı genidir. Yapılan bir çalışmada VHL ve p53 arasında ilginç bir bağlantı saptanmış; VHL proteininin Mdm2 aracılığı ile yıkımını önlediği stabilize p53 proteinine direkt bağlandığı ve hücre döngüsü regülasyonunda kritik bir rol aldığı rapor edilmiştir (Ohh 2006). Son yıllarda yoğun çalışmaların odağı olan tümör baskılayıcı p53 geninin hücre çoğalmasını kontrol eden, programlanmış hücre ölümünü düzenleyen ve tümör gelişimini baskılayan çok yönlü fonksiyonları araştırılmaktadır. Genetik bir taramada kolorektal kanserlerin yaklaşık % 60'ında p53 geninde delesyonlar ya da etkisizleştirici mutasyonlar bulunduğu bildirilmiştir (Alberts ve ark. 2008; Hupp ve ark. 2012; Li ve ark. 2012; Monti ve ark. 2012; Piccinin ve ark. 2012; Shen ve ark. 2012; Wei ve ark. 2012).



### **2.2.5. Genetik Faktörler**

Kolorektal kansere kalıtsal yatkınlık gösteren ender ailelerin izlenmesi kritik kanser genlerinin bulunmasında kullanılan yaklaşımlardan biridir. Bu yolla kolon kanserlerinin kalıtsal formları tanımlanmış ve kansere yatkınlık genlerinin kalıtılması ile kanser gelişme olasılığının ilişkisi araştırılmıştır. Aslında bilinen genlerin neden olduğu kanserlerin kalıtılması, tüm kanser olgularının sadece %5'ini oluşturan ender bir olaydır. Bunlar arasında en sık görülen kalıtsal kanser sendromu, barsak kanserlerinin %15'ini oluşturan kalıtımsal polipsiz barsak kanseridir. (Telatar ve Şimşek 1993; Cooper ve Hausman 2004; Akın 2009).

#### **2.2.5.1. Ailesel Adenomatöz Polipozis Koli (FAP)**

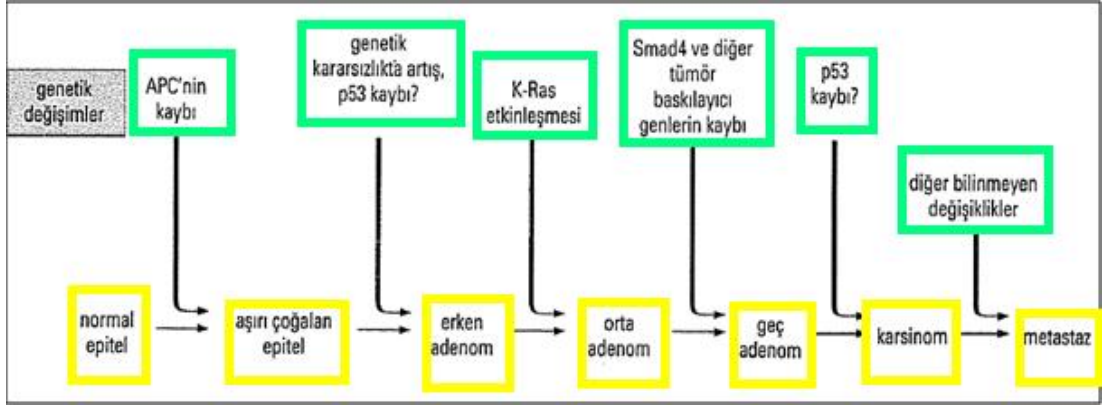
FAP'lı hastalarda 5. kromozomun uzun kolundaki bir delesyon (5q21) APC geninin tanınmasına neden olmuştur. Tümör baskılayıcı bir gen olan APC'nin delesyonu ya da etkisizleşmesi genetik testlerle izlenebilir. Otozomal dominant geçişli olan APC genine ait mutant bir allel etkilenmiş bir ebeveynden kalıtılabilir ve diğer allelde de somatik bir mutasyon oluşabilir; yani iki vuruş modeli (two-hit hipotezi) söz konusudur (Knudson 2002; Strate ve Syngal 2005).

FAP oldukça nadirdir, toplam kolon kanseri olgularının %1'inden daha azında görülürler. Riskli bireylerde, yüzlerce benign polip erken erişkin dönemde belirir ve eğer tedavi edilmezse bir ya da daha fazlasının kötü huylu hale gelmesi neredeyse kaçınılmazdır; ancak kanserin gelişmesi poliplerin ilk oluşumundan yaklaşık 12 yıl geçtikten sonra farkedilmektedir. Bu durum erken tanının ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Waxner ve ark. 1998; Akın 2009).

Genler ve işlevleri hakkındaki bilgilerimiz çoğaldıkça, bilinen kritik kanser genleri ile ilişkiye giren diğer genlerin etkileri araştırılmıştır. APC mutasyonları kalıtsal olmayan barsak karsinomlarında da sık görülmektedir ve APC proteininin, Wnt (Frizzled reseptörlerine bağlanan büyüme faktörleri protein ailesi) sinyal yolağının baskılayıcı bir bileşeni olduğu ilk olarak kolon kanser gelişim çalışmalarında tanımlanmıştır (Peifer ve Polakis 2000; Vogelstein ve Levine 2000). Bazı durumlarda Wnt sinyal yolağının aktifleşmesi APC geninde değil Wnt sinyal yolağının APC'den daha aşağıda yer alan  $\beta$ -katenini kodlayan gendeki mutasyonlardan kaynaklanabilir ve APC mutasyonu ile benzer sonuca neden olur. Normalde tümör baskılayıcı bir gen olan APC,  $\beta$ -katenine bağlanarak etkisini gösterir ve  $\beta$ -katenine bağlandığı zaman kolon epitelinde çoğalmayı uyaran gen

düzenleyici bir protein olan TCF4'ün etkinleşmesine engel olmaktadır. Böylece APC proteininin işlevsel olması ve  $\beta$ -katenine bağlanabilmesi ile hücre çoğalmasının kontrolü sağlanmaktadır. APC'nin bir allelinin mutant olarak ebeveylere genetik aktarımı ve diğerinin somatik mutasyonla etkisizleşmesi, yani APC geninin her iki kopyasında kayıp olması durumunda, Wnt sinyal yolunun bileşenleri olan tümör baskılayıcı genlerin kontrolü ortadan kalkar (Moon ve ark. 2004; Jin 2008; Donma ve Donma 2010). APC'nin inaktivasyonu barsak hücrelerinin anormal çoğalmasına ve çok sayıda adenom gelişerek, erken adenom dönemine geçilmesine neden olur. Yine çoğu barsak adenomunda, K-Ras ya da sinyal yolağında Ras'dan sonra görev alan raf onkogen ailesinin bir üyesi olan B-raf genlerinden birinin mutasyon sonucu aktifleşmesine de sık rastlanmaktadır (Tipale ve Beachy 2001; Alberts ve ark 2008).

Barsak kanserlerini etkileyen diğer sinyal yollarına bakıldığında hemen hepsinde TGF- $\beta$  sinyal yolağını etkileyen mutasyonlara rastlanır ve bu mutasyonlar erken evre adenomlarda görülür. Bazı durumlarda ise mutasyonlar TGF- $\beta$  reseptörünü kodlayan TBR11 tümör baskılayıcı geni inaktive eder. Diğer bir durumda kolon kanserlerinin belki %30'unda mutasyon sonucunda Smad2 ve Smad4 transkripsiyon faktörlerini kodlayan tümör baskılayıcı genler inaktifleşir. Orta ve geç dönem adenomlar ve adenokarsinomlarda kromozom 18q'da sıklıkla delesyon izlenmiş ve burada önemli bir tümör baskılayıcı genin olabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda Smad2 ve Smad4 genlerine yakın komşu olan bu gen DCC (deleted in colon cancer) olarak adlandırılmış ve kodladığı proteinin, hücre adezyon proteinleri ve hücre yüzey glikoprotein molekülleri ile homoloji gösterdiği bildirilmiştir (Cooper ve Hausman 2004; Strate ve Syngal 2005). Genellikle tümör gelişiminin daha geç bir aşamasında p53 tümör baskılayıcı genin inaktivasyonu ile geç dönem adenomlar gelişir ve tablo giderek ağırlaşır. Erken ve orta aşamalarda p53 işlev kaybı %20 civarındayken, geç dönem adenomlarda bu oran %30 olarak izlenmekte ve karsinomlarda %75'e çıkmaktadır. Çok basamaklı bu gelişimlerden hücre çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen farklı sinyal ileti yollarını etkileyen onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde biriken hasarlar sorumlu tutulmaktadır (Jin 2008; Büyükdoğan ve ark. 2009) Şekil 2.2.3'de verildiği gibi kolon kanserlerinde genellikle APC,  $\beta$ -katenin, K-Ras, Smad4 ve p53 mutasyonlarının farklı olgularda, farklı zamanlarda üst üste geliştiği hastalığın seyrini belirlemektedir (Strate ve Syngal 2005; Hupp ve ark. 2012; Shimomura ve ark. 2013).



Şekil 2.2.3. Kolorektal kanser gelişiminde öngürülen genetik değişimler (Alberts ve ark. 2008)

### 2.2.5.2. Kalıtsal Non-Polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC)

Kolon kanserinin ikinci ve yaygın kalıtsal formudur. Bunlarda kolon kanseri olasılığı kolorektal poliplerin sayısında artış olmaksızın yüksektir. Kanser oluşumuna yatkınlık sağlayan mutasyonların, DNA yanlış eşleme onarım sisteminin genlerinde meydana geldiği anlaşılmıştır. Bu genlerin en fazla mutasyon görülen bazıları MSH2, MLH1 ve MSH6 olup, bakteri ve mayalarda ayrıntılarıyla incelenmiş olan hatalı eşleme onarım sistemi mutL ve mutS genlerinin yapı ve işlevleri yönünden insandaki benzerleridirler. DNA yanlış eşleme hatalarını etkin olarak onaramayan hücrelerde genetik kararsızlık hızla artar; mutasyonların çoğu, özellikle tek nükleotid değişimi ile ya da tek ve iki nükleotid tekrarlarının uzaması veya kısalması şeklinde olup kromozom düzeyinde görülmeyen değişikliklerdir. HNPCC aslında en yaygın kalıtsal hastalıklardan biridir ve tüm kolorektal kanserlerin %15'inin nedenidir. Başlama yaşı ortalama 44'dür ve riskli bireyler 20 yaştan itibaren takip edilmelidir. DNA yanlış eşleme onarım genlerinde bulunan mutasyonlar sonucu hücrenin genetik kararsızlığı ve kötü huylu davranış kazanması her ne kadar kolon kanserinin en genel belirtisi ise de, etkilenmiş bireyler meme, uterus, over, pankreas ve ince barsak kanserleri dahil birçok kanser tipine yakalanma riski taşımaktadırlar (Cooper ve Hausman 2004; Alberts ve ark. 2008).

Tablo 2.2.1'de görüldüğü gibi kolorektal kanserde genetik kararsızlık birden fazla yolla ortaya çıkabilir (Alberts ve ark. 2008). Bazı durumlarda hücre çoğalmasını denetleyen genlerde ya da hücre içi sinyal ileti yollarını etkinleştiren veya inaktive eden farklı genlerdeki mutasyonlarla çeşitli yollardan gelişebilir. Başka bir durumda, kansere götüren ilk mutasyon DNA yanlış eşleme onarım genlerinde olabilir; diğer bir durumda ise problem, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın, gen

örüntü ifadesindeki epigenetik bir değişikliğe bağlı olabilir (Cooper ve Hausman 2004; Sayek 2004; Alberts ve ark. 2008).

Tablo 2.2.1. Kolorektal Kansere Hücresinde Bulunan Bazı Genetik Anomaliler.

GEN	SINIF	ETKİLENEN YOLAK	TÜMÖR (%)
K Ras	Onkogen	Tirozin kinaz reseptör sinyal iletimi	40
$\beta$ -Katenin	Onkogen	WNT sinyal iletimi	5-10
APC	Tümör baskılayıcı	WNT sinyal iletimi	>60
p53	Tümör baskılayıcı	Stres/genetik hasar cevabı	60
Smad4	Tümör baskılayıcı	TGF- $\beta$ sinyal iletimi	30
TGF- $\beta$ reseptörü II	Tümör baskılayıcı	TGF- $\beta$ sinyal iletimi	10
MLH1 ve diğer DNA yanlış eşleşme onarımı	Tümör baskılayıcı	DNA yanlış eşleşme onarımı	15

### 2.2.5.3. Gardner Sendromu

Otozomal dominant geçişli bu sendromda polipler esas olarak kolonda olmakla birlikte bütün kanal boyunca yaygın olabilir. Ailesel polipozise benzer olup, ortalama başlama yaşı 25'dir. Polip sayısı genellikle 100'den fazladır. Koruyucu cerrahi tedavi uygulanmayan hemen her hastada kanser gelişmektedir (Telatar ve Şimşek 1993; Navaratnam ve ark. 1999).

### 2.2.5.4. Turcot Sendromu

Ailesel polipozis kolu ile malign beyin tümörlerinin birlikte görülmesi ile karakterizedir. Beyin tümörlerinin, Ailesel polipozis kolu ve Gardner sendromunun ekstraintestinal belirtisi olarak geliştiği kabul edilmektedir (Telatar ve Şimşek 1993; Navaratnam ve ark. 1999; Sonnenberg ve ark. 2000).

### 2.2.6. Çevresel Faktörler

Kolorektal kanserlerde ırksal bir seçicilik olmayıp bölgesel risk faktörlerinden ve beslenme alışkanlıklarının etkilerinden söz edilmektedir. Özellikle sanayileşmiş ülkelerde ve şehirlerde yaşayanlarda daha fazla rastlanmasını, sosyoekonomik yaşam şekli, diyet ve kanserojen maddelerle daha fazla karşılaşma riski ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Yapılan bir karşılaştırmada 1950'lerde

mortalite oranı ABD’de yüksek Japonyada düşük iken, daha sonraki yıllarda Japonya’da batı tipi yaşam ve diyetle geçişe paralel olarak mortalite oranı ABD’ye yaklaşmıştır. Benzer karşılaştırmalar, göç eden toplulukların ev sahibi ülkenin tipik kanser görülme sıklığına uyum gösterme eğilimi, yöresel farklılıkların çevresel etmenlere bağlı gibi görüldüğünü düşündürmektedir. Bu veriler ışığında, kanserin %80-90’ının kaçınılabilir ya da en azından geciktirilebilir olduğu tahmin edilmektedir (Telatar ve Şimşek 1993; Malazgirt 1996; Kalaycı 2002; Alberts ve ark. 2008).

Diyetteki lifli gıdaların miktarı, beslenmedeki protein ve yağın tipi ile miktarı, barsak florasında beslenmeye bağlı olarak oluşan değişiklikler kanser patogeneğinde yer alan önemli unsurlardır. Şişmanlık, aşırı yağlı diyet, hazır gıdalar risk faktörleri arasındadır. Tütsülenmiş ve kızarmış yiyeceklerin diyetle fazla bulunması halinde barsaklarda yüksek oranda safra asitleri ve bunların metabolitleri teşekkül eder. Aslında karsinogen olmayan bu metabolitlerin karsinogenesiz uyarıcı rol oynayabileceği düşünülmektedir. Pişirme yöntemine bağlı olarak oluşan heterosiklik aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, gıda koruyucu nitrit, nitrat ve benzeri bileşiklerin meme ve kolorektal kanser riskini artırabileceği savunulmuştur (Malazgirt 1996; Rock 1998; Akın 2009).

Hayvansal yağ ve proteinden fakir, liften zengin fazla posa bırakan diyetle beslenen kimselerde kolorektal kanser gelişme insidansı daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeni posalı diyetin barsak pasaj zamanını kısaltarak, mukozanın karsinogenik maddelerle temas süresini azaltmasıdır (Romolo 1996). Yine diyetle bulunan kalsiyumun barsak lümenindeki iyonize yağ ve safra asitlerini bağlayarak suda erimeyen bileşikler haline çevirmek suretiyle kolorektal kanser gelişimini önleyebileceği ileri sürülmüştür (Telatar ve Şimşek 1993; Sayek 2004).

Büyükdoğan ve ark. (2009), besinlere bulaşabilen mutajenleri, yiyecek katkı maddelerini, havadan inhalasyonla ya da deriden absorpsiyonla vücuda giren endüstriyel maddeleri, endojen kaynaklı prostaglandin, yağ asitleri, steroidler gibi bileşikleri metabolize eden mikrozomal enzim sistemini kodlayan sitokrom p450 gen polimorfizmleri ile kolorektal kanser arasındaki ilişkiyi araştırmış ve çevresel faktörlerin önemini ortaya koyan bir sonuçla karşılaşmışlardır. Hasta grubunda beyaz toprağa (asbest) maruz kalanların oranı kontrol grubundan istatistiksel anlamda fazla bulunmuştur. Bu hastalar, toprakla ilgili işlerle uğraştıklarını, evlerinin yapısı veya sıvasında beyaz toprak kullandıklarını ifade etmişlerdir. Beyaz toprağın kolorektal

kanser için bir risk faktörü olabileceğini gösteren bu bulgu çevremizde başka hangi etkenlerin sorumlu olabileceğini düşünmemizi sağlamaktadır. Kuşkusuz olguların çoğunda özel çevresel risk faktörlerini belirlemek ya da bunların nasıl etkilediğini saptamak oldukça zordur. Kolorektal kanserlerin FAP ve HNPCC gibi familial özellik gösteren %15'i dışında kalan büyük çoğunluğunun sporadik ortaya çıktığı bilinmekte ve etiyolojilerini belirlemek için çalışmalar devam etmektedir (Nussbaum ve ark. 2005; Strate ve Syngal 2005).

Biz de yaptığımız bu tez çalışmasında, hücre için önemli bir mikro-çevresel faktör olan oksijenin varlığında ve çeşitli nedenlerle oksijensiz kaldığında hücrel metabolizmayı düzenleyen mekanizmaları anlamaya çalıştık. Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) geninde tanımlanan C1772T ve G1790A oksijen bağlama bölgelerinin gen polimorfizmleri ile normal oksijen konsantrasyonunda HIF-1 $\alpha$  proteininin sitozolde yıkımını sağlayan von Hippel-Lindau (VHL) olarak adlandırılan tümör baskılayıcı gende fonksiyonel rs779805 gen polimorfizminin kolorektal kanser riskine etkisini incelemeyi planladık

HIF-1 $\alpha$ , hipoksiye cevap genlerinin en önemli transkripsiyon regülatörüdür. HIF-1 $\alpha$  proteini normokside prolin hidroksilaz ile hidroksillenip E3 ubiquitin ligazın bir bileşeni olan VHL proteinine bağlanarak proteozomal yıkıma uğrarken, hipokside stabil hale gelmektedir. Çalışmalar hücrelerde, azalan oksijen konsantrasyonunun sitoplazmada HIF-1 $\alpha$  proteininin birikmesine ve stabil hale gelmesine yol açtığını ortaya koymuştur (Hebestreit ve ark. 2001; Jaakkola ve ark 2001; Liu ve ark. 2004; Semenza 2008; Konac ve ark. 2009; Hsiao ve ark. 2010; Illingworth ve ark. 2010; Knechtel ve ark. 2010). Stabilize HIF-1 $\alpha$  proteini, MAP kinaz tarafından fosforillenir, sitoplazmadan nükleusa geçerek HIF-1 $\beta$  ile bağlanır. HIF-1 $\alpha$  ile HIF-1 $\beta$  heterodimeri hedef genlerin transkripsiyonunu başlatarak anaerobik enerji metabolizması, anjiyogenez ve hücrel adaptasyonda anahtar rol oynar (Maxwell ve ark. 1999; Liu ve ark. 2004; Jaakkola ve ark. 2006; Domene ve Illingworth 2012).

Hipoksiye cevap yolunda ciddi görevleri olan VHL ve HIF-1 $\alpha$  genlerinde oluşan mutasyonlar VHL proteininin HIF-1 $\alpha$ 'ya bağlanma düzeyini etkileyebilir. VHL'nin HIF-1 $\alpha$ 'ya zayıf bağlanmasının klinik yansıması kanser ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Ke ve Costa 2006; Illingworth ve ark. 2010; Domene ve Illingworth 2012). Çeşitli kanser çalışmalarında VHL gen polimorfizmlerine bağlı olarak HIF-1 $\alpha$  proteininin sitoplazmada arttığı ve nükleusa

transaktivasyonu gösterilmiştir (Liu ve ark. 2002; Safran ve Kaelin 2003; Jaakkola ve ark. 2006; Shieh ve ark. 2010).

Liu ve ark. (2004), VHL 598C-T mutasyonunu taşıyan hipoksiye duyarlı homozigotlarda ilk konjenital defekt olarak polisitemi (eritrositoz) tespit ettiklerini ve rs779805 genetik varyasyonunun da fonksiyonel olduğunu bildirmişlerdir.

Kuwai ve arkadaşları (2004), tarafından yapılan bir çalışmada HIF-1 $\alpha$  yıkımında rol alan tümör baskılayıcı gen VHL varyasyonları araştırılarak, HIF-1 $\alpha$  proteininin sitoplazmadaki ekspresyon düzeyi ile ilişkilendirilmiş ve VHL mutasyonu bulunan 10 tümör olgusundan 5'inde HIF1 $\alpha$  proteininin yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir.

### ***2.2.7. İltihabi Barsak Hastalıkları***

Kolorektal mukozanın prekanseröz hastalıkları arasında özellikle ülseratif kolit ve crohn hastalığı bulunmaktadır. Etiyolojileri tam olarak bilinmeyen iltihabi barsak hastalıklarında özellikle ülseratif kolitlerde, kolorektal kanser riski hastalığın süresi ile paralel olarak artış gösterir. Mukozada yaygın ülserler ve psödopolipoid lezyonlar ile mukozal atrofinin görülmeye başladığı yüzey epitelyumunda erken yassı adenom tipinde displazik hücresel değişikliklerin başlaması uzun yıllar içinde olur. Bu tür vakalarda ilk 10 yılda % 3-5, ikinci 10 yılda % 20'ye kadar yükselen malign dejenerasyon gelişmektedir (Telatar ve Şimşek 1993; Topuz ve Aykan 1998).

### ***2.2.8. Kolorektal Polipler ve Polipozis Sendromları***

Polip terimi barsak lümenine yerleşen herhangi bir epitelyal lezyona verilen isimdir. Polip klinik ve endoskopik bir tanımdır, önemli olan polibin histolojik tipidir. Kolorektal polipler olduğu mukozaya bir uzantı ile bağlı olabilir (saplı polip) ya da geniş bir taban ile mukoza üzerine oturabilirler. Poliplerde büyüme veya ülserasyon gözleendiğinde malignite yönünden değişim akla getirilmelidir. Çok sayıda ve yaygın olduklarında polipozis olarak isimlendirilirler. Poliplerden bazıları kaçınılmaz biçimde kansere dönüşme eğilimindedir; geç kalınan ve koruyucu cerrahi tedavi uygulanmayan hemen her hastada kanser gelişir. Kesin tanı histopatolojik inceleme sonucu yapılır (Kalaycı 2002; Drake ve ark. 2007).

### **2.2.9. Kolorektal Tümörlerin Sınıflandırılması**

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflamasına göre kolorektal kanserler mikroskopik görüntüde grade I (iyi diferansiye), grade II (orta derecede diferansiye), grade III (az diferansiye) olarak tanımlanırlar. Histopatolojik açıdan da şu başlıklar altında incelenmektedir: Epitelyal tümörler (en sık görülen), endokrin tümörler, epitelyal dışı tümörler, malign lenfomalar ve sekonder tümörler olarak sınıflandırılırlar. (Kalaycı 2002; Drake ve ark. 2007).

Kolorektal kanserlerin komşu dokulara ve diğer organlara yayılımı; direkt yayılım, lenfatik yayılım, hematojen yayılım gibi yollarla olmaktadır. En sık yayılımı lenfatik sistemledir. Barsak duvarındaki invazyonu tam kata ulaşmış olan hastaların %50'sinde lenf bezi metastazı saptanmaktadır. Hematojen yayılım karsinom hücrelerinin kan dolaşımına geçmesi ile olur. En sık karaciğere, ikinci sıklıkta akciğere az olarak kemik ve beyine metastaz görülür (Telatar ve Şimşek 1993; Topuz ve Aykan 1998; Strate ve Syngal 2005).

### **2.2.10. Kolorektal Kanserlerde Evreleme**

Kolorektal kanserlerde ilk kez patolojik evreleme Cuthbert Dukes tarafından 1929 yılında yapılmıştır. Kanserinin direkt yayılımı ve lenfatik tutulumuna dayanan bu sınıflandırma 1954 yılında Astler-Coller'in tümör derinliğinin önemine vurgu yapmasıyla, Dukes sisteminin modifiye şekli geliştirilmiştir. Bu sistem prognozla ilgili olup sürvi ile lokal tümör derinliği, yayılımı ve nodal metastaz arasında ilişki kurmaktadır. Kolorektal kanserlerin tedavilerinin düzenlenmesi ve prognozlarının belirlenmesi amacıyla histolojisi, makroskopisi, uzak ve yakın metastaz kriterleri dikkate alınarak evrelendirmeler yapılmıştır. Günümüzde American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından yapılan TNM evrelemesi kullanılmaktadır (Akın 2009).

#### **TNM Evrelemesi (Akın 2009)**

##### T-Primer Tümör:

Tx- Primer tümör bilinmeyen.

T0- Primer tümörü olmayan.

Tis- in situ karsinoma.

T1- Tümör mukoza ve submukozadadır.



T2- Tümör muskularis propriadadır.

T3- Tümör tüm barsak duvarını tutmuştur.

T4- Tümör serozayı aşmış çevre dokuları tutmuştur.

N-Bölgesel Lenf Nodu Tutulumu:

Nx- İlgili veri yok.

N0- Lenf nodu metastazı yok.

N1- Perikolik veya perirektal 1-4 lenf nodu metastazı.

N2- Perikolik veya perirektal 5 ve daha fazla lenf nodu metastazı.

N3- Damar boyunca lenf nodu metastazı.

M-Uzak Metastaz:

Mx- Uzak metastaz hakkında bilgi yok.

M0- Uzak metastaz yok.

M1- Uzak metastaz var.

Dukes Evrelemesi: Kolon duvarı katları ve mezenter lenf nodları yayılımı gözönüne alınarak yapılan evrelendirme (Akın 2009).

Astler-Coller Modifikasyonu: Bu sistemle tümör derinliği, yayılımı ve metastaz özellikleri arasında ilişki kurulmaktadır. Dukes sınıflamasının modifikasyonu ile yapılmıştır (Akın 2009).

Stage A: Mukozada sınırlı tümör.

Stage B1: Lenf nodu metastazı olmadan muskularis propriaya kadar tümör tutulumu.

Stage B2: Lenf nodu metastazı olmadan barsak duvarını aşan tümör tutulumu.

Stage C1: Barsak duvarını aşmamış tümör ile beraber lenf nodu metastazı.

Stage C2: Barsak duvarını aşmış tümör ile beraber lenf nodu metastazı.

Stage D: Uzak organ metastazı.

Tablo 2.2.2'de verilen evreleme kriterlerine göre; kolorektal kanserlerde yayılımı belirlemek, sağkalım süresini tahmin etmek, tedaviyi planlamak, farklı merkezlerdeki hastaların tedavilerini karşılaştırmak ve takip etmek mümkündür.

Tablo 2.2.2. Kolorektal Kanserde Evreleme (Akın 2009).

EVRE	TNM	DUKES	ASTLER-COLLER
I	T1N0M0	A	A
	T2N0M0		B1
II A	T3N0M0	B	B2
II B	T4N0M0	B	B3
III A	T1-2N1M0	C	C1
III B	T3-4N1M0	C	C2/C3
III C	T1-4N2M0	C	C1/C2/C3
IV	T1-4N1-2M1	-	D

### 2.2.11. Yüksek Risk Grupları

Kolorektal kanser öyküsü olanlarda (daha önce opere edilmiş), kolorektal adenomu olanlarda, famiyal polipozisi olanlarda, ailede kanser öyküsü olanlarda (birinci derece akrabalarında en az iki kolorektal kanser öyküsü), ya da birinci derece akrabalarda 50 yaş öncesinde kolorektal kanser olanlarda, meme, over ve endometrium kanser öyküsü olan ve radyoterapi almış olanlarda, iltihabi barsak hastalığı veya ülseratif koliti olanlarda kolorektal kanser riski artmıştır. Aslında kolondaki tüm adenomların malign potansiyelleri vardır ve bir adenomun malign potansiyeli büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Çapları 2 cm'den büyük olanlarda kanser riski %20'ye kadar çıkmaktadır. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre biraz daha fazla iken kadınlarda mortalite oranı daha yüksektir (Telatar ve Şimşek. 1993; Topuz ve Aykan. 1998; Rovera ve ark. 2007; Akın 2009).

### 2.2.12. Semptom ve Belirtiler

Kolorektal kanserli hastalarda en yaygın klinik bulgular dışkılama alışkanlığının değişmesi, rektal kanama, rektal akıntı şeklinde veya dışkıyla karışık mukus sekresyonu, dışkının özelliklerinde ve çapında değişiklik, karın ağrısı, anorektal ağrı, yaş ve kötü kokulu gaz, halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı ve anemidir. Hastalarda ayrıca defekasyon sonrası rahatlayamama (tenesmus) ve sık defekasyon şikayeti olabilir. Bu bulgular tümörün lokalizasyonu ve hastalığın evresi ile değişiklikler göstermektedir (Topuz ve Aykan 1998; Kalaycı 2002; Akın 2009).

### **2.2.13. Kolorektal Kanserlerde Tanı Teknikleri**

Laboratuvar tetkikleri: Kan sayımı, karaciğer fonksiyon testleri, dışkıda gizli kan, CRP (C-reaktif protein) ve özellikle CEA (karsino embriyonik antijen) gibi tümör belirteçleri bakılır. Kolorektal karsinomlar için CEA, CA 19-9, CA 72-4, CA 242; TPA (tissue polypeptide antigen) ve TPS (tissue polypeptide specific antigen) testleri belirleyici olmaktadır. TPA ve TPS tümör hücrelerinin S fazı DNA'sını dolayısıyla poliferasyon hızını gösterir. Serum CEA düzeyi primer tümörün tanısı ve nükslerin saptanmasında yaygın kullanılır. Adenomatöz polipi olanların takibinde CEA seviyesinin yükselmesi %80-90 nüks olasılığını akla getirebilir; ancak kesin tanı için bunların hiçbiri tek başına yeterli değildir (Topuz ve Aykan 1998; Wojciechowics ve ark. 1999).

Genetik testler: Kolorektal kanserde rol aldığı bilinen gen mutasyonlarına, delesyon, anöploidi gibi sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerine bakılır. HNPCC'li olgulara, Bethesda kriterlerine göre düzenlenmiş MSI (mikrosatellit instabilite) testi ile başlayan bir seri test stratejisi önerilmektedir. FAP'da, öncelikle hastalığın nedeni olan APC tek gen mutasyonuna bakılır, test pozitif sonuçlanırsa diğer aile üyelerine tarama testi uygulanarak etkilenen bireyler hastalık gelişmeden evvel bilgilendirilir ve gerekli önlemler alınır (Strate ve Syngal 2005).

Kolonoskopi: Kolon ve rektumun içi fiber-optik bir aygıtla görüntülenir; biyopsi alma, tanıyı doğrulama ve gerektiğinde tedaviyi aynı anda gerçekleştirme olanağı sağlar (Waxner ve ark. 1998).

Sigmoidoskopi: Çift kontrastlı baryumlu kolon grafisi ile birlikte yapılırsa kolonoskopiye alternatif olabilir (Waxner ve ark. 1998).

Endoskopik İnceleme: Endoskopik tetkik öncesi iyi bir bağırsak temizliği yapılması şarttır. Endoskopi ile direkt tanı ve inceleme için biyopsi alınabilir.

Ultrasonografi: Karaciğer metastazlarının saptanmasında ve rektum tümörlerinin evrelendirilmesinde kullanılmaktadır.

Bilgisayarlı Tomografi: Karaciğer, over, lenf nodu ve pelvis gibi organlardaki metastazları gösterir. Anjiyografi ile birlikte yapıldığı durumlarda karaciğerdeki metastazları saptama oranı % 95'lere ulaşmaktadır (Scrock 1996; Kalaycı 2002).

Pozitron Emisyon Tomografisi: Pelvisteki nüks tümör ile fibröz dokuyu ayırt etmede kullanılır. (Kodner ve ark. 1994).

#### **2.2.14. Tedavi ve İzlem**

Kalıtısal yatkınlık ve çevresel faktörlerin rol aldığı kolorektal kanserlerde, yoğun çalışmalara rağmen bireylerin kanserden korunması henüz tam olarak çözümlenebilmiş değildir. Bu nedenle günümüzde, premalign ve erken neoplastik lezyonların orta ve yüksek risk gruplarında tarama yöntemleri uygulanarak kanserin erken tanı ve tedavileri önerilmekte ve bu yolla prognoz belirgin şekilde iyileştirilebilmektedir (Kalaycı 2002; Akın 2009).

Polipler genellikle semptomsuzdur; tanı almaları demir eksikliği anemisi, kilo kaybı gibi sağlık ya da kanser taramaları sırasında olur. Tamamen semptomsuz kişilerde istendiğinde lezyonların tanısı gaitada gizli kan araştırılması, sigmoidoskopi kolonoskopi ve kolon grafisi gibi yöntemlerle yapılabilir.

Bütün toplumlarda kolorektal kanser gelişme riski 40 yaşından sonra belirgin olarak artmaktadır ve olguların % 90'dan fazlası 50 yaşın üzerindedir. Böylece ileri yaşın, kolon kanseri gelişimi yönünden orta dereceli bir risk faktörü olduğu vurgulanmaktadır. Asemptomatik olanların 50 yaştan sonra yılda bir dışkıda gizli kan, 5 yılda bir sigmoidoskopi, 5-10 yılda bir kolon grafisi, 10 yılda bir kolonoskopi yaptırmaları önerilmektedir (Sonnenberg ve ark. 2000).

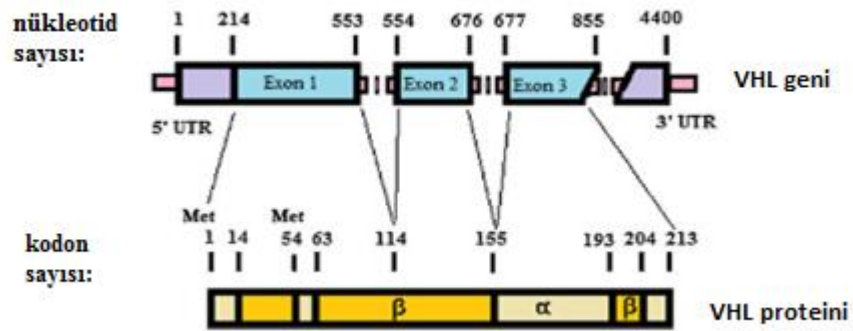
Yüksek risk grupları; tek birinci derece akrabada kolorektal kanser bulunması ile risk 1.7 kat artmakta ya da iki etkilenmiş birinci derece akrabalarındaki 55 yaşından önceki indeks olgu teşhisinde ise daha yüksek risk oluşmaktadır. İnflamatuvar barsak hastalığı olanlarda kanser riskinin hastalık süresiyle orantılı olarak arttığı bildirilmekte ve yüksek risk gruplarında kolonoskopinin 2 yılda bir yapılması önerilmektedir (Telatar ve Şimşek 1993; Akın 2009; Knechtel ve ark. 2010).

Kolorektal kanserler, nispeten yavaş büyüyen neoplazmalar olduğundan tarama yöntemleri ve erken tanı ile prekanseröz lezyonların çıkarılması sonucu kanser oranı önemli oranda azaltılabilmektedir. Kolorektal kanserlerin temel tedavisi cerrahi rezeksiyondur. Kanserli kolon segmenti mezosu ve tutulmuş lenf nodları, varsa invaze etmiş komşu organlarla birlikte operasyon ile çıkarılır. Hastaya gereken yardımcı tedavi verildikten sonra önerilen sıklıkta kolonoskopi, gaitada gizli kan ve CEA düzeylerinin bakılması ile dikkatli izlem uygulanması gerekmektedir (Telatar ve Şimşek 1993; Kalaycı 2002; Akın 2009).

### 2.3. Bir Tümör Baskılayıcı Gen Olan von Hippel-Lindau (VHL)

#### 2.3.1. İnsan VHL Geni ve Proteinleri

İnsanlarda tümör baskılayıcı bir gen olan VHL kromozom 3'ün kısa kolunda lokalize (3p25-26) 3 ekzonlu bir gendir (Şekil 2.3.1). VHL gen promotörünün transkripsiyon faktörleri için pek çok bağlanma yerlerine sahip olduğu öngörülmekte, VHL ekspresyonunun nasıl kontrol edildiği açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu genin kodladığı 4-7 kb uzunluğundaki mRNA'dan, translasyon kodon başlangıç tarafına bağlı olarak, bilinen herhangi bir proteine benzemeyen farklı büyüklükte iki protein sentezlenir. Bunlardan biri 30 kDa moleküler ağırlıklı bir protein olup VHL<sub>30</sub> diye adlandırılır. Diğeri alternatif translasyonla sentezlenen yaklaşık 18-19 kDa'luk daha kısa bir VHL<sub>19</sub> proteinidir. Her iki molekül de tümör baskılayıcı aktiviteyi sağlar ve VHL terimi jenerik olarak benzer fonksiyona sahip olmalarından dolayı her iki izoform için de kullanılır (Duan ve ark. 1995; Kim ve Kaelin 2004).



Şekil 2.3.1. VHL gen yapısı ve protein domeynleri. VHL protein ürünü 3p25-26 kromozomunda konumlanmış 3 ekson tarafından kodlanır. Translasyon, kodon başlangıç tarafına bağlı olarak biri 213, diğeri 160 aminoasitlik iki protein oluşur. VHL proteini yapısal olarak bir α ve bir β domeyni olarak ayrılabilir (Arjumand ve Sultana 2012).

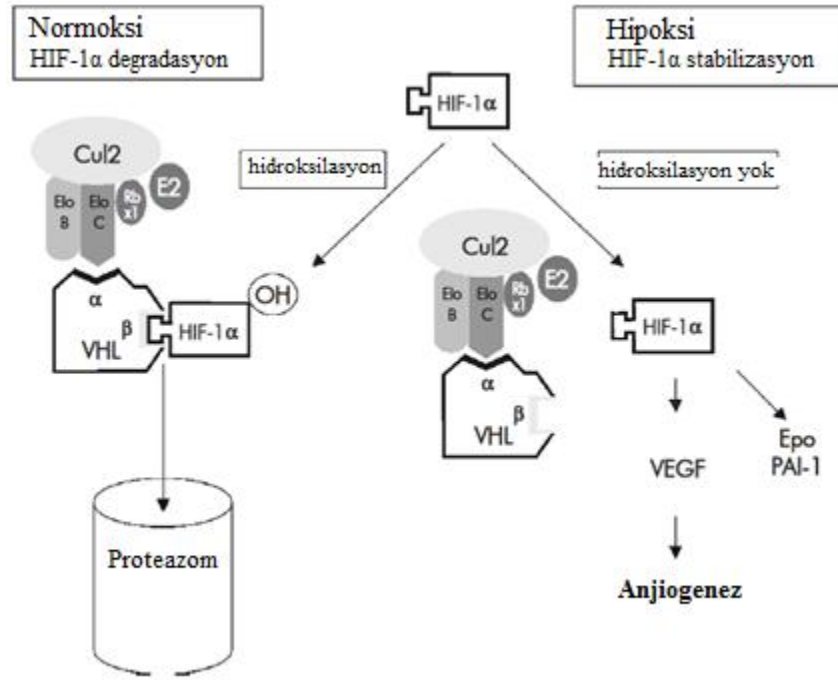
#### 2.3.2. VHL Proteininin İşlevleri

VHL gen ürünü olan VHL proteini birçok hücre proteini ile etkileşir; anjiyogenezin kontrolünde, ekstrasellüler matriksin formasyonunda, hücre metabolizmasında ve mitogenezde rol alır (Iliopoulos ve ark. 1996; Zatyka ve ark. 2002; Kaelin 2005; Chen ve ark. 2012). Bunun yanı sıra, VHL proteininin en iyi tanımlanmış fonksiyonu substrat tanıyıcı olarak bir E3 ubiquitin ligaz kompleksinde yer almasıdır. HIF aktivitesinin başlıca regülatörü olan bu kompleks normoksik koşullarda, HIF'in HIF-1α alt birimini hedefleyerek, ubiquitinasyon yoluyla HIF-1α'nın hızlı protozomal degradasyonunu sağlar (Kim ve Kaelin 2004; Kaelin 2007b;

Haase 2009; Altıntaş ve ark. 2011). Şekil 2.3.2’de görüldüğü gibi bu olgu aşağıdaki yolla gerçekleşir; oksijen varlığında HIF-1 $\alpha$ ’nın hidroksilasyonu ile etkinleşen VHL proteini fonksiyonel hedefi olan iki regülatör altyapıya, Elongin C ve Elongin B’ye bağlanır ve bağlantı sonrası Cul2 diye adlandırılan dördüncü bir proteinle etkileşir (Zimmer ve ark. 2004; Aso ve ark. 1995; Kibel ve ark. 1995; Kinshasa ve ark. 1995). Bu VHL/elonginCB/Cul2 kompleksi Rbx1 denilen bir proteinle daha etkileşerek poliubikütinasyon için uygun bir hedef oluşur (Şekil 2.3.2). Yapıya eklenen bu enzimler genellikle ubikütin ligazlar (E2, E3 kompleksleri) olarak bilinir ve böylece oluşan poliubikütin kuyruğu yıkıma uğrayacak substrata bir sinyal ya da flama hizmeti yaparak intrasellüler yıkım için hedef proteinle bağlanırlar (Maina ve ark. 2005; Maynard ve Ohh 2005). Bu süreçte tahrip etme olgusu protein parçalayıcı kompleks (proteazom) içerisinde proteazlarla gerçekleşir (Ohh ve ark. 1998). Hipoksik koşullarda HIF-1 $\alpha$  hidroksillenemez, hidroksillenemeyen HIF-1 $\alpha$  yıkım için VHL proteinine bağlanamaz ve birikir. Bu durumlarda yıkılamayarak stabil hale gelen HIF-1 $\alpha$  alt ünitesinin nükleusa geçtiği, HIF’in diğer alt ünitesi HIF- $\beta$  ile birleşerek özel DNA sekanslarına bağlandığı, VEGF ve Epo gibi bir takım hedef genlerin aktivasyonları aracılığı ile VHL/HIF-1 $\alpha$  yolağının tümör ilerlemesi ve metastazında özel bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Semenza 2003; Hes ve ark. 2005; Vaupel ve ark. 2007).

Hücrelerde VHL’nin yetersiz olması durumlarında, oksijen varlığında da, HIF-1 $\alpha$  alt ünitelerinin yıkımının olmadığı yolunda yayınlar vardır. Bu veriler VHL defektli hücrelerde HIF’in hedef gen ifadelerinin bir izahını oluşturmaktadır (Duan ve ark. 1995; Maxwell ve ark. 1999; Cockman ve ark. 2000; Zatyka ve ark. 2002; Kim ve Kaelin 2004; Hes ve ark. 2005; Kaelin 2007a; Kaelin 2007b; Bahig ve ark. 2008; Altıntaş ve ark. 2011; Arjumand ve Sultana 2012). VHL hastalıklarında VHL’nin elongin B ve C’ye bağlandığı yerlerinin sıklıkla mutasyona uğradıkları gösterilmiştir (Duan ve ark. 1995; Kibel ve ark 1995; Maxwell 2005). VHL’de oluşan bu değişimler nedeniyle hipoksiyle-indüklenebilir proteinler uygun şekilde yıkılamaz, birikir ve stabil hale gelerek HIF tarafından regüle edilen hedef genleri indükleyebilir ve yeni kan damarları oluşabilirler (Maxwell ve ark. 1999). Böylece VHL yetersizliğinde, HIF degradasyonu bozulur ve hücreler oksijensizmiş gibi davranabilirler. Bu durumun, solid tümörlerin damarlanmasını ve gelişimini kolaylaştırarak tümör büyümesine ciddi olanaklar sağladığı gösterilmiştir (Hes ve

ark. 2005; Maxwell 2005; Michelle ve ark. 2008; Arjumand ve Sultana 2012; Domene ve Illingworth 2012).



Şekil 2.3.2. HIF-1 $\alpha$  nın VHL ve oksijen bağımlı ubikütinasyonu. VHL proteini alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) olmak üzere fonksiyonel iki domeyn içerir. VHL proteininin  $\alpha$  domeyni Elongin C ye bağlanır, o da Cul2, Rbx1 ve E2 multi- protein kompleksi içinde yer alan Elongin B ye bağlanır. VHL- $\beta$  domeyni ise direkt olarak HIF-1 $\alpha$  ya bağlanır ve böylece VHL proteini, oksijen miktarına bağlı olarak, hidroksillenmiş HIF-1 $\alpha$ 'nın proteazomlarda yıkımını sağlar (sol taraf). Hipoksik koşullarda HIF-1 $\alpha$  hidroksillenmez. Hidroksillenmemiş HIF-1 $\alpha$  VHL proteinine bağlanamaz ve birikir. Yıkılamayan ve stabilleşen HIF-1 $\alpha$  tarafından regüle edilen VEGF ve Epo benzeri genlerin ekspresyonu artarak anjiogenezis ve tümör büyümesine yol açılmış olur (Hes ve ark 2005).

### 2.3.3. VHL Hastalıklarının Genetik Mekanizmaları

Azalmış oksijene adaptasyon, yaşayan bütün organizmalar için temel bir gereksinimdir. Moleküler seviyede, hipoksiye karşı bu adaptasyonda Epo ve VEGF gibi hipoksi cevap genleri görev alırlar. Burada Epo kanda taşınan oksijen kapasitesini artırırken, VEGF kan akımını artırır. Vasküler permabilite faktörü olarak da bilinen VEGF in vitro ve in vivo olarak hipoksi tarafından regüle edilen etkili bir anjiogenik faktör olarak denenmiş, birçok tümör hücre yollarının gereğinden çok VEGF ürettikleri gösterilmiştir (Leung ve ark. 1989; Levy ve ark. 1997). Yeni kan damarlarının oluşumu veya anjiogenezis de hücre ve doku hipoksisi için diğer bir

adaptasyon cevabıdır (Shweiki ve ark 1992; Kaelin 2005). Diğer bir söylemle tümör büyümesi için gerekli tümör anjiyogenezisi hipoksiye bir cevap olarak tanımlanır. Solid tümör büyümesi, tümör içinde anjiyogenezis oluşumuna bağlıdır ki bu da VEGF gibi büyüme faktörleriyle sağlanır. Damarlanma, tümöre oksijen ve gıda sağlarken metastaz oluşmasını da dolaşım sistemi yoluyla kolaylaştırmaktadır (White ve ark. 1995; Levy ve ark. 1997).

#### **2.3.4. Epigenetik Mekanizmalar ve Promotör Hipermetilasyonu**

Dominant etkili tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunda, bazı durumlarda genetik ve epigenetik mekanizmalar paralel etki yapabilirler; deneysel olarak mutasyonel ve epigenetik bir kombinasyonla her iki allelde de inaktivasyon meydana gelebileceği doğrulanmıştır (Jones ve Laird 1999; Jones ve Baylin 2002; Arima ve ark. 2005; Moore ve ark. 2011). Kanserin temelde genetik bir hastalık olduğuna dayalı halen yapılmakta olan çalışmalara ek olarak, elde edilen veriler epigenetik olayların da önemli katkıları olduğunu ortaya koymaktadır (Baylin ve ark. 2000; Robertson 2005). Kalıtsal modifikasyonların DNA yapısındaki değişimlerden ziyade gen ekspresyon desenindeki değişimlere dayalı olarak ortaya çıkmasına epigenetik değişimler denir. Genlerin promotör bölgesindeki metilasyonunu da kapsayan bu epigenetik değişimler, genlerin transkripsiyonel aktivitesini veya onların ifadelerini etkileyebilir. DNA metilasyonu genomik damgalama (genomik imprinting), kromozom stabilitesi ve gelişim sürecinde gen inaktivasyonunun sürekliliği ile korunmasını da içeren birçok olayın regülasyonunda yer alan kritik bir genom modifikasyonudur (Cooper ve Hausman 2004; Robertson 2005). Metilasyon hızının genetik mutasyon hızından büyük olduğu göz önüne alınırsa, epigenetik değişimlerin genetik mutasyonlardan ziyade neoplazmaları başlatabileceği görüşü önem kazanabilir (Baylin ve ark. 2000). Anormal promotör metilasyonu ve imprinting kaybı gibi epigenetik değişimler, insan kanserlerinde yaygın değişimler olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda gen fonksiyon bozuklukları için tümör baskılayıcı genlerin promotör hipermetilasyonu genetik değişimlere alternatif olarak bilinir ve bunlar dokuya özel ya da tümöre özel tipte olabilirler (Baylin ve ark. 2000; Jones ve Baylin 2002; Belinsky 2004; Feinberg ve ark. 2006).

DNA molekülleri sitozin bazlarına kovalent olarak bağlanan metil gruplarıyla değişikliğe uğrayabilirler, genomik DNA'nın bu modifikasyonu tümör baskılayıcı genleri devre dışı bırakan bir mutasyon kadar önemli olabilir. DNA metilasyonu,



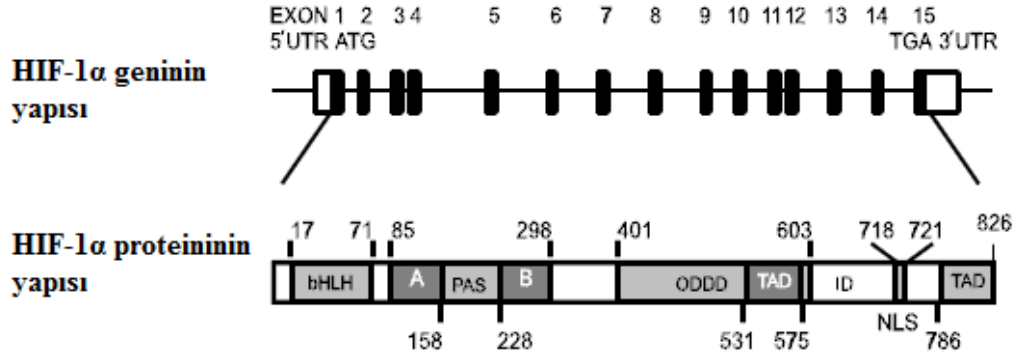
sitozin-fosfoguanin dinükletidlerinde (CpG) zengin olan ve CpG adaları diye bilinen bölgelerdeki sitozinlerde yer almakla sınırlıdır. Bu adalar genellikle genin 5' ucunda, yani promotör çevresinde bulunurlar ki bu bölge DNA'nın RNA'ya transkripsiyonunun yapıldığı bölgelerle ilgili olup genellikle metillenmemişlerdir (Laird ve Jaenisch 1994; Bird 2002; Laird 2005). Bu metillenmemiş bölgelerdeki hipermetilasyon RNA transkripsiyonunu etkileyebilir ve gen fonksiyon kaybının nedeni olabilir (Bird 2002; James ve Stephen 2003). Birçok tümörde promotör bölgedeki hipermetilasyonun, tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonunu hem transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engelleyerek hem de metillenmiş DNA'ya özgül olarak bağlanan represörlerin katılımını sağlayarak engellediği keşfedilmiştir. Örneğin, bu çalışmada 5'UTR bölgesinde rs779805 polimorfizmini incelediğimiz VHL geninde promotör bölge hipermetilasyonunun fonksiyon kaybına neden olabileceği renal hücre karsinomu, kapiller hemangioblastoma, meme, over kanserleri ve lenfomaların çoğunda gösterilmiştir (Baylin ve ark. 2000; Jones ve Baylin 2002; Kaelin 2007b; Arjumand ve Sultana 2012).

İyi düzenlenmiş ve muhafaza edilmiş DNA metilasyon örnekleri memelilerin gelişmesi ve yetişkin organizmaların normal fonksiyonları için esastır (Panning 1996, Mayer ve ark 2000, Robertson 2005, Merlo ve ark 2006). Aslında imprint edilmiş genler özellikle epigenetik modifikasyonların ilgi çekici örnekleridir. İmprinting mekanizmasının kusurlu olması ya da ebeveyn orijinin umulandan farklı olması durumunda, işlenmemiş genlerde patojenik bir fonksiyon kaybı ya da uygunsuz bir ekspresyon düzeyi ortaya çıkabileceği vurgulanmıştır (Cooper ve Hausman 2004; Arima ve ark. 2005).

## 2.4. Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ )

### 2.4.1. HIF-1 Genleri ve Proteinleri

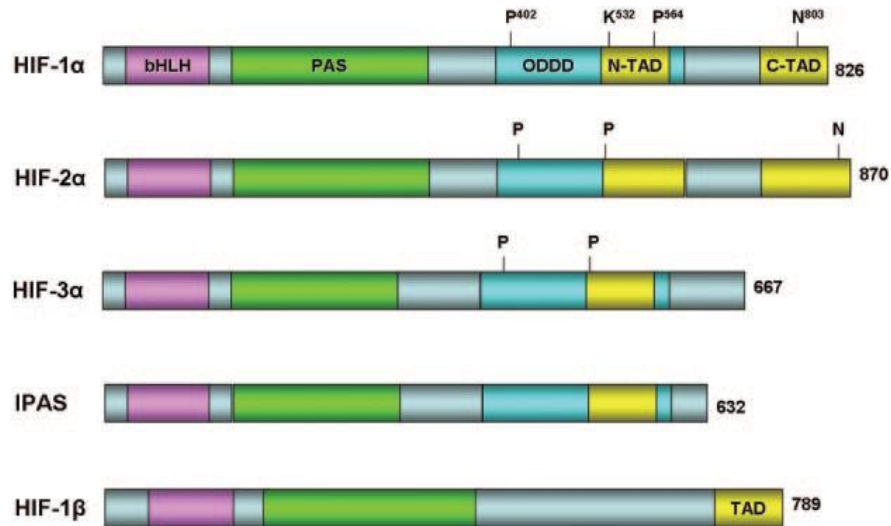
İnsanda hipoksiyle indüklenen genleri aktive eden HIF-1 $\alpha$  gen proteini, HIF-1 gen ailesinin en iyi bilinen temel elemanlarından biridir (Yamada ve ark 2005). HIF-1 $\alpha$  geni; 14q23.2 kromozom bölgesinde bulunan 15 ekzon ve 14 introndan oluşan bir gen dir (Şekil 2.4.1).



Şekil 2.4.1. HIF-1 $\alpha$  geninin ve proteininin yapısı. HIF-1 $\alpha$  geni 15 ekzon ve 14 intron içerir. HIF-1 $\alpha$  proteini bHLH ve PERN-ARNT-SİM (PAS) domeynlerinden oluşur ki bunlar HIF-1 $\beta$  ile dimerizasyonda yer alırlar. C-terminal kısmı iki transaktivatör domeyni (TAD), bir inhibitör domeyni (ID) ve bir nükleer lokalizasyon sinyal bölgesi (NLS) bulundurur. ODD domeyni VHL proteini tarafından hedeflenen N-terminal ve C-terminal alt domeynlerini içerir (Chun ve ark. 2002).

Daha sonra yapılan homoloji ve klonlama çalışmaları ile HIF-1 $\alpha$  ile homolog olan HIF-2 $\alpha$  ve HIF-3 $\alpha$  genleri; HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  gen proteinleri ile heterodimer oluşturan aril hidrokarbon nükleer translokator (ARNT) proteininin sentezinden sorumlu HIF-1 $\beta$  geni tanımlanmıştır. Bunlar PAS (Per-Arnt-Sim) ailesinin temel heliks-loop-heliks (bHLH) proteinlerini sentezlerler (Şekil 2.4.2) (Kelsey 1993; Park ve ark. 2003; Yamada 2005; Ke ve Costa 2006). HIF-1 $\alpha$ , hipoksiyle indüklenen genleri aktive ettiği saptanan ilk proteindir. HIF-2 $\alpha$  protein yapısı bakımından büyük ölçüde HIF-1 $\alpha$ 'ya benzerlik gösterir; ancak dokuya özgü ifadelendikleri ve farklı fonksiyonlara sahip oldukları bildirilmektedir. Mesela HIF-1 $\alpha$  her hücrede bulunabilirken, HIF-2 $\alpha$  fare karaciğerinde, tübül sistem gelişmesinde ve vasküler endotel hücrelerin yeniden yapılanmalarında görev alırlar ve buralarda fazlaca görülürler (Kelsey 1993; Tian ve ark. 1997; Jain ve ark. 1998; Brusselmans ve ark. 2001; Wiesener ve ark. 2003). İlginç olarak, böbrekte HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ 'nın her ikisinde bulunmakta iken, miktarı fazla artan HIF-2 $\alpha$  renal karsinoma hücrelerinin çoğalmasına neden olur ve inhibisyonu bu çoğalmayı baskılamaya yeterlidir (Kondo ve ark. 2002; Kondo ve ark. 2003). Bu nedenlerle, HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  oldukça benzer

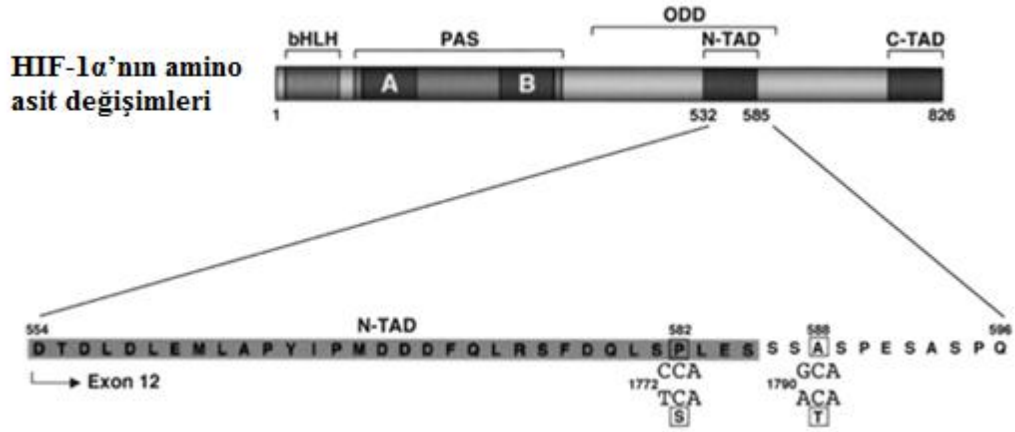
olmalarına ve HIF-1 $\beta$  ile dimer oluşturarak hedef genlerin aynı DNA sekanslarına bağlanmalarına karşılık farklı doku ve hücreyel yaygınlığa sahip olabilirler ve belkide farklı hedef genleri aktive edebilirler. HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  gen mutasyonlarının her ikisinin de farelerde embriyonik öldürücü etki göstermeleri yanında farklı fonksiyonlara sahip oldukları gösterilmiştir (Iyer ve ark. 1998; Ryan ve ark. 1998; Tian ve ark. 1998; Peng ve ark. 2000). HIF-1 alt ünitelerinin en az karakterize edileni HIF-3 $\alpha$ 'dır ve çok sayıda alternatif splysing (alternatif kesip-ekleme) seçenekleri vermesi yönünden tek olanıdır (Maynard ve ark. 2003). HIF-3 $\alpha$ 'nın splysing seçeneklerinden biri olan inhibitör PAS domeyn proteininin (IPAS) HIF-1 $\alpha$  ya negatif bir regülatör gibi davrandığı ve bu nedenle HIF-3 $\alpha$ 'nın genellikle HIF sisteminin bir antagonisti olabileceği belirtilmiştir (Makino ve ark. 2002).



Şekil 2.4.2. İnsan HIF- $\alpha$  ve HIF-1 $\beta$  domeyn yapıları. HIF- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  ve HIF-3 $\alpha$ 'nın splysing ürünü-IPAS) ile HIF-1 $\beta$  bHLH ve PAS protein ailesine aittirler. HIF-1 $\alpha$  iki prolinin hidroksilasyonu ve bir lizin asetilasyonu ile oksijen regülasyonunu stabilize etmeye aracılık eden bir ODDD ye sahiptir. Prolin rezidüleri HIF-2 $\alpha$  ve HIF-3 $\alpha$  içerisinde de korunurlar. HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  C-TAD ve N-TAD transaktivasyon bölgelerine sahipken HIF-1 $\beta$  sadece bir TAD içerir. Her alt birimin toplam amino asit sayıları domeyn yapısının sonunda yer almaktadır (Ke ve Costa 2006).

Araştırmalar HIF-1 $\alpha$  geninde bulunan polimorfizmlerin ifadelenen proteinlerin aktivitesinde etkili olabileceğini göstermiştir (Prior ve ark. 2003). HIF-1 $\alpha$ 'nın 12. ekzonundaki C1772T C>T polimorfizmi protein yapısında prolin582serin; G1790A G>A polimorfizmi ise alanin588treonin aminoasit değişimleriyle sonuçlanmaktadır (Şekil 2.4.3). Bizim de kolorektal kanserde etkisini araştırmak istediğimiz bu polimorfizmler HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijen bağımlı degradasyon bölgesinde bulunmaktadırlar. Proteinin transaktivasyonel aktivitesinde ve kanser patogeneğinde

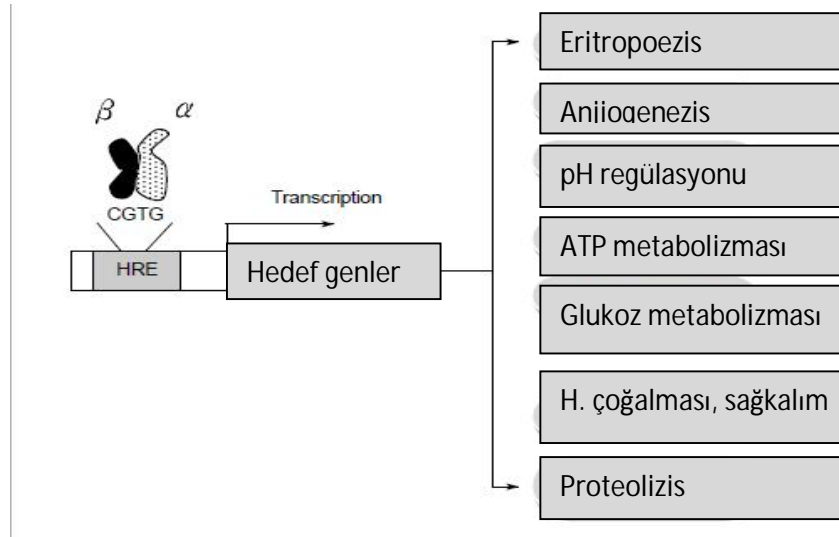
etkili olabilirler, HIF-1 $\alpha$ 'nın hidroksilazlar yoluyla hidroksilasyonunda ve oksijen bağımlı düzenlenmesinde rol oynayabilirler görüşünü test eden çalışmalar yapılmaktadır (Masson ve ark. 2001; Safran ve ark. 2003; Manalo ve ark. 2004; Kim ve ark. 2005; Veronica ve ark. 2005; Mabjeesh ve Amir 2007; Konac ve ark. 2009; Shieh ve ark. 2010; Havelund ve ark. 2012).



Şekil 2.4.3. HIF-1 $\alpha$  nın yapısı. (Üstteki panel) bHLH, temel heliks-loop-heliks domeyni; PAS, Per-Arnt-Sim domeyni; ODD, oksijen-bağımlı degradasyon domeyni; N-TAD ve C-TAD, N- ve C-terminal transaktivasyon domeynleri. (Alt panel) Ekzon 12'de kodlanan aminoasit sekansları. N-TAD ve tek nükleotid polimorfizmlerinin sebep olduğu aminoasit değişimlerinin pozisyonları. Numaralar sırasıyla amino asitlerin veya nükleotidlerin yerlerini göstermektedir (Tanimoto ve ark. 2003).

#### 2.4.2. HIF-1 Proteinlerinin İşlevleri

HIF-1 proteinleri hücre ve dokularda düşük oksijen basıncına adaptasyon, hücre sağ kalımı ve çoğalması, anjiyogenez, eritropoez, glukoz alınımı ve demir metabolizması gibi olaylara bağlı birçok genin hipoksiye transkripsiyonel aktivasyon cevaplarının anahtar regülatörüdür. HIF-1'in nükleer  $\beta$ -alt ünitesi yapısal,  $\alpha$ -alt ünitesi regülatör bileşen olarak işlev görür. HIF-1 $\alpha$  alt ünitesi normoksik koşullarda kararsızdır ve sonraki degradasyonlar için E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir parçası olan VHL proteininin hedefidir. Hipoksik koşullarda HIF-1 $\alpha$  proteazomal yıkımdan kaçır, sitozolde birikir, stabil hale gelir, fosforillenir ve nükleusa geçerek HIF-1 $\beta$  ile heterodimerik bir kompleks oluşturur (Şekil 2.4.4). Bu kompleks hipoksiyle indüklenebilen genlerin güçlendirici ya da promotörüne bir DNA bağlanma motifi olan hipoksi cevap elementleri (HRE) ile bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonlarını başlatır (Semenza ve Wang 1992; Lee ve ark. 2004; Maynard ve Ohh 2004).



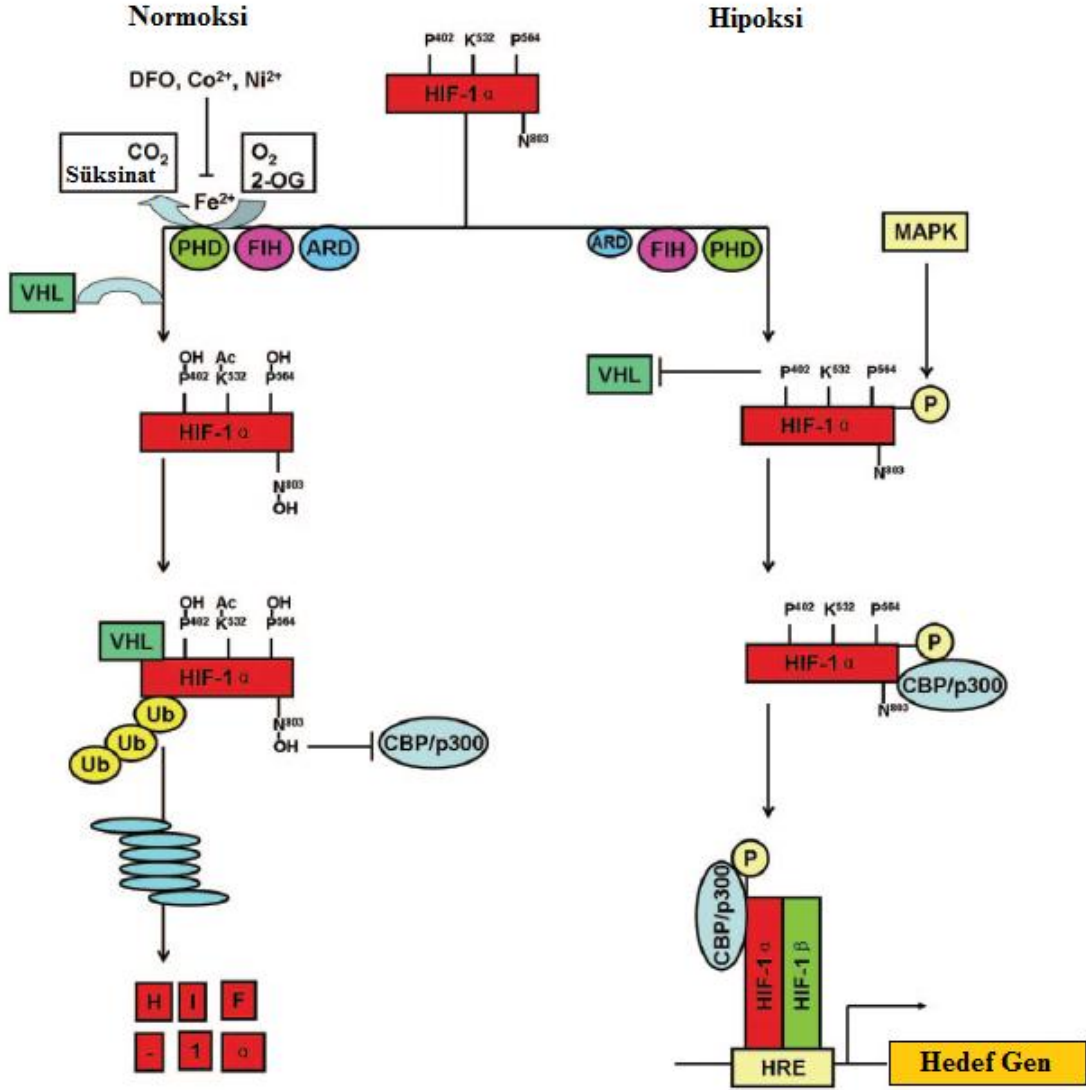
Şekil 2.4.4. HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$  heterodimerinin hipoksi cevap elementlerine (HRE) bağlanması ve hedef genleri. Kısaltmalar:  $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ;  $\beta$ , HIF-1 $\beta$  (Chun ve ark. 2002).

### 2.4.3. HIF-1 $\alpha$ ve VHL Protein Etkileşimi

Normoksik koşullarda, HIF-1 $\alpha$  proteinleri korunumlu iki prolin (P<sup>402</sup> ve P<sup>564</sup>) rezidüsünden hidroksilize olarak VHL proteinleri ile etkileşirler (Masson ve ark. 2001). Bu prolinlerin hidroksilasyonu prolin hidroksilazlar (PHD) tarafından O<sub>2</sub> ve Fe<sup>2+</sup> gibi faktörlere bağımlı şekilde sağlanmaktadır. HIF-1 $\alpha$ 'nın iki prolini hidroksiprolin'e dönüştürüldükten sonra VHL proteini HIF-1 $\alpha$ 'yı yakalar. VHL/HIF-1 $\alpha$  kompleksinin X-ışınları kristalografisi ile incelenmesi, VHL proteini yüzeyinde hidroksiprolinin tam olarak uyacağı bir cep olduğunu göstermiş ve tüm bağlanma konfigürasyonunun oldukça spesifik olduğu bildirilmiştir (Hon ve ark. 2002; Min ve ark. 2002). Böylece HIF-1 $\alpha$ 'nın E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir bileşeni olan VHL proteinine bağlanması, HIF-1 $\alpha$ 'nın ubiquitinasyonuna sebep olmakta ve sonuçta proteozomlar tarafından degradasyonu sağlanmaktadır (Kamura ve ark. 2000).

HIF-1 $\alpha$ 'nın stabil olması ise hücrede oksijen konsantrasyonunun normoksik koşuldaki (yaklaşık %21 O<sub>2</sub>) hipoksiye (yaklaşık %1 O<sub>2</sub>) doğru adaptasyonunu gerektirmektedir. Prolin hidroksilasyonu substrat olarak oksijene ihtiyaç duyduğu için hipoksi koşulları P<sup>402</sup> ve P<sup>564</sup> hidroksilasyonlarını kısıtlamakta ve VHL'nin bağlanmasını önleyerek HIF-1 $\alpha$ 'nın dengelenmesine öncülük etmektedir (Ohh ve ark. 2000; Bruick ve McKnight 2001; Epstein ve ark. 2001; Ivan ve ark. 2001; Jaakola ve ark. 2001; Hon ve ark. 2002). İnsanda bulunan üç prolin hidroksilaz izoformu vardır (PHD1-3); normoksik koşullarda HIF-1 $\alpha$  hidroksilasyonu için öncelikli sorumlunun PHD2 olduğu ileri sürülmüştür (Berra ve ark. 2003). HIF-

1 $\alpha$ 'nın VHL proteinine bağlanan tarafı oksijen-bağımlı degradasyon (ODD) bölgesinde bulunur. ODD bölgesi HIF-1 $\alpha$ 'nın amino-terminal transaktivasyon domeyni N-TAD olarak bilinir. HIF-1 $\alpha$ 'nın ikinci transaktivasyon bölgesi karboksi-terminal C-TAD içerisinde bulunan ve özel bir asparajin hidroksilazla hidroksillenen asparajin N<sup>803</sup> konumlu bölgesidir. Normokside hidroksillenen N<sup>803</sup>'ün transkripsiyonel koaktivatör CBP/p300'e yönelimi faktör engelleyici HIF (FIH) tarafından bloke edilir (Mahon ve ark. 2001; Lando ve ark. 2002). Hipoksi durumunda, PHD'ler ve FIH aktiviteleri baskılanarak prolin ve asparajinlerin hidroksilasyonu ortadan kalkar, VHL bağlanması olmaz ve HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonu meydana gelir. Stabilenen ve MAPK ile indüklenerek fosforlanan HIF-1 $\alpha$  proteinleri nükleusa transloke olarak HIF-1 $\beta$  ya bağlanır. HIF-1 $\alpha$ 'nın hidroksillenmemiş N<sup>803</sup> bölgesi CBP/p300'ün hedef gene yönlendirilmesine ve transkripsiyonel aktivasyonuna yol açar (Sodhi ve ark. 2000; Minet ve ark. 2001; Ke ve Costa 2006). Kısaca HIF-1 $\alpha$ 'nın, normokside prolin hidroksilasyonu ile VHL bağlanması için sinyal oluşturarak yıkımı; hipokside ise hidroksillenmemiş asparajinin koaktivatör CBP/p300'e bağlanması ile uyum seviyesine göre hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonu regüle edilmiş olur (Şekil. 2.4.5). Diğer bir durumda, VHL gen mutasyonları olan hücrelerde HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  normoksi durumunda da stabildirler ve hipoksiyle indüklenebilir genlerin fazlaca ekspresyonuna sebep olurlar. Böylece VHL proteini eksik olan hücrelerde normal oksijen basıncı altında HIF-1 $\alpha$ 'nın stabilitesine ve aktivitesine izin vererek tümör oluşumuna ve hücreler hipoksik koşullara maruz kalmadan da anjiyogenik faktörleri kodlayan genlerin ekspresyonuna sebep olabilecekleri bildirilmiştir (Iliopoulos ve ark. 1996; Kuwai ve ark. 2004; Hes ve ark. 2005; Domene ve Illingworth 2012).



Şekil 2.4.5. HIF-1 stabilizasyonu ve transaktivasyonunun oksijen-bağımlı regülasyonu. Normoksida (sol taraf), HIF-1 $\alpha$  nın iki prolin residüsü (P<sup>402</sup> ve P<sup>564</sup>) ve asparajin (N<sup>803</sup>) sırasıyla PHD'ler ve FIH-1 le O<sub>2</sub>, 2-OG ve Fe<sup>2+</sup> ye bağımlı şekilde hidroksilize edilir. Hidroksilize olan HIF-1 $\alpha$  proteinlerinin E3 ubiquitin ligaz VHL kompleksine bağlanarak proteazom ile yıkılmaları sağlanır. Lizin (K<sup>532</sup>) nin ARD1 tarafından asetilasyonu HIF-1 $\alpha$  nın tercihan VHL ile reaksiyonunu kolaylaştırır. Hidroksillenmiş N<sup>803</sup> transkripsiyonel koaktivatör CBP/p300'ün yönelimini bloke eder. Hipoksi durumunda (sağ taraf) PHD'lerin ve FIH'in aktiviteleri baskılanarak prolin ve asparajinlerin hidroksilasyonu ortadan kalkar ve VHL bağlanması olmaz. Hidroksillenmemiş N<sup>803</sup>'ün koaktivatör CBP/p300'e bağlanması ve hedef gene yönlendirilmesi sağlanır. Böylece, Stabilleşen HIF-1 $\alpha$  proteinleri çekirdeğe transloke olur ve HIF-1 $\beta$ , MAPK ile indüklenerek fosforlanmış olan HIF-1 $\alpha$ 'ya tercihan bağlanır. Oluşan HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$  heterodimeri DNA'nın hipoksi cevap elementi (HRE) sekansına bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar (Ke ve Costa 2006).

#### 2.4.4. Lizin Asetilasyonunun HIF-1 Degradasyonu Üzerine Etkisi

Normoksi koşullarda VHL proteininin HIF-1 $\alpha$ 'ya bağlanmasını stimüle eden diğer bir yol, HIF-1 $\alpha$ 'nın ODD domeyninde lokalize lizin 532 (Lys<sup>532</sup>) nin bir asetiltransferaz (ARD1) tarafından asetillenmesidir. ARD1 adı ilk kez *Saccharomyces cerevisiae* mayalarında saptanmış ve adlandırılması mitotik hücre

siklusunda mutasyon oluşturulan defektif mayalardan gelmiştir (Whiteway ve Szostak 1985). Bu asetilasyonun VHL ile HIF-1'in etkileşimini artırarak proteozomal degradasyonunu desteklediği gösterilmiş; ancak bu çalışmalarda mekanizması açıklanamamıştır (Ravi ve ark. 2000). Daha sonra yapılan araştırmalarda normokside ARD1 aktivitesi oksijenden etkilenmediği için aktiftir ve HIF-1 $\alpha$ 'yı oksijen seviyesinden etkilenmeksizin asetilleyebilir; fakat hipoksik durumda ARD1'in mRNA ve protein seviyesi azalır ve böylece HIF-1 $\alpha$ 'yı normoksidekinden daha az asetilleyebilir açıklaması yapılmıştır (Ravi ve ark. 2000; Kim ve ark. 2001; Jeong ve ark. 2002).

#### **2.4.5. HIF-1'in Fosforilasyonu**

Oksijen konsantrasyonuna duyarlı HIF-1 aktivitesini regüle etmede esas öneme hidroksilazlar sahip olmakla birlikte, HIF-1 aktivitesinin kontrolünde yardımcı diğer mekanizmalar da vardır. Bunlardan biri evrimsel olarak korunmuş ve mayadan insana kadar tüm ökaryot hücrelerde sinyal iletiminde merkezi rol oynayan mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağıdır. Bu regülasyonda MAPK ailesinin proteinleri olan serin/treonin kinazların rol aldığı gösterilmiştir. HIF-1'in fosforilasyonu HIF-1 $\beta$  ile dimerleşmesine ve hedef genlerin promotör ya da güçlendirici DNA sekanslarına bağlanmasına olanak sağlamaktadır (Salnikow ve ark. 2000; Sodhi ve ark. 2000; Gorlach ve ark. 2001; Minet ve ark. 2001; Stiehl ve ark. 2002; Li ve ark. 2004; Salnikow ve ark. 2004).

#### **2.4.6. HIF-1'in Hedef Genleri**

Hücre ve organlar oksijen basıncındaki değişikliklere uyum sağlama ihtiyacındadırlar. HIF-1'in hedef genlerinin buldukları dokuya oksijen sağlanmasındaki değişimlere özel bir şekilde adaptasyon göstermesi süpriz olmamalıdır. Halen HIF-1'in adaptasyonu ile regüle edilen farklı fonksiyonlu 100 den fazla gen tanımlanmıştır. HIF-1, hedef genlerin güçlendirici ve promotör bölgelerinde lokalize olmuş 50 baz çiftli HRE bölgesine bağlanarak, bu genlerin ekspresyonlarını aktive etmektedir (Semenza ve ark. 1991). Dahası arteriyel endotel hücrelerinde, insan genlerinin %2'den fazlasının, direkt veya indirekt olarak HIF-1 tarafından regüle edildiği bildirilmiştir (Manola ve ark. 2005; Koukourakis ve ark. 2006; Semenza 2009).



#### **2.4.6.1. Anjiyogenezis**

Anjiyogenezis farklı hücre tiplerinde, çok sayıda gen ürününün ekspresyonu ile gerçekleşen karmaşık bir prosestir (Conway ve ark. 2001). Anjiyogenezisin farklı basamaklarında, hipoksi ile baş etmek için pek çok genin olaylara karıştığı gösterilmiştir (Levy ve ark. 1995; Bunn ve Poyton 1996; Forsythe ve ark. 1996; Berra ve ark. 2000; Giordano ve Johnson 2001; Semenza 2002). Bunlardan endotele özgü büyüme faktörleri içinde en fazla çalışılmış ve en etkin olanı VEGF'dir. VEGF, hipoksik koşullarda endotel hücrelerin proliferasyonunu stimüle ederek doğrudan anjiyogenezisin içinde yer alır. Böylece VEGF ve birtakım diğer proanjiyogenetik faktörlerin indüksiyonu, vasküler yoğunluğu artırır ve oksijen difüzyon mesafesini düşürür (Neufeld ve ark. 1999; Josko ve ark. 2000; Conway ve ark. 2001).

#### **2.4.6.2. Glukoz metabolizması**

Oksijenin azalması durumunda hücreler glukoz metabolizma yollarını oksijene bağımlı trikarboksilik asit (TCA) siklusu yolağından, oksijen bağımsız anaerobik glikoliz yolağına değiştirirler (Dang ve Semenza 1999; Seagroves ve ark. 2001). TCA siklusunda bir glukoz molekülünden 30 ATP molekülü üretilirken, anaerobik glikoliz ile sadece 2 ATP molekülü üretilir, hipoksik hücreler ATP üretimlerini daha fazla glukoz alınımı ile yükseltirler. Hipoksi ve HIF-1'in bu regülasyonu glikolitik yolağın tüm enzimleri ve glukoz taşıyıcılarının da artırılmasıyla sağlanır (Chen ve ark. 2001; Wenger 2002). Laktat ve piruvat gibi glikoliz metabolitlerinin, normokside HIF-1 $\alpha$  birikimini artırdığı ve hipoksiyle indüklenebilir gen ifadelerini regüle ettiği ve böylece potansiyel bir pozitif geri besleme oluşturduğu belirtilmiştir (Seagroves ve ark. 2001; Lu ve ark. 2002).

#### **2.4.6.3. Hücre proliferasyonu ve sağkalım**

Hipokside, HIF-1 insülin-benzeri büyüme faktörü 2 (IGF2) ve transforme edici büyüme faktörü- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) gibi büyüme faktörlerini indükler (Feldser ve ark. 1999; Krishnamachary ve ark. 2003). Bu tür büyüme faktörlerinin kendi akraba reseptörlerine bağlanması sinyal transdüksiyonu yollarını aktive ederek hücre proliferasyonunu/sağkalımını destekler ve HIF-1 $\alpha$ 'nın kendisinin de ekspresyonunu stimüle eder (Semenza 2003). Büyüme faktörleri hipoksiyle beraber bazı hücrelerde MAPK ve fosfatidilinositol 3 kinaz (P13K) sinyal yollarını aktive edebilir, hücre proliferasyonunu kolaylaştırabilirler. Bu ise IGF2 ve TGF- $\alpha$  kodlayıcıları da dahil olmak üzere bazı büyüme faktörleri, HIF-1 $\alpha$  hedef genlerinin transkripsiyonel

aktivitelerinin artmasına götürür ve böylece kanser oluşumunda kritik bir öneme sahip olan otokrin-sinyalleme yollarına yardımcı olur (Krishnamachary ve ark. 2003; Semenza 2003).

#### **2.4.6.4. Apoptozis**

HIF-1 genlerinin fonksiyonlarına aykırı görünmekle beraber hücrenin hipoksiye adaptasyonu sadece hücre proliferasyonu ve sağ kalımına sebep olmakla kalmayıp aynı zamanda bazı durumlarda hücre ölümüne de sebep olabilir. Yapılan bir çalışmada HIF-1'in kompleks bir rol oynayarak, hipoksik koşullarda apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (Carmeliet ve ark. 1998). Aynı araştırma grubu tarafından düşük oksijen basıncında HIF-1 $\alpha$  delesyonlu kök hücre genetik çalışmalarında, delesyonlu olanlardaki apoptozisin normallerden daha az olduğu gösterilmiştir. Bazı hücre tiplerinde, hipoksik koşullarda, kaspaz-3 ve Apaf-1 aracılığıyla kaspaz-9'un aktive olduğu ve sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salındığı rapor edilmiştir (Brunelle ve Chandel 2002; McClintock ve ark. 2002). HIF-1 $\alpha$  ve HIF-1 $\beta$  ekspresyonlarının, apoptozis ile ve kaspaz-3, Fas-hücre yüzey reseptörleri, Fas ligandı gibi apoptoz uyarıcı faktörlerle anlamlı derecede korele olduğu gösterilmiştir (Volm ve Koomagi 2000).

#### **2.4.6.5. Embriyonik gelişim**

Embriyonik gelişimde HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  ve HIF-1 $\beta$  bileşenlerinin temel rol oynadığı gösterilmiştir (Maltepe ve ark. 1997; Iyer ve ark. 1998; Ryan ve ark. 1998; Tian ve ark. 1998; Kotch ve ark. 1999; Peng ve ark. 2000). Bunlardan herhangi birisinin baskılanması durumunda farelerde ölümle sonuçlanan anormal vasküler gelişim saptanmıştır. Normal fare embriyolarında 8.5 ve 9.5 embriyonik günleri arasında HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun artmış olduğu saptanmıştır (Iyer ve ark 1998). HIF-1 $\alpha$  yetersizliği olan embriyolar yetersiz kan damarı yapılanması, defektli nöral ağ gelişimi ve kardiyovasküler malformasyona bağlı olarak 11. embriyonik günde ölmüşlerdir (Iyer ve ark. 1998; Ryan ve ark. 1998).

#### **2.4.6.6. Kanser gelişimi**

Bazı insan kanserlerinde, muhtemelen intratümöral hipoksi veya genetik alterasyonlar sonucu HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$ 'nın aşırı ekspresyonu bulunmuştur (Zhong ve ark 1999; Talks ve ark 2000). Tümör büyüklüğü artarken, tümör kütesinin içerisi yeterli kan damarı oluşturuluncaya kadar giderek hipoksikleşir. Tümör içersindeki

hipoksik koşullar HIF-1 stabilitesini ve aktivitesini artırabilir (Zhong ve ark. 1999; Talks ve ark. 2000; Apaydın ve ark. 2008; Knechtel ve ark. 2010). İmmunhistokimyasal analizler normal dokularda olmamasına karşılık; benign tümörlerde saptanabilir miktarlarda; malign tümörlerde artmış miktarlarda; metastazlarda aşırı miktarlarda HIF-1 $\alpha$  proteini bulunduğunu göstermiştir (Maxwell ve ark. 1997; Zhong ve ark. 1999; Ryan ve ark. 2000; Harris 2002).

Kanser hücrelerinde artmış HIF-1 $\alpha$  ekspresyonuna bağlı olarak kayda değer sıklıkta genetik alterasyonlar vardır. Örneğin, VHL hastalıklarında belirtildiği gibi VHL fonksiyon kaybı, temelde HIF-1 $\alpha$  protein miktarının artışına sebep olur (Illiopoulos ve ark. 1996; Kanno ve ark. 2000). İnsan kanserlerinin pek çoğunda fonksiyon kaybı tespit edilen p53'ün, HIF-1 $\alpha$ 'nın ve HIF-2 $\alpha$ 'nın hedef gen transkripsiyonlarının artmasına sebep olduğu belirtilmektedir (Ravi ve ark. 2000; Zundel ve ark. 2000). Diğer yandan, Rous sarkom (v-Src) retroviral onkogeninin transformasyon potansiyelinin kısmen HIF-1 indüklemesine bağlı olduğu ve v-Src'nin fonksiyon kazanmasının da HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunu artırdığına dair deliller bulunmaktadır (Jiang ve ark. 1997). Diğer bir çalışmada, reseptör tirozin kinazın (HER2) sinyalleme artışının HIF-1 $\alpha$  sentezini artırdığı belirtilmektedir (Laughner ve ark. 2001). HER2 aktivitesindeki artışın meme kanserlerinde yaygın ve önemli bir genetik alterasyon olduğu bunun da tümör agresifliği, tedavi direnci ve hasta ömrüyle korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. (Talks ve ark. 2000; Semenza 2003; Vleugel ve ark. 2005).

HIF'in keşfinden sonra hakkında bildiklerimiz eksponansiyel olarak artmıştır. Hipoksinin gen ekspresyonu yoluyla hücre biyolojisi ve memeli fizyolojisindeki önemi ve oksijen homeostazında oynadığı kritik rol iyi bilindiğinden, bunların ötesinde HIF-1'in kanser gibi insan hastalıklarındaki rolü hakkında inanılmaz bir ilgi artışı olmuştur. Mevcut bilgi birikimine katkı sağlayan HIF-1 stabilizasyonu ile hipoksiyle indüklenebilir genlerin ekspresyonunu etkileyen ya da HIF-1 degradasyonunu kontrol eden VHL gen mutasyonları ve polimorfizmleri konusunda çok sayıda çalışma yapılmıştır (Kamura ve ark. 2000; Rannala 2001; Kaelin 2005; Ke ve Costa 2006; Haase 2009; Lu ve Kang 2010).

Evrimsel süreçte seçici baskı altında olan mutasyonların toplumda nadir gözlenen değişiklikler olmasına karşın polimorfizmler toplumda yaygın olarak bulunurlar. Oluş mekanizmalarına ve buldukları yere göre farklı tipte polimorfizmler mevcuttur. Bunlar; DNA'nın tek bir bazındaki değişiklikler (SNP),

kısa DNA baz tekrarları (STRP), uzun DNA baz tekrarları (VNTR) ve DNA'yı kesen enzimlerin oluşturduğu uzunluk polimorfizmleri (RFLP) gibi varyasyonlardır. Genelde altta yatan moleküler değişiklikler ne olursa olsun polimorfizm denildiği zaman genetik materyalde bireyleri, hatta aynı bireyin farklı allellerini birbirinden farklılaştıran ve toplumda yaygın olarak bulunan değişikliklerden söz edilmektedir (Akarsu ve akır 2004). Polimorfizmler son zamanlarda genel ve kompleks hastalıkların oluşmasında yer alan temel genetik elemanlar olarak kabul edilmektedirler (Knechtel ve ark. 2010).

Kolorektal kanser gibi multifaktöriyel hastalıklarda genetik ve çevresel etkenlerin belirlenebilmesi için genetik polimorfizm çalışmalarının çoğaltılması gerekmektedir. Aslında genomun farklı bölgelerini veya genlerin birbirleriyle ve çevre ile olan etkileşimlerini ayırt edebilmek için genetik polimorfizm çalışmaları anahtar niteliğinde pratiklik sunmakta ve benzer çalışmalarla oluşacak bilgi birikimine gereksinim duyulmaktadır.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### ***3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması***

Çalışma grubu, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalına başvuran, klinik ve histopatolojik olarak kolorektal kanser tanısı almış 92 hasta ile Genel Cerrahi Polikliniğinde kolorektal kanser tanısı almamış 101 bireyden oluşturuldu. Çalışma grupları, bu araştırma sürecinde Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından kolorektal kanser tanısı olarak takip edilen hastalar ile yine Genel Cerrahi Polikliniğine farklı şikayetlerle başvuran kanser tanısı almamış bireylerden gönüllülük esasına uygun olarak seçildi. Çalışma için alınan etik kurul onayı EK-1'de verildi. Hasta ve kontrol grubuna bilgilendirilmiş hasta tarama onam formu dolduruldu (EK-2 Hasta Onam Formu). Çalışmaya dahil edilen her bireyin yaşı, cinsiyeti, eğitim düzeyi, mesleği, hastalığın saptanma yaşı, ailede kanser öyküsü olup olmadığı, eşlik eden sistemik hastalıklar, beslenme alışkanlıkları, beyaz toprak maruziyeti, sigara ve alkol kullanımı gibi muhtemel risk faktörleri sorgulanarak kaydedildi. Gen polimorfizmlerini saptamak için gereken moleküler çalışmalar N.E.Ü. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapıldı.

#### ***3.2. Hastadan Kan Alınması***

Belirlenen kriterlere uyan kolorektal kanser tanısı almış 44 kadın ve 48 erkek toplam 92 hasta ile 7'si kadın 94'ü erkek toplam 101 kontrol grubundan genomik DNA izolasyonunda kullanılmak üzere antikoagülan (EDTA-Etilendiamintetraasetikasit) içeren vakumlu tüplere 5 ml periferik kan alındı. Alınan örnekler DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

#### ***3.3. Kullanılan Cihazlar***

Buzdolabı ve Derin Dondurucu (+4 ve -20°C Arçelik)

UV Görüntüleme cihazı (Vilber-Lourmat)

Çalkalamalı su banyosu (Memmert)

Çeker ocak

Distile su cihazı (Nüve)

Elektroforez aleti (Clever)

Güç Kaynağı (Clever)

Hassas terazi (Kern)

Masaüstü mini santrifüj (VWR)

Masaüstü santrifüj +4° C (Hettich-Eppendorf)

Etüv (Nüve)

Otomatik Pipetler (VWR-Eppendorf)

PZR cihazı (Bioneer-Peqlab)

pH metre (VWR)

Nanodrop (Maestro nano)

Mikrodalga (Arçelik)

Manyetik karıştırıcı (VWR)

Vortex (VWR)

### ***3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler***

Agaroz (Prona)

Amonyum asetat (AppliChem)

Amonyum klorür (Sigma)

Asetik asit-glasiyal (Sigma)

Bromfenol Mavisi (Sigma)

Etil Alkol

Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma)

Etidyum Bromid (Sigma)

Phenol (Appllichem)

Phenol chloroform isoamyl alcohol (Appllichem)

Hidroklorik asit (Merck)

Potasyum hidrojen karbonat (Merk)

Sodyum asetat trihidrat (Merck)

Sodyum dodesil sülfat (Sigma)

Sodyum klorid (Sigma)

Tris base (Sigma)

Proteinaz K (Sigma)

### ***3.5. Kullanılan Çözeltiler***

10X Lysis Buffer

770 mM NH<sub>4</sub>Cl

46 mM KHCO<sub>3</sub>

10 mM EDTA

**10X Lysis Buffer hazırlanışı:**

Mezür içerisine yukarıdaki konsantrasyonlarda miktarlar tartılarak konuldu. Önce 200–300 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. EDTA'nın çözülmesi için pH 8,0 yapıldı. Daha sonra 1 litreye tamamlandı.

**Salt EDTA:**

75 mM NaCl

25 mM EDTA

**Salt EDTA hazırlanışı:** Mezür içerisine yukarıdaki konsantrasyonlarda miktarlar tartılarak konuldu. 200-300 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. EDTA'nın çözülmesi için pH 8,0 yapıldı. Daha sonra 1 litreye tamamlandı.

**%10 SDS solüsyonu:**

SDS 10 gr

dH<sub>2</sub>O 100ml

**Hazırlanışı:** 10 gr SDS tartıldı, 100 ml'ye tamamlandı. Çözülmesi için 68°C de sıcak su banyosunda bekletildi.

**10 mM Tris : (Tris MA: 121,4)**

50 ml Tris için 0.060 gr tartıldı ve 50 ml'ye tamamlandı.

**Sodyum Asetat Çözeltisi: (NaAc MA: 136)**

500 ml 3M NaAc çözeltisi için 204 gr tartıldı ve dH<sub>2</sub>O ile 500 ml'ye tamamlandı. HCl ile pH 5.2'ye ayarlandı. +4°C'de muhafaza edildi.

**5X TBE Çözeltisi:** 54 gr trizma baz, 27.5 gr borik asit, 20 ml 0.5M EDTA (pH 8,0) distile su ile 1 litreye tamamlandı.

**1X TBE Çözeltisi:** 200 ml 5X TBE alınarak 1000 ml'ye tamamlandı

**Orange G Jel Yükleme Boyası:** 55 ml gliserol, 100 mg orange G, 45 ml 1X TBE çözeltisi son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**Stok Etidyum Bromür Çözeltisi:** 10 mg etidyum bromür 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

**50X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA):** 1 litre hazırlamak için 242 gr Tris, 100 ml 0.5M EDTA, 57.1 ml Glasiyel asetik asit ve yeteri kadar dH<sub>2</sub>O eklendi. Hacim 1000 ml'ye tamamlanmaya yakın HCl ile pH 7,6-7,8'e ayarlandı.

### **3.6. Genomik DNA İzolasyonu**

(2.5 ml kan için uygulanan klasik yöntem)

1. 2.5 ml kan 15 ml'lik falkon tüplere konuldu.
2. Üzerlerine 0.125 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) eklendi.
3. Bunların üzerine konulan 2X LYSIS BUFFER ile 15 ml'ye tamamlandı.
4. 10 dk boyunca tüpler alt üst edilerek iyice karıştırıldı.
5. Daha sonra 30 dakika buzun içinde bekletildi.
6. Buzdan alındıktan sonra 3000 rpm'de +4<sup>0</sup> C'de 10 dk santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası tüplerin süpernatant fazı atıldı.
8. Tüpteki pellet üzerine 0.75 ml SALT/EDTA eklenerek iyice vortekslendi.
9. Daha sonra üzerine 0.075 ml %10'luk SDS solüsyonu, 37.5 µl PROTEİNAZ K (10 mg/ml) eklenerek örnekler 55<sup>0</sup> C'de 3 saat etüvde bekletildi.
10. Bekleme süresi sonunda tüplerin üzerine 0.75 ml FENOL (pH 8.0) eklendi.
11. Tüpler 20 saniye oldukça sert bir şekilde çalkalandı ve sonra 5 dakikada yumuşak şekilde ters yüz edildi.
12. Daha sonra tüpler 3000 rpm'de +4<sup>0</sup> C'de 10 dk santrifüj edildi.
13. Santrifüj sonunda tüplerdeki süpernatant kısmı yeni steril tüplere alındı.
14. Tüplerin üzerine 0.75 ml FENOL: Kloroform: İZOAMİL ALKOL (25:24:1) eklendi.
15. Tüpler 20 saniye oldukça sert bir şekilde çalkalandı ve sonra 5 dakikada yumuşak şekilde ters yüz edildi.
16. Daha sonra tüpler 3000 rpm'de +4<sup>0</sup> C'de 10 dk santrifüj edildi.
17. Santrifüj sonunda tüplerdeki süpernatant kısmı yeni steril tüplere alındı.
18. Süpernatantın 1/10'u oranında Sodyum Asetat (NaAc) eklendi.
19. Üzerlerine, alınan süpernatant kısmınının 2 katı kadar -20<sup>0</sup> C de soğutulmuş %95'lik ETANOL eklendi. Pellet 0.5 ml 10 mM Tris (pH 8.0) ile sulandırıldı.
20. Tüpler sert bir şekilde aşağı yukarı sallandı ve yoğunlaşarak çöken DNA cam çubuk yardımı ile yeni ependorf tüplere alındı.
21. Pellet kurutuldu ve alkol uzaklaştırıldı. Daha sonra pellet, 0.5 ml 10 mM Tris (pH 8.0) ile sulandırıldı ve sulandırılan stok DNA'lar -20<sup>0</sup> C'de saklandı.

DNA'ların kalitesi ve miktarını ölçmek için spektrofotometrik ölçüm yapabilen nanodrop cihazı kullanıldı. Kontaminasyonu önlemek için 0.5 ml stok DNA'dan 0.1 ml'lik 50-100 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde çalışma stoğu hazırlandı ve tekrar nanodrop cihazında ölçüm yapıldı.



### **3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

PZR, genomik DNA'dan istenilen spesifik bir bölgenin amplifikasyonunu otomatik olarak sağlayan bir yöntemdir. Primer adı verilen sentetik oligonükleotidler yardımı ile DNA üzerindeki seçilmiş bölgenin in vitro olarak  $10^6$  kez çoğaltılması sağlanır. Reaksiyonun gerçekleşmesi için ortamda hedef DNA, bu bölgeye özgü bir çift primer, deoksiribonükleotidler (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ve ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz bulunmalıdır. PZR işleminde, her döngü biri diğerine bağlı ve kesin zamanlamalı farklı sıcaklıklar gerektiren 3 ardışık basamaktan oluşur.

DNA denatürasyonu: Çoğaltılacak DNA çift zinciri ısı ile denatüre edilerek tek ipliklere ayrılır.

Primer bağlanması: Soğutma ile diziyeye özgü primerler DNA zincirine bağlanırlar.

Primer uzaması: Hedef bölgeye karşılık gelen zincir 5'→3' yönünde primerden başlanarak, yeni zincir sentezlenir ve sarmal DNA oluşur.

Bu üç basamak bir döngü olarak kabul edilir. Her döngüde, bir önceki döngüde oluşmuş tüm DNA'lar kalıp olarak kullanılır ve her döngü sonunda mevcut DNA iki katına çıkmış olur. Böylece 25-30 döngü sonunda çoğaltılmış olan hedef bölge tek bant olarak elektroforezde kendine ait yerde gözlenir.

### **3.8. Amplifikasyon Refraktör Mutasyon Sistemi (ARMS)**

ARMS-PZR tekniğinde mutant olan ve olmayan nükleotidler, 3' uçları bu nükleotidlerle çakışacak şekilde tasarlanmış primer çiftlerinin kullanıldığı PZR işlemi ile ayırt edilir. Bu primerlerden birinin terminal 3' nükleotidi mutant nükleotide, diğerininki ise mutant olmayan nükleotide spesifiktir. Toplamda 4 primer kullanılır, bunlardan 2 tanesi fasta dizisine uygun ileri ve geri primer olarak en dıştan (outer) tasarlanan ortak primerlerdir. Diğer 2 tanesi fasta dizisine uygun ileri ve geri primer olarak SNP'in değişim bölgesine uygun olarak en içten (inner) tasarlanan primerlerdir. Bunlardan bir tanesi normal diziyeye spesifikken diğeri mutant diziyeye spesifiktir.

Bu metod enzim kullanılmasını gerektirmediği için RFLP'ye göre hem daha ucuzdur hem de tek bir PZR yaparak çok daha kısa bir sürede genotipleri elde etmek mümkündür.

### **3.9. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)**

DNA'yı belli baz dizilerinden tanıyıp kesen enzimler DNA kesim enzimleri (Restriction Endonucleases) olarak isimlendirilir. Bazı kesim enzimlerinin özgül tanıma bölgeleri genellikle 4-6 DNA bazından oluşur. Normalde enzimin tanıma bölgesi olan bu bazlarda bir değişiklik olduğunu var saydığımızda enzimin DNA'yı kesme kalıbı değişecektir. Yani genomik DNA'da oluşan dizi değişiklikleri, belirli kesim bölgeleri yaratır veya olanları yok eder. Bu nedenden dolayı boyutları değişen bir veya birden fazla DNA fragmenti, Southern blot ve klonlanmış DNA probu ile hibridizasyondan sonra görünür hale getirilebilir.

### **3.10. Polimorfizm Seçimi**

VHL ve HIF-1 $\alpha$  genlerindeki SNP'ler, HapMap verileri kullanılarak seçildi (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Potansiyel olarak fonksiyonel polimorfizmlerin seçiminde baz alınan kriterler; 5' kodlanmayan bölgede ve aminoasit değişikliğini kodlayan bölgede yerleşik olması, araştırılmış populasyonlardaki minör allel frekansının (MAF) >5% olması, kanser riski veya sağkalım ile ilişkilendirilmiş olmasıdır. Çalışmamızda bu kriterlere göre VHL (rs779805) geninde bir SNP ve HIF-1 $\alpha$  (rs11549465, rs11549467) geninde iki SNP seçilmiştir.

### **3.11. Agaroz Jel Hazırlama ve Görüntüleme**

%2'lik agaroz jel hazırlamak için 2gr, %4'lük agaroz jel hazırlamak için 4 gr agaroz hassas terazide tartılır. 1X TAE çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır. Yüksek ayarda mikrodalga fırın kullanılarak eritilir. PZR ürünlerini görünür hale getirmek için 10  $\mu$ l etidyum bromür eklenerek hafifce karıştırılır. Hazırlanan karışım elektroforez kalıbına dökülür. Jel donduktan sonra 5  $\mu$ l PZR ürünü ve 2.5  $\mu$ l jel yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenir. Örnekler 20-30 dakika 120 volt sabit akımda moleküler ağırlık belirteci eşliğinde yürütülür. Daha sonra jel ultraviyole transilüminatörde görüntülenir, değerlendirilir ve kaydedilir.

Bu çalışmada HIF-1 $\alpha$  C1772T ve G1790A gen bölgelerinin genotiplerini belirlemek için ARMS - PZR yöntemi kullanıldı. Çoğaltılan PZR ürünlerini değerlendirmek için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Her bir örnek için 5  $\mu$ l PZR ürünü ve 2.5  $\mu$ l yükleme boyası karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 120 volt akımla 20-30 dakika yatay elektroforezde yürütüldü ve ultraviyole transilüminatörde görüntülenip fotoğrafı çekildi.

VHL geninde bulunan rs779805 kodlu polimorfizm bölgesini belirlemek için PZR-RFLP metodu kullanıldı. Çoğaltılan PZR ürünleri, çift zincirli DNA'yı GG↓CC tanıma bölgesine sahip *HaeIII* restriksiyon enzimi ile kesildi. Bu işlemde her bir reaksiyon için tüplere toplam 20 µl'lik hacimde olacak şekilde 10 µl PCR ürünü, 1 µl restriksiyon enzimi (10 U/µl), 1 µl 10x enzim buffer ve 8 µl dH<sub>2</sub>O konuldu. Enzim aktivitesi için 37<sup>0</sup>C'de 1 gece boyunca etüvde bekletildi. Jel görüntüsü için %4'lük agaroz jel hazırlandı. Enzim aktivitesini sonlandırmak ve yükleme yapabilmek için 3 µl yükleme tamponu ve 10 µl RFLP ürünü karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. 45W akımla 40 dakika yürütüldü ve jel UV transilüminatörde görüntülenip fotoğraflandı. Oluşan bant sayılarına göre alleller tespit edildi, hasta ve kontrollerin genotiplemesi yapılarak gruplar arasındaki değişkenlik değerlendirildi.

### **3.12. İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistiksel değerlendirmeler ticari bir istatistik programı ile yapıldı. Analizlerde parametrik verilerin karşılaştırılmasında ikili gruplar için student t testi, niteliksel veriler için non-parametrik testlerden Ki-kare testi ( $\chi^2$ ) ve Fisher's exact testi uygulandı. Odss oranlarını belirlemek için online SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>) programı kullanıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak P<0.05 düzeyinde anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Kaydedilen Klinik Bilgileri

Çalışmaya, kolorektal kanser tanısı almış 92 hasta ile Genel Cerrahi Polikliniğine sıradan başvuran, kolorektal kanser tanısı almamış, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan ve denek olmayı kabul eden 101 birey kontrol grubu olarak alındı. 100 olarak tasarlanan hasta grubunda dökümantasyon yetersizliği nedeniyle tüm hastaların klinik izlemelerine ve patolojik evreleme bilgilerine ulaşılamadı; bu nedenle klinik ve histopatolojik olarak kolorektal kanser tanısı olan 92 hasta ile çalışmaya devam edildi. Tablo 4.1’de hasta ve kontrollere ait demografik bilgiler verildi. Hasta grubunun ortalama yaşı  $59.68 \pm 15.06$ ; kontrol grubunun ortalama yaşı  $36.95 \pm 9.05$  idi. Kayıtlarımızda hasta grubunda erkek sayısı 48 (%52.2), kadın sayısı 44 (%47.8); kontrol grubunda erkek sayısı 94 (%93.1), kadın sayısı 7 (%6.9) olarak yer aldı.

Hasta ve kontrol grubunda ailede kanser öyküsü olup olmadığı sorgulandı. Kolorektal kanser hastalarından 58’i ailesinde bildiği bir kanser vakası olmadığını, geri kalan 34 hastanın 17’si akrabalarında kolon ve rektum kanseri, 7’si akciğer CA ve 10’u prostat, meme, böbrek, deri gibi çeşitli tipte kanser varlığını bildirdi. Kontrol grubunda bulunan bireylerin ailelerinde kanser öyküsü yoktu. Hasta ve kontrollere eşlik eden sistemik hastalıklarının olup olmadığı sorulduğunda, hastaların 40’ı (%33.7); kontrollerin 14’ü (%11.9) diabetes mellitus ve/veya hipertansiyon, kalp, prostat hiperplazisi, astım, KOAH gibi şikayetler bildirdiler.

Sigara ve alkol kullanımı; hastalar arasında sigara kullanan sayısı 27 (%29.3), alkol kullanan sayısı 7 (%7.6); kontrollerde sigara kullanan sayısı 74 (%73.3), alkol kullanan sayısı 36 (%35.6) olarak tespit edildi. Sigara ve alkol kullanımının kontrol grubunda fazla olduğu görüldü. Beyaz toprak maruziyetine evet diyen hasta sayısı 53 (%57.6); kontrollerde 36 (%46.6) idi. Bu bilgilere göre ileri yaş, erkek cinsiyet, ailede kanser öyküsü, eşlik eden hastalıklar ve beyaz toprak maruziyetinin kolorektal kanser için birer risk faktörü olduğu istatistiksel analizlerle belirlendi ( $P < 0.05$ ). Hasta ve kontrollerin student t testi ile incelenen vücut kitle indeksi dağılımı arasında anlamlı bir fark yoktu. Hastaların ulaşılabilen Astler Coller evreleri ve hastalık dereceleri Tablo 4.1.’de verildi.

Tablo 4.1. Hasta ve Kontrollerin Demografik Bilgileri.

Değişkenler	Hasta (n=92)		Kontrol (n=101)		P
	Ortalama±S.Sapma		Ortalama±S.Sapma		
Yaş	59.68±15.06		36.95±9.05		<0.001 <sup>a</sup>
VKİ	26.28±4.59		25.36±2.16		0.072 <sup>a</sup>
	n	%	n	%	
Cinsiyet					
Erkek	48	52.2	94	93.1	<0.001
Kadın	44	47.8	7	6.9	
Aile Kanser Öyküsü					
Yok	58	63.0	101	100	<0.001
Var	34	37.0	0	0	
Eşlik Eden Hastalık					
Yok	52	56.5	87	86.1	<0.001
Var	40	33.7	14	11.9	
Sigara Kullanımı					
Hayır	65	70.7	27	26.7	<0.001
Evet	27	29.3	74	73.3	
Alkol Kullanımı					
Hayır	85	92.4	65	64.4	<0.001
Evet	7	7.6	36	35.6	
Beyaz Toprak Maruziyeti					
Hayır	39	42.4	65	64.4	0.002
Evet	53	57.6	36	46.6	
Astler Coller Evresi					
B1	6	6.5			
B2	17	18.5			
C1	2	2.2			
C2	19	20.7			
D	2	2.2			
Bilinmiyor	46	50.0			
Grade					
Grade1	8	8.7			
Grade2	40	43.5			
Grade3	2	2.2			
Bilinmiyor	42	45.7			

<sup>a</sup> Hasta ve kontroller arasında yaş ve VKİ (vücut kitle indeksi) dağılımı student t-testi ile, diğer seçilen değişkenler Ki-kare ( $\chi^2$ ) ve Fisher exact testi ile değerlendirilmiştir.

#### 4.2.1. HIF-1 $\alpha$ C1772T Bölgesi ARMS - PZR Sonuçları

HIF-1 $\alpha$  genine ait C1772T (Prolin 582 Serin) (rs11549465) polimorfizmini belirlemek için ARMS-PZR metodu tercih edildi ve online Primer1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) veritabanı kullanılarak 2 primer çifti tasarlandı.

İçerden ileri primer (T allele):

5'- TCC AGT TAC GTT CCT TCG ATC AGT TGT AAT -3' Tm: 68°C

İçerden geri primer (C allele):

5'- AGG GCT TGC GGA ACT GCT TTC TAA GGG-3' Tm: 71°C

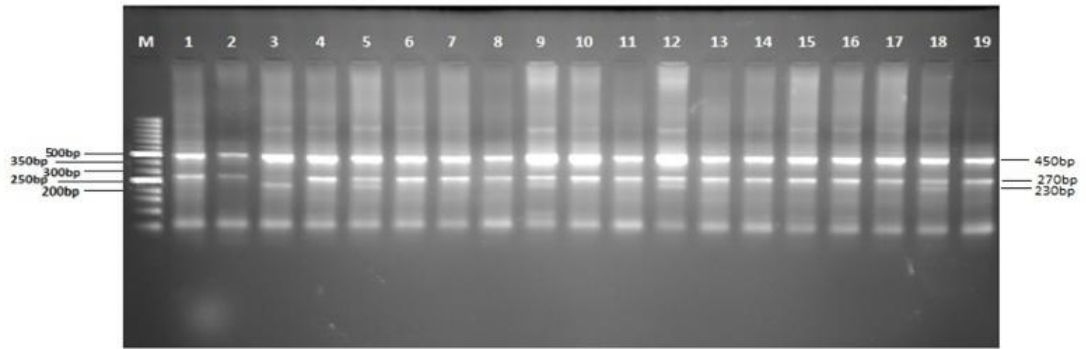
Dışardan ileri primer (5' - 3'):

5'- GCT GAA GAC ACA GAA GCA AAG AAC CCA T-3' Tm: 75°C

Dışardan geri primer (5' - 3'):

5'-TGT ATG TGG GTA GGA GAT GGA GAT GCA A-3' Tm: 76°C

Dışardan ileri primer ile içerden geri primer çifti atasal alleli (270 bç) gösteren PZR ürününü, içerden ileri primer ile dışarıdan geri primer çifti mutant alleli (230 bç) gösteren PZR ürününü oluşturdu. En dıştaki ileri ve geri primerler total PZR ürününü (450 bç) verdi. ARMS – PZR sonucu oluşan genotipler Şekil 4.1'de; C1772T polimorfizmi için PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları Tablo 4.2'de verildi.



Şekil 4.1. C1772T gen bölgesi ARMS – PZR sonucu oluşan genotipler: (M:50 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1. ve 2. kuyular değişim gözlenmeyen homozigot (CC) genotipleri, 3. kuyu değişim gözlenen homozigot mutant (TT) genotipi, 5. kuyu heterozigot (CT) genotipi göstermektedir).

Tablo 4.2. C1772T bölgesi için PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları.

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon	1. basamak	2. basamak	3. basamak
ddH <sub>2</sub> O	13,22 ul		Ayrılma 94°C 8 dk.	Ayrılma 94°C 1dk	Son Uzama 72°C 8dk
Buffer	2,5 ul	50 mM			
dNTP	1,6 ul	10mM			
Fw(dışarıdan)	0,14 ul	0.05mM		Primer Bağlanması 60°C 1dk	
Rw(dışarıdan)	0,14 ul	0.05mM			
Fw(içerden)	0,14ul	0.05mM			
Rw(içerden)	0,14ul	0.05mM			
Taq Poly.	0,4 ul	2,5 U/ul			
DNA	2 ul	50-100 ng/ml		Uzama 72°C 1dk	
Total	20 ul				

U: Ünite (firmanın önerdiği protokollere göre kullanıldı)

#### 4.2.2. HIF-1 $\alpha$ G1790A bölgesi ARMS - PZR sonuçları

HIF-1 $\alpha$  genine ait G1790A (Alanin 588 Treonin) (rs11549467) polimorfizmini belirlemek için ARMS-PZR metodu tercih edildi ve online Primer1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>) veritabanı ile 2 primer çifti tasarlandı.

İçerden ileri primer (G allele):

5'-TCA GTT GTC ACC ATT AGA AAG CAG TTA CG -3' Tm: 65°C

İçerden geri primer (A allele):

5'- TGA GGA CTT GCG CTT TCA GGG CTG GT -3' Tm: 73°C

Dışardan ileri primer (5' - 3'):

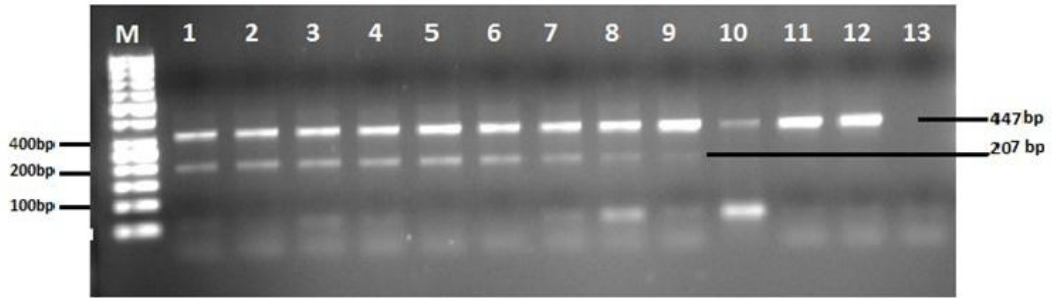
5'- GCT GAA GAC ACA GAA GCA AAG AAC CCA TTT -3' Tm: 69°C

Dışardan geri primer (5' - 3'):

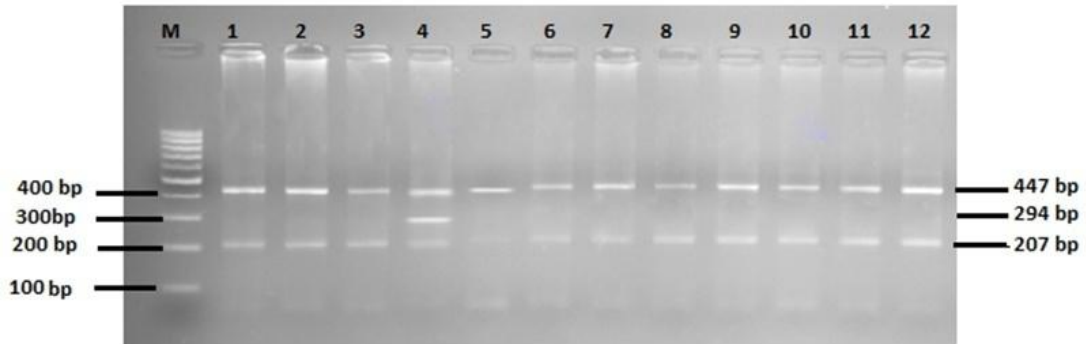
5'- ATG TGG GTA GGA GAT GGA GAT GCA ATC A -3' Tm: 69°C

Dışardan ileri primer ile içerden geri primer çifti normal alleli (294 bç) gösteren PZR ürününü, içerden ileri primer ile dışarıdan geri primer çifti mutant

alleli (207 bç) gösteren PZR ürününü oluşturdu. En dıştaki ileri ve geri primerler total PZR ürününü (447 bç) verdi. G1790A gen bölgesi 60-70°C sıcaklık gradient PZR görüntüsü Şekil 4.2’de; ARMS-PZR sonucu oluşan genotipler Şekil 4.3’de; G1790A polimorfizmi için PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları Tablo 4.3’de verildi.



Şekil 4.2. G1790A gen bölgesi 60-70 °C sıcaklık gradient PZR görüntüsü. (M: 50 bç’lik moleküler ağırlık belirteci, 5. kuyu bağlanma sıcaklığı olarak seçildi).



Şekil 4.3. G1790A gen bölgesi ARMS-PZR sonucu oluşan genotipler. ( M: 100bç’lik moleküler ağırlık belirteci, 4. Kuyu heterozigot GA genotipi, diğer kuyular ise değişim gözlenmeyen homozigot GG genotiplerini göstermektedir).



Tablo 4.3. G1790A bölgesi için PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları.

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon	1. basamak	2. basamak	3.basamak
ddH <sub>2</sub> O	16,8 ul		Ayrılma 95°C 4 dk.	Ayrılma 95°C 30sn	Son Uzama 72°C 7dk
Buffer	2,5 ul	50mM			
dNTP	0,5 ul	10mM			
Fw(dışarıdan)	0,625 ul	0.05mM		Primer Bağlanması 64,9°C 30sn	
Rw(dışarıdan)	0,625 ul	0.05mM			
Fw(içerden)	0,625 ul	0.05mM			
Rw(içerden)	0,625 ul	0.05mM			
Taq Poly.	0,2 ul	2,5 U/ul			
DNA	2,5 ul	50-100 ng/ml		Uzama 72°C 1dk	
Total	25 ul				

#### 4.2.3. VHL rs779805 gen bölgesi PZR-RFLP sonuçları

VHL geninde bulunan rs779805 kodlu polimorfizm bölgesini belirlemek için PZR-RFLP metodu tercih edildi ve online Primer3web ([http://primer3plus.com/web\\_3.0.0/primer3web\\_input.htm](http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm)) veritabanı kullanılarak bir primer çifti tasarlandı.

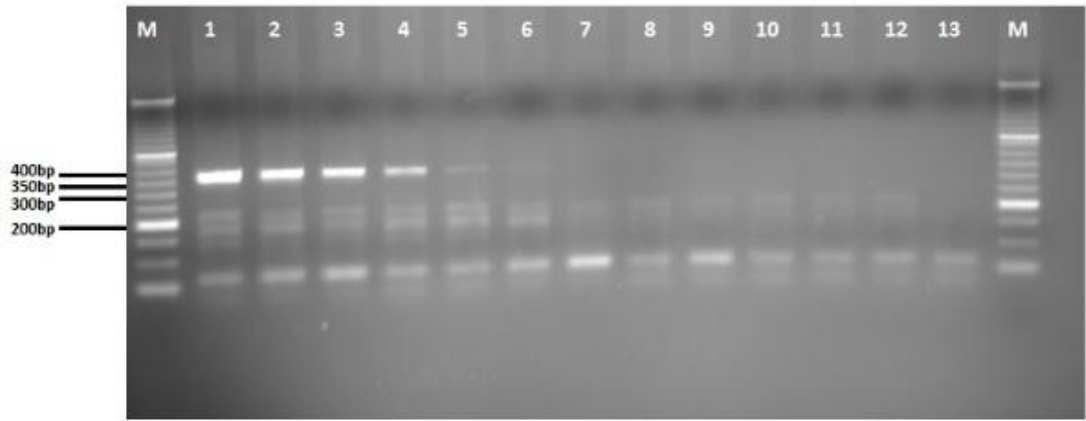
Kullanılan primer dizileri;

İleri primer 5'-CAGGGAGGTCAAGGCTGCAGTGAGCCAA-3' Tm: 75°C

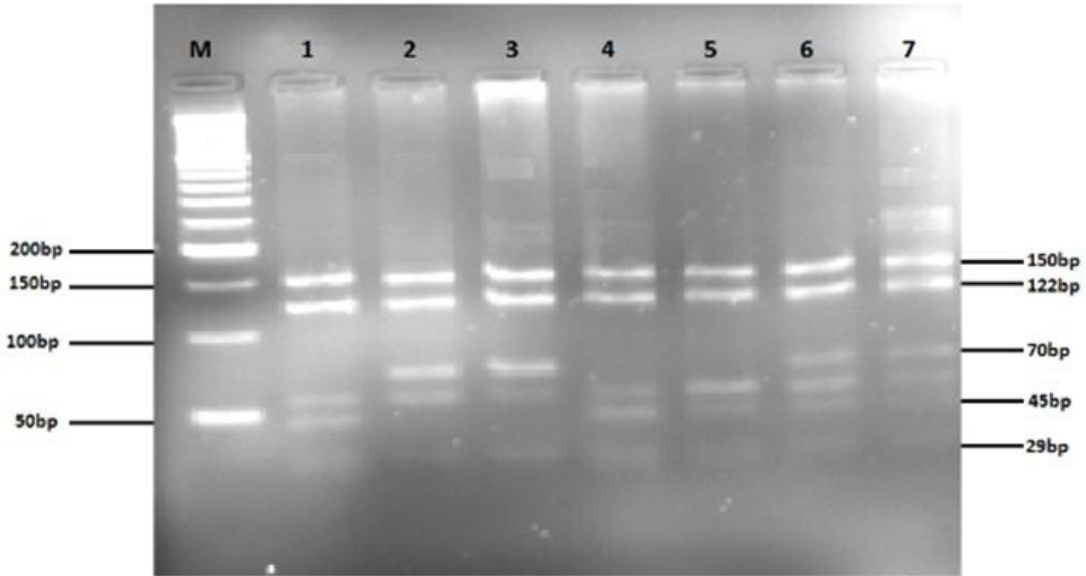
Geri primer 5'-CATTCCTCCGCGATCCAGACCACCC-3' Tm:74°C

*HaeIII*, *Haemophilus aegypticus*'den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA'yı GG↓CC dizisinden tanıyarak kesim yapar. PZR tepkimesi sonrası 372 bç'lik PCR ürünü *Hae III* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede guanin içeren allel *HaeIII* kesim noktası taşımaktadır. Guaninden→ Adenine (G→A) bir nükleotit değişimi olması halinde *HaeIII* enziminin tanıdığı bölge ortadan kalkmaktadır. Homozigot (AA) bireylerde 150bç, 122bç, 70bç, 29bç dört bant,

heterozigot (GA) bireylerde 150bç, 122bç, 70bç, 45bç, 29bç ve 25 bç'lik altı bant, homozigot (GG) bireylerde 150bç, 122bç, 45bç, 29bç ve 25 bç'lik beş bant görülecektir. VHL rs779805 gen bölgesi 71-75 °C sıcaklık gradient PZR görüntüsü Şekil 4.4'de; VHL rs779805 genotip görüntüleri Şekil 4.5'de; PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları Tablo 4.4'de verildi.



Şekil 4.4. VHL geni rs779805 gen bölgesi 71-75 °C sıcaklık gradient PZR görüntüsü (M: 50 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 1. kuyu bağlanma sıcaklığı olarak seçildi).



Şekil 4.5. VHL geni rs779805 polimorfizminin PZR-RFLP sonuçları (M: 50 bç'lik moleküler ağırlık belirteci, 2. ve 3. kuyular homozigot AA genotipleri, 1. 4. ve 5. kuyular homozigot GG genotipleri, 6. ve 7. kuyular heterozigot AG genotipleri göstermektedir).

Tablo 4.4. VHL (rs779805) gen bölgesi PZR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon	1. basamak	2. basamak	3. basamak
ddH <sub>2</sub> O	15,54 ul		Ayrılma 95°C 10 dk.	Ayrılma 94°C 1dk	Son Uzama 72°C 7dk
Buffer	2,5 ul	50mM			
Mg	2 ul	2,5 mM			
dNTP	1,6 ul	10mM			
Fw	0,28 ul	0.05mM		Primer Bağlanması 71,6°C 1dk	
Rw	0,28 ul	0.05mM			
Taq Poly.	0,8 ul	2,5 U/ul			
DMSO	1,875 ul	% 7,5			
DNA	2 ul	50-100 ng/ml		Uzama 72°C 90sn	
Total	25 ul				

#### 4.3. HIF-1 $\alpha$ C1772T polimorfizminin genetik modellere göre frekansları

Kolorektal kanser ve kontrollerde HIF-1 $\alpha$  C1772T polimorfizminin kodominant, dominant ve resesif genetik modellere göre frekansları Tablo 4.5’de verildi. Kodominant modele göre değerlendirildiğinde; kontrol grubunda CC genotipi 81 (%80.2), CT genotipi 16 (%15.8), TT genotipi 4 (%4) bireyde vardı. Hasta grubunda CC genotipi 62 (%67.4), CT genotipi 27 (%29.4), TT genotipi 3 (%3.3) bireyde bulundu. Genotipler arasında %95 güven aralığında (CI) hesaplanan Odds oranı (OR), CT genotipine sahip bireylerde hastalanma riskinin 2.20 (1.09-4.45) kat artmış olduğunu gösterdi. Genotiplerin frekansları homozigot modelle hesaplanırken, az olan homozigot mutant genotipler heterozigot genotiplerle birlikte değerlendirildi. CT/TT genotipleri kontrollerde 20 (%19.8), hasta grubunda 30 (%30.6) olarak tespit edildi (P<0.05). Odds oranı %95 güven aralığında hesaplandı ve 1.96 (1.02-3.77) olarak bulundu; ancak yaş, cinsiyet, ailede kanser öyküsü, beyaz toprak maruziyetine

göre ayarlanmış olan odds oranları (AOR) %95 güven aralığında 4.79 (1.07-21.48) olarak saptandı.

#### ***4.4. HIF-1 $\alpha$ G1790A polimorfizminin genotip frekansları***

Hasta ve kontroller arasında HIF-1 $\alpha$  G1790A polimorfizminin genotip dağılım frekansları Tablo 4.6'de verildi. Bu polimorfizm incelendiği dominant modele göre kontrol grubunda 98 (%97) bireyde GG genotipi, 3 (%3) bireyde GA genotipi; hasta grubunda 91 (%98.9) bireyde GG genotipi, 1 (%1.1) bireyde GA genotipi tespit edildi. Heterozigotların da çok az olduğu hasta ve kontrol grubunun her ikisinde de homozigot mutant (AA) genotipine rastlanmadı. Hasta ve kontroller arasında genotip dağılımlarını hesaplamak için Ki-kare ve Fisher exact testi kullanıldı. Hasta ve kontrol gruplarının genotip frekansları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $P>0.05$ ).

Tablo 4.5. Kolorektal kanser ve kontrol bireylerinde HIF-1 $\alpha$  C1772T polimorfizminin genetik modellere göre frekansları (SNPStats programı kullanıldı)

Model	Genotip	Kontrol	Hasta	P <sup>a</sup> -değeri	OR (95% CI)	P <sup>b</sup> -değeri	AOR (95% CI)	P <sup>c</sup> -değeri
Kodominant	C/C	81 (%80.2)	62 (%67.4)	0,079	1.00	0.078	1.00	0.11
	C/T	16 (%15.8)	27 (%29.4)		2.20 (1.09-4.45)		4.36 (0.89-21.39)	
	T/T	4 (%4)	3 (%3.3)		0.98 (0.21-4.54)		7.20 (0.55-94.93)	
Dominant	C/C	81 (%80.2)	62 (%67.4)	<b>0,049</b>	1.00	<b>0.042</b>	1.00	<b>0.036</b>
	C/T-T/T	20 (%19.8)	30 (%32.6)		<b>1.96 (1.02-3.77)</b>		<b>4.79 (1.07-21.48)</b>	
Resesif	C/C-C/T	97 (%96)	89 (%96.7)	>0,05	1.00	0.79	1.00	0.28
	T/T	4 (%4)	3 (%3.3)		0.82 (0.18-3.75)		4.47 (0.38-52.41)	

OR: Odds oranları; AOR: yaş, cinsiyet, ailede kanser öyküsü, beyaz toprak maruziyetine göre ayarlanmış olan odds oranları;

CI: güven aralığı (confidence intervals)

<sup>a</sup> Hasta ve kontroller arasında allel frekansları ya da genotip dağılımları için Ki-kare ( $\chi^2$ ) ve Fisher exact testi P değeri,

<sup>b</sup> Odds oranına göre p değeri,

<sup>c</sup> Ayarlanmış odds oranına göre p değeri.

Tablo 4.6. Kolorektal kanser ve kontrollerde HIF-1 $\alpha$  G1790A polimorfizminin genotip frekansları (SNPStats programı kullanıldı)

Model	Genotip	Kontrol	Hasta	P <sup>a</sup> -değeri	OR (%95 CI)	P <sup>b</sup> -değeri	AOR (%95 CI)	P <sup>c</sup> -değeri
--	G/G	98 (%97)	91 (%98.9)	0.623	1.00	0.35	1.00	0.48
	G/A	3 (%3)	1 (%1.1)		0.36 (0.04-3.51)		0.00 (0.00-N.A.)	

OR: Odds oranları; AOR: yaş, cinsiyet, ailede kanser öyküsü, beyaz toprak maruziyetine göre ayarlanmış olan odds oranları;

CI: güven aralığı (confidence intervals)

<sup>a</sup> Hasta ve kontroller arasında allel frekansları ya da genotip dağılımları için Ki-kare ( $\chi^2$ ) ve Fisher exact testi kullanıldı.

<sup>b</sup> Odds oranına göre p değeri,

<sup>c</sup> Ayarlanmış odds oranına göre p değeri.

NA: Bulunamayan değer (Null allele)

#### ***4.5. Kolorektal kanser ve kontrollerde VHL rs779805 polimorfizminin genetik modellere göre frekansları***

Kolorektal kanser ve kontrollerde VHL geninde tanımlanan rs779805 polimorfizminin kodominant, dominant ve resesif genetik modellere göre saptanan frekansları Tablo 4.7’de verildi. Kodominant modele göre değerlendirildiğinde; kontrol grubunda 63 (%62.4) bireyde AA genotipi, 24 (%23.8) bireyde AG genotipi, 14 (%13.9) bireyde GG genotipi; Hasta grubunda 48 (%52.2) bireyde AA genotipi, 31 (%33.7) bireyde AG genotipi, 13 (%14.1) bireyde GG genotipi saptandı. Genotip dağılımları dominant ve resesif modellerle de incelendi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (P>0.05).

Çalıştığımız her üç gen polimorfizminin tüm hasta ve kontrol gruplarına ait verilerinde Hardy-Weinberg eşitliğinden sapma olmadı.

Tablo 4.7. Kolorektal kanser ve kontrollerde VHL rs779805 polimorfizminin genetik modellere göre frekansları (SNPStats programı kullanıldı)

Model	Genotip	Kontrol	Hasta	P <sup>a</sup> -değeri	OR (%95 CI)	P <sup>b</sup> -değeri	AOR (%95 CI)	P <sup>c</sup> -değeri
Kodominant	A/A	63 (%62.4)	48 (%52.2)	0.281	1.00	0.28	1.00	0.67
	A/G	24 (%23.8)	31 (%33.7)		1.70 (0.88-3.25)		0.56 (0.14-2.26)	
	G/G	14 (%13.9)	13 (%14.1)		1.22 (0.52-2.83)		1.11 (0.18-6.74)	
Dominant	A/A	63 (%62.4)	48 (%52.2)	>0.05	1.00	0.15	1.00	0.55
	A/G-G/G	38 (%37.6)	44 (%47.8)		1.52 (0.86-2.70)		0.69 (0.20-2.35)	
Resesif	A/A-A/G	87 (%86.1)	79 (%85.9)	0.190	1.00	0.96	1.00	0.75
	G/G	14 (%13.9)	13 (%14.1)		1.02 (0.45-2.31)		1.33 (0.23-7.58)	

OR: Odds oranları; AOR: yaş, cinsiyet, ailede kanser öyküsü, beyaz toprak maruziyetine göre ayarlanmış olan odds oranları;

CI: güven aralığı (confidence intervals)

<sup>a</sup> Hasta ve kontroller arasında allel frekansları ya da genotip dağılımları için Ki-kare ( $\chi^2$ ) ve Fisher exact testi,

<sup>b</sup> Odds oranına göre p değeri,

<sup>c</sup> Ayarlanmış odds oranına göre p değeri.

Tablo 4.8. Kolorektal kanserin klinik ve patolojik özelliklerinin genotiplere göre dağılımı

Risk Faktörleri	C1772T			G1790A			VHL rs779805			
	CC	CT+TT	P değeri	GG	GA+AA	P değeri	AA	AG	GG	P değeri
<b>Cinsiyet</b>										
Erkek	37	11	<b>0.047</b>	48	0	0.478	24	17	7	0.908
Kadın	25	19		43	1		24	14	6	
<b>Ailede Kansere Öyküsü</b>										
Yok	44	14	<b>0.037</b>	58	0	0.370	34	20	4	<b>0.029</b>
Var	18	16		33	1		14	11	9	
<b>Eşlik eden Hastalık</b>										
Yok	35	17	>0.05	51	1	>0.05	26	15	11	0.077
Var	27	13		40	0		22	16	2	
<b>Sigara Kullanımı</b>										
Hayır	42	23	0.468	27	0	>0.05	34	19	12	0.119
Evet	20	7		64	1		14	12	1	
<b>Alkol Kullanımı</b>										
Hayır	56	29	0.420	84	1	>0.05	44	28	13	0.523
Evet	6	1		7	0		4	3	0	
<b>Beyaz Toprak Maruziyeti</b>										
Hayır	24	15	0.370	39	0	>0.05	22	9	8	0.108
Evet	38	15		52	1		26	22	5	
<b>Astlar Coller Evresi</b>										
B1	4	2	0.328	6	0	0.962	4	2	0	0.132
B2	15	2		17	0		12	5	0	
C1	2	0		2	0		1	0	1	
C2	11	8		19	0		8	5	6	
D	1	1		2	0		2	0	0	
Bilinmeyen	29	17		45	1		21	19	6	
<b>Grade</b>										
Grade 1	7	1	0.389	8	0	0.752	4	3	1	0.556
Grade 2	27	13		40	0		23	10	7	
Grade 3	2	0		2	0		2	0	0	
Bilinmeyen	26	16		41	1		19	18	5	



#### ***4.6. Kolorektal kanserin klinik ve patolojik özelliklerinin genotiplere göre***

##### ***dağılımı***

Kolorektal kanserin klinik ve patolojik özelliklerinin HIF-1 $\alpha$  C1772T, G1790A ve VHL rs779805 genotiplerine göre dağılımı Tablo 4.8’de verildi. Hastalar cinsiyet, ailede kanser öyküsü, eşlik eden hastalıklar, sigara ve alkol kullanımı, beyaz toprak maruziyeti, ulaşılabilen Astler Coller evreleri ve hastalık derceleri gibi klinik ve patolojik özelliklere göre ayrı ayrı sınıflandırıldı. Hastalarda kaydedilen her bulgu ile her üç polimorfizm (HIF-1 $\alpha$  C1772T C>T değişimi için CC, CT/TT genotipleri; HIF-1 $\alpha$  G1790A G>A değişimi için GG, GA/AA genotipleri; VHL rs779805 A>G değişimi için AA, AG ve GG genotipleri) Ki-kare ( $\chi^2$ ) ve Fisher Exact testleri kullanılarak karşılaştırıldı. Kolorektal kanserin klinik ve patolojik özellikleri ile her üç polimorfizmin genotip dağılımları değerlendirildi, C1772T polimorfizminin CT/TT genotipleri kadınlarda ve ailede kanser öyküsü olanlarda; VHL rs779805 polimorfizminin GG genotipleri ailede kanser öyküsü olanlarda olmayanlara göre yüksekti. Genotip dağılım grupları arasındaki her bir karşılaştırma için elde edilen P değerleri Tablo 4.8’de verildi.

## 5. TARTIŞMA

HIF-1 $\alpha$ , fizyolojik birtakım olayları kontrol eden ve oksijen homeostazında kritik bir rol oynayan transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir (Semenza 1999; Prior ve ark. 2003; Yamada ve ark. 2005; Naidu ve ark. 2009; Semenza 2010). Tümörlerde çoğunlukla hipoksi gelişir, hipoksiye hücrenin uyumu ise HIF-1 $\alpha$ 'nın artan ekspresyonu, nükleusa geçerek HIF-1 $\beta$  ile heterodimer oluşturması ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmasıdır (Bahadori ve ark. 2010; Knechtel ve ark. 2010; Jiang ve ark. 2011; Manohar ve ark. 2011). HIF-1 $\alpha$  P582S ve A588T polimorfizmlerinin normal genotipe göre anlamlı derecede daha yüksek transkripsiyonel aktivite ve artmış anjiogenesisiz gösterdikleri bildirilmiştir (Tanimoto ve ark. 2003; Naidu ve ark. 2009). Bu nedenle HIF-1 $\alpha$  C1772T (P582S) ve G1790A (A588T) gen polimorfizmlerinin bireyler arasında HIF-1 $\alpha$  ifadenmesini değiştirebileceği, hastalık patolojilerinde buna eşlik edebileceği düşünülerek HIF-1 $\alpha$  polimorfizmleri ve hedef genleri özellikle renal hücre kanserlerinde olmak üzere kolon, meme, over, akciğer, deri, pankreas ve prostat kanserlerinde araştırılmıştır (Ollerenshaw ve ark. 2004; Zhong ve ark. 2004; Chau ve ark. 2005; Fransen ve ark. 2006; Thiery ve ark. 2006; Apaydın ve ark. 2008; Botteri ve ark. 2008; Kim ve ark. 2008; Munoz-Guerra ve ark. 2009; Dales ve ark. 2010, Knechtel ve ark. 2010, Altıntaş ve ark. 2011, Putra ve ark. 2011, Girgis ve ark. 2012; Havelund ve ark. 2012; Qin ve ark. 2012; Schwab ve ark. 2012).

Normal oksijen konsantrasyonunda, HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijen bağımlı degradasyon bölgesinde bulunan iki prolinin hidroksilasyonu ve bir lizin residüsünün asetilasyonu HIF-1 $\alpha$ 'nın bir tümör baskılayıcı gen olan VHL proteininin E3 ligaz kompleksiyle ilişkisini tetikleyerek ubiquitin-proteazom yoluyla yıkımına sebep olmaktadır (Bangiyeva ve ark. 2009; Semenza 2009). Hücre içerisindeki HIF-1 $\alpha$  regülasyonunu sağlamada önemli rol alan VHL'nin gen varyasyonlarına, allel kayıplarına ve promotör bölge metilasyonuna bağlı VHL hastalıkları pek çok çalışmanın konusu olmuştur (Tsutsumi ve ark. 2003; Kaelin ve ark. 2004; Kuwai ve ark. 2004; Liu ve ark. 2004; Hes ve ark. 2005; Giménez-Bachs ve ark. 2006; Arjumand ve Sultana 2012; Chen ve ark. 2012; Domene ve Illington 2012). HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijen-bağımlı degradasyon bölgesinde bulunan SNP'lerin kanser riski üzerindeki etkileri birçok defa çalışılmış olmakla birlikte bunların kolorektal kanserdeki rolü hala belirsizdir.

Bu tez çalışması, HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijen bağlama bölgelerinde bulunan P582S aminoasit değişimini oluşturan C1772T (rs11549465) ve A588T aminoasit

değişimini oluşturan G1790A (rs11549467) polimorfizmleri ile HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijen-bağımlı degradasyonunu regüle eden VHL genin 5'UTR bölgesindeki fonksiyonel rs779805 genetik varyasyonunun kolorektal kanser riski ile ilişkisini araştıran ilk çalışmadır.

HIF-1 $\alpha$  C1772T polimorfizmi dominant modele göre incelendiğinde; homozigot mutant (TT) genotipler az sayıda bulunmuş ve heterozigot (CT) genotipler ile birlikte değerlendirilmiştir. Hasta grubunda CT/TT genotipleri kontrollerden fazla olup hesaplanan odds oranı 1.96 (1.02-3.77) bulunmuştur. Bu riskin birinci derece akrabalarında kolorektal kanser öyküsü (1.7) olanlara yakın bir risk olduğu görülmüştür. Ayrıca bu risk faktörleri birlikte değerlendirilerek yaş, cinsiyet, ailede kanser öyküsü, beyaz toprak maruziyetine göre ayarlanmış olan odds oranı (AOR) 4.79 (1.07-21.48) olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar CT/TT genotipli bireylerin yaklaşık 2 kat ve yaş, cinsiyet, ailede kanser öyküsü, beyaz toprak maruziyeti gibi artı risk faktörlerinin bulunması ile 5 kata yaklaşan bir risk taşıdıklarını ortaya koymaktadır. İstendiğinde bu risk faktörlerinden hangilerinin bulunduğuna göre hastalanma olasılıkları hesaplanabilir ve önerilen tanı tetkikleri ile takipleri sağlanabilir.

Foley ve ark. (2009), HIF-1 $\alpha$  C1772T polimorfizminin prostat kanserli hastalarda artmış bir risk faktörü olduğunun ilk kanıtını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada tümör örneklerinden ekstrakte edilen DNA'lar kullanılmış, bizim çalışmamızda periferik kandan elde edilen DNA örnekleri kullanılarak benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda diğer HIF-1 $\alpha$  G1790A polimorfizmi değerlendirildiğinde, genotiplerin %97'si GG olup, GA genotipi 3 kontrol ve 1 hastada bulunmuş; homozigot mutant AA genotipi ise iki grupta da bulunmamıştır. İstatistiksel analizler kolorektal kanser yatkınlığı ile genotipler arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir. Heterozigot genotiplerinde çok az bulunduğu bu polimorfizmin hastalıklarla etkileşimini belirleyebilmek için, belki de çok fazla sayıda genotip incelemek gerekebilir. Naidu ve ark. (2009), çalışmalarında bizim çalıştığımız iki bölgenin (C1772T, G1790A) rolünü kanser olgularında değerlendirmişler, sadece HIF-1 $\alpha$  C1772T değişimlerinin kanser yatkınlığı ile ilgili olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızın sonuçları bu çalışmanın verileri ile uyumlu görünmektedir.

Çalıştığımız üçüncü bölge, ilk olarak kolorektal kanserde incelenen bir tümör baskılayıcı gen VHL rs779805 polimorfizmidir. Kontrollerde homozigot AA

genotipleri %62.4, heterozigot AG genotipleri %23.8, homozigot (GG) genotipleri %13.9; hasta grubunda, homozigot AA genotipleri %52.2, heterozigot AG genotipleri %33.7, homozigot GG genotipleri %14.1 bulunmuştur. Bulgularımız heterozigotların ve homozigot mutant genotiplerin oldukça fazla olduğunu; ancak hiçbirinin kolorektal kanser riski ile ilişkili olmadığını ortaya koymuştur. Chen ve ark. (2012), bizim çalıştığımız VHL rs779805 polimorfizmi ile prostat kanseri arasındaki ilişkiyi Çin toplumunda araştırarak prostat kanser riski ile A>G değişimi arasında anlamlı ilişki bulmuşlar; AG/GG genotiplerinin prostat kanserinde azalan riske sahip olduğunu, ayrıca sigara içmeyen, içki kullanmayan, ailesel kanser öyküsü olmayan alt gruplarda bu azalmanın daha da fazla olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda saptadığımız genotip dağılımlarında benzerlik vardı: ancak genotiplerle kolorektal kanser arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Hasta ve kontrol gruplarında, hasta onam formuna göre sorguladığımız bilgiler değerlendirildi. Hasta ve kontrollerin vücut kitle indeksi dağılımları arasında anlamlı bir fark yoktu. İleri yaş, erkek cinsiyet, ailede kanser öyküsü, eşlik eden hastalıklar ve beyaz toprak maruziyetinin kolorektal kanser için birer risk faktörü olduğu istatistiksel analizlerle belirlendi. İleri yaşın, erkek cinsiyetin, ailede kanser öyküsünün kolorektal kanser için birer risk faktörü olduğu, daha önceki çalışmalarda bildirmiş olup, bulgularımız bu sonuçlar ile uyumludur (Telatar ve Şimşek 1993; Cooper ve Hausman 2004; Drake ve ark. 2007; Alberts ve ark. 2008; Akın 2009).

Çalışmamızda, hasta grubunda beyaz toprağa (asbest) maruz kalanların oranı kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda fazla bulunmuştur. Bu bulgu, Büyükdoğan ve ark. (2009) tarafından, kolorektal kanserli hastalarda yapılan bir araştırmanın sonuçları ile uyumludur ve bazı çevresel faktörlerin kolorektal kanser için risk oluşturabileceğini gösteren anlamlı bir örnektir.

Hastalarda, sistemik hastalıkların kontrollerden fazla olduğu görüldü; ancak crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi iltihabi barsak hastalıkları dışında, diğerlerinin kolorektal kanser riskine özgü olmayıp, ileri yaşlarda bu hastalıkların görülme sıklığında artış olduğu bilinmektedir. Bu durumun hastalarla kontrollerin yaş ve cinsiyet uyumunun olmamasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamız planlanırken “polimorfizmler hayat boyu sabittir yaş ve cinsiyetle ilişkili değildir” gerçeğinden hareketle, kolorektal kanserlerde yaşın ve cinsiyetin etkilerini saptayabilmek için kontrollerin genel cerrahi polikliniğine sıradan başvuran bireylerden seçilmesi uygun bulunmuştur.

VHL rs779805 polimorfizmini çalışan Chen ve ark. (2012), sigara ve alkol kullanmayanlarda prostat kanser riskinin azaldığını bildirmişlerdir. Li ve ark. (2006) bir çalışmada, Schutte ve ark. (2009) diğer bir çalışmada, hepatoselüler karsinomada sigara ve alkol tüketiminin HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunu arttırdığını; Bailey ve ark. (2009) sigara ve alkol tüketiminin her ikisinin de karaciğer hastalıkları için risk faktörü olduğunu açıklamışlardır. Hsiao ve ark. (2010), hepatoselüler karsinomada sigara ve alkol tüketiminin HIF-1 $\alpha$  G1790A polimorfizm duyarlılığına etkisini araştırmışlar, özellikle hepatoselüler karsinoma oluşumunu moleküler düzeyde etkilediğini saptadıkları sigara ve alkol kullanımının kontrollerde hasta grubundan sayıca daha fazla olmasını çok irdelediklerini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da kontrollerde sigara ve alkol kullananların sayısı hastalardan daha fazla bulunmuştur; ancak kayıtlarımız mevcut durumdaki kullanıcı sayısını vermekte, incelediğimiz polimorfizmlerin kolorektal kanser oluşumundaki etkilerini yansıtmamaktadır. Bizim bu konudaki görüşümüz, daha ayrıntılı araştırmalar yapılması, örneğin; hastaların mevcut durumun ötesinde, daha önce sigara ve alkol kullanıp kullanmadıkları, kullandırsa hangi aralıklarla hangi miktarlarla tükettikleri ve bu konudaki alışkanlıklarının neler olduğu gibi ayrıntılı sorgulanması ve yeni çalışmalar planlanarak hastalığı tetikleme mekanizmalarının aydınlatılması gerektiği yönündedir.

İncelediğimiz HIF-1 $\alpha$  C1772T, G1790A ve VHL rs779805 polimorfizmlerinin her birinde elde ettiğimiz genotipler, hastaların cinsiyet, ailede kanser öyküsü, eşlik eden hastalıklar, sigara ve alkol kullanımı, beyaz toprak maruziyeti, ulaşılabilen Astler Coller evreleri ve hastalık dereceleri gibi klinik ve patolojik özellikleri ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında C1772T polimorfizminde CT/TT genotipleri kadınlarda ve ailede kanser öyküsü olanlarda (kadınlar için artı risk faktörleri), VHL rs779805 polimorfizminde GG genotipleri ailede kanser öyküsü olanlarda yüksek bulunmuş; ancak genotip dağılımlarına göre değerlendirmede hasta sayısı çok az olduğundan diğer genotip grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Fransén ve ark. (2006), HIF-1 $\alpha$  P582S veya A588T polimorfizmlerinden herhangi birinde bir polimorfik allel taşıyan hastalarda ülseratif kolorektal kanser olma riskinin daha yüksek olduğunu göstermişler, mekanik temelinin bilinmemesine rağmen HIF-1 $\alpha$  A588T allelinin tümör lokasyonu ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Munoz-Guerra ve ark. (2009), tarafından yapılan bir çalışmada ise HIF-1 $\alpha$  A588T

SNP'nin oral skuamöz hücre karsinomasına yatkınlık kazandırdığı ve olumsuz bir prognozun erken evre belirteci olabileceği gösterilmiştir. Knechtel ve ark. (2010), çalışmalarında A588T alleli taşıyan kolorektal kanser hastalarında daha büyük tümör bulunma olasılığının arttığını savunmuşlardır. Koukourakis ve ark. (2006), hipoksi tarafından regüle edilen moleküler aktivasyon yollarında, aneminin rolünü araştırmışlar, HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  regülasyonlarının anemiyle ilişkili olmadığını bulmuşlardır.

HIF-1 $\alpha$  eksikliği olan hücrelerde tümör büyümesinin azaldığı gösterilmiştir (Ryan ve ark 2000). P582S ve A588T SNP'lerinin her ikisi de in vitro koşullarda HIF-1 $\alpha$ 'nın artmış transaktivasyon kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir (Tanimoto ve ark. 2003). Prostat kanserleriyle çalışan grupların bir kısmı tarafından prostat kanser riski ile HIF-1 $\alpha$  polimorfizmleri arasında bir ilişkinin olmadığı rapor edilirken (Li ve ark. 2007; Orr-Urtreger ve ark. 2007; Jacobs ve ark. 2008), diğer bir çalışmada prostat kanserli hastalardan alınan örneklerden hazırlanan in vitro deney serilerinde C1772T polimorfizmi tanımlanmış; P582S değişiminin normokside HIF-1 $\alpha$ 'yı stabilize ettiği ve aktivitesini artırdığı ifade edilmiştir (Tanimoto ve ark. 2003; Fu ve ark. 2005). Androjen-bağımsız prostat kanserlerinde de HIF-1 $\alpha$  P582S polimorfizmi tümör yatkınlığıyla anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur (Ollerenshaw ve ark. 2004; Chau ve ark. 2005).

Hızlı büyüyen solid tümörlerde hipoksi, daha malign fenotiplerin oluşumu için katkı sağlayan önemli bir mikro-çevresel faktördür; anjiyogenezi indükler ve anaerobik metabolizmaya geçişi sağlamayı da içeren uyumsal tepkileri tetikler, zira tümör hücrelerinin yayılması damar oluşumu ve hücre sağ kalımı ile orantılıdır (Manohar ve ark. 2011). Erken evreli meme kanserlerinden alınan biyopsi örneklerinde yapılan immünohistokimyasal bir çalışmada meme kanseri hücrelerinde HIF1 $\alpha$ 'nın ifadenmesinin arttığı görülmüş; fakat bunun polimorfizmlerle ilişkisi saptanamamıştır (Vleugel ve ark. 2005). Diğer bir çalışmada normal oksijen basıncında HIF-1 $\alpha$  aktivitesini artıran varyasyonlar saptanmış ve HIF1 $\alpha$ 'nın hedef genlerinden VEGF'nin yüksek oranda ifadelendiği gösterilmiştir (Fu ve ark. 2005). Kim ve ark. (2008), HIF-1 $\alpha$  P582S alleli taşıyan meme kanserli hastalarda olumsuz sonuçlar bildirmişler; Apaydin ve ark. (2008), ise HIF-1 $\alpha$  gen varyasyonlarıyla meme kanseri yatkınlığı arasında bir ilişki bulmamışlardır. Dales ve ark. (2010), ilk kez HIF-1 $\alpha$ 'nın mRNA'nın alternatif kesip-ekleme sonucu farklı kombinasyonlarda işlenmesi ile oluşan varyantlarını meme kanserinin gelişimi ve kötü prognozu ile

ilişkilendirmişler; Schwab ve ark. (2012), ise HIF-1 $\alpha$ 'nın, tümör hücrelerini kısmen regüle ederek, primer meme tümörlerinin gelişiminde anahtar bir rol oynadığını in vivo olarak gösteren ilk verileri sunmuşlardır.

Fu ve ark. (2010), tarafından yapılan bir çalışmada hipoksinin, damarların yeniden oluşumunda çok önemli bir rol aldığı ve damarsal düz kas hücrelerini doğrudan etkilediği gösterilmiştir. Bahadori ve ark. (2010), periferel arter hastalıklarında, HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijenle düzenlenmesinde önemi olan iki polimorfizmi (P582S, A588T) çalışmışlar ve bu varyasyonların HIF-1 $\alpha$ 'nın ekspresyonunu, stabilizasyonunu ve transaktivasyon kapasitesini etkilediğini göstermişler, diğer polimorfizmlerin de periferel arter hastalıkları riskiyle alakalı olup olmadıklarının araştırılmasının gereğini vurgulamışlardır.

Mikro çevresel bir etken olarak hücrel hipoksinin, tümör metastazında kötü prognoza etkileri birçok çalışmada incelenmiştir (Secomb ve ark. 1993; Reynolds ve ark. 1996; Vaupel 2004; Vaupel ve ark. 2007; Avni ve ark. 2011; Jiang ve ark. 2011). Tümörü besleyen mikro damarların yapı ve fonksiyonlarına ek olarak kanın oksijen transport kapasitesinin azalmış olmasına bağlı olarak ortaya çıkan oksijen yetersizliği, tümör içersinde fonksiyonel damardan uzaklığa bağlı bir azalma oluşmasına yol açar ve böylece fonksiyonel damar çevresindeki tümör hücreleri daha iyi oksijenlenirken, uzak olanlar zayıf oksijenlenir. Tümörlerde düzensiz kan akışı tümör hücrelerinde kronik hipoksiye sebep olurken, kesikli kan akışına sahip bölgelerde akut hipoksi oluşmaktadır (Secomb ve ark. 1993). Hipoksinin, indüklenmiş apoptozise direnç gösterdiği, hücreleri radyasyon ve kemoterapiden koruduğu fark edilmiş, dolayısı ile klinik denemelerde hipoksi kötü prognoz habercisi olarak tanımlanmıştır (Reynolds ve ark. 1996; Vaupel 2004; Vaupel ve Mayer 2007). Hipoksiye cevap olarak yayılan tümör hücrelerinde hücre çoğalmasını, hücre sağ kalımını ve anjiyogenezi destekleyen moleküler programlar indüklenir. Hücrel oksijendeki değişimleri algılama ve cevaplama sorumlu bu pleotropik olayların çoğu HIF-1 $\alpha$  tarafından düzenlenmektedir (Lu ve Kang 2010; Avni ve ark. 2011). Yeni tedavi stratejileri planlanırken, birçok kanserde HIF-1 $\alpha$  protein seviyelerinin ön kestirim biyomarkırı olarak kullanılabilceği vurgulanmıştır (Bardos ve Ashcroft 2004; Liao ve ark. 2007; Vaupel ve ark. 2007).

HIF-1 $\alpha$  ile yapılan çalışmalarda başka bir ayrıntı ortaya çıkmıştı; HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunun sadece oksijen basıncı tarafından kontrol edilmediği; ayrıca Ras, Src, fosfoinositol 3-kinaz gibi onkogenlerin aktivasyonu ya da VHL, p53 gibi tümör

baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı ile normoksik koşullar altında da HIF-1 $\alpha$  proteininin tümör hücrelerinde normal dokulardakinden daha fazla toplandığı gösterilmiştir (Bardos ve Ashcroft 2004). Özellikle bir tümör baskılayıcı gen olan VHL'nin HIF'in baskılanması ve ubikütin aracılığı ile degradasyonunu sağlamadaki rolü böbrek hücreli tümörler başta olmak üzere birçok hastalıkta incelenmiş; mutasyon veya promotör metilasyonu ile oluşan VHL fonksiyon aberasyonlarının HIF-1 $\alpha$  proteinin yıkılmayarak toplanmasına sebep olduğu ve bununda bir dizi hipoksiye cevap genlerinin transkripsiyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Manohar ve ark. 2011; Arjumand ve Sultana 2012). Diğer yandan VHL geninde bulunan mutasyonların HIF-1 $\alpha$  ile bağlanma kapasitesini değiştirerek HIF-1 $\alpha$ 'nın zayıf bir bağ yapmasına sebep olduğu ve bu durumun kanser ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Jaakola ve ark. 2001; Min ve ark. 2002; Lonser ve ark. 2003; Kuwai ve ark. 2004; Manalo ve ark. 2005).

VHL proteininin fonksiyonlarından en iyi belirlenmiş olanı HIF-1 $\alpha$ 'nın baskılanması ya da ubikütin aracılığı ile degradasyonunun hedeflenmesindeki rolüdür (Stickle ve ark. 2005; Ohh 2006; Arjumand ve Sultana 2012). Mutasyon veya promotör metilasyonu ile oluşan VHL fonksiyon aberasyonları HIF-1 $\alpha$  toplanmasına sebep olur ki bu da epidermal büyüme faktörü, vasküler endotel büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve diğer proanjiyogenik faktörler dahil bir dizi hipoksi cevap genlerinin transkripsiyonunu aktifler ve böylece bir tümörün oluşumu için önkoşul olan kan damarı oluşumunu hızlandırır (Arjumand ve Sultana 2012). Son 15 yılda VHL gen mutasyonları en çok tümör bağımlı anjiyogeneziste aldıkları rol nedeniyle böbrek hücreli tümörlerde (BHT) araştırılmış ve VHL geninin sıklıkla mutasyona uğradığı bulunmuştur (Hamano ve ark. 2002; Schraml ve ark. 2002; Giménez-Bachs ve ark. 2006). Sporadik BHT'lerin çoğunda VHL promotör bölgesinde hipermetilasyon olduğu belirtilmiş, VHL geninin metilasyon paternini değiştiren durumların ya da VHL promotör bölgesindeki mutasyonların hastalığın patogenezinde etkili olabileceği savunulmuştur (Ohh ve ark. 1998; Martinez ve ark. 2000; Davidowitz ve ark. 2001; Clifford ve ark. 2001; Rannala 2001; Altıntaş ve ark. 2011; Moore ve ark. 2011). VHL gen mutasyonu görülmeden ortaya çıkan BHT'lerde ise mutasyonların bir kısmının diğer tümör baskılayıcı genlerden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Martinez ve ark. 2000).

Roe ve ark. (2006), VHL ile hücre döngüsünün kontrolünde ve apoptozda çok önemli regülatör olan p53 arasında umulmayan bir bağlantıyı rapor etmişler; VHL



proteininin, Mdm2 (onkogenik E3 ubiquitin ligase murine double minute 2) aracılığı ile ubikütinasyonunu baskıladığı, p53'e direkt bağlanıp onu stabilize ettiğini göstermişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalar bu bulguları desteklemiş, VHL proteininin Mdm2 aracılığı ile p53 ubikütinasyonunu baskılayarak, pozitif düzenleyici olduğu gösterilmiştir (Arjumand ve Sultana 2012). Daha sonra bu bulgular BHT hücrelerinde denenmiş, VHL bloklandığında BHT hücrelerinde apoptozisin durduğu ve DNA tahribatı nedeniyle anormal hücre döngüsü oluştuğu, VHL restore edildiğinde ise normale dönmeye mümkün olduğu rapor edilmiştir (Roe ve ark. 2006; Arjumand ve Sultana 2012).

Carmen ve ark. (2012), hayvan hücrelerinde VHL'nin hipoksi cevap yolu regülasyonunun temel olaylarını incelemişlerdir. Bilgisayar simülasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmada HIF-1 $\alpha$  ve VHL'nin mutant formu arasındaki etkileşimlerde yapısal re-organizasyonlar için atomik detayların durumu matematiksel analiz çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Farklı hesaplamalar ile elde edilen sonuçlar, VHL geninde oluşan her türlü mutasyonunun VHL proteininin doğal yapısındaki stabiliteyi bozduğunu göstermiştir. HIF-VHL kompleksi gibi proteinlerde atomik seviyede yeniden yapılanma sırasında enerji değişimlerini de içeren hesaplamalar yapılması ve araştırmaların bu boyutlara ulaşması, ileride kolorektal kanserler dahil birçok hastalığın tanı ve tedavisi için ümit verici gelişmelerin habercisi olduğu kanısındayız.

İncelediğimiz HIF-1 $\alpha$  C1772T, G1790A ve VHL rs779805 polimorfizm araştırmalarının birçoğunda tümör örneğinden izole edilen DNA'lar kullanılmış; HIF-1 $\alpha$  protein düzeyi, tümörün klinik-patolojik yönleri, daha büyük ve daha agresif olma eğilimi polimorfizmler ile ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Bizim çalışmamızda periferik kandan elde edilen DNA örnekleri kullanılmış ve bu polimorfizmlerin kolorektal kanser için bir risk faktörü olup olmadığının belirlenmesi ve hastalanmadan önce genetik yatkınlığı olan bireylerin tarama testleri ile takip edilebilmesi üzerine kurgulanmış; HIF-1 $\alpha$  C1772T polimorfizminin CT/TT genotiplerinin tarama ve erken tanıda yarar sağlayabileceği bulunmuştur.

Sonuç olarak; amaçlarımız açısından incelediğimiz HIF-1 $\alpha$  C1772T, G1790A ve VHL rs779805 polimorfizmlerinin hasta ve kontrollerin her birinde elde ettiğimiz genotip oranları ve hastaların yaş, cinsiyet, ailede kanser öyküsü, eşlik eden hastalıklar, sigara ve alkol kullanımı, beyaz toprak maruziyeti, ulaşılabilen Astler Coller evreleri, hastalık dereceleri gibi klinik ve patolojik özellikleri ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında;

a) HIF-1 $\alpha$  geninde tanımlanan C1772T (rs11549465) polimorfizminin CT/TT genotiplerinin; ayrıca ileri yaşın, erkek cinsiyetin, ailede kanser öyküsünün, eşlik eden hastalıkların ve beyaz toprak maruziyetinin kolorektal kanser açısından birer risk faktörü olabileceği,

b) Klinik ve patolojik özelliklerin genotiplere göre dağılımına bakıldığında C1772T polimorfizminde CT/TT genotiplerinin kadınlarda ve ailede kanser öyküsü olanlarda (kadınlar için artı risk faktörleri) yüksek bulunabileceği,

c) VHL rs779805 polimorfizminde GG genotipinin ailede kanser öyküsü olanlarda yüksek bulunabileceği saptanmıştır.

Ancak çalışmamızı sınırlandıran bir durum ise, genotip dağılımlarına göre klinik ve patolojik özellikler değerlendirildiğinde; hasta sayımızın az olmasıydı. Bu nedenle daha fazla sayıda hastanın çalışma kapsamına alınabileceği yeni araştırmaların planlanmasını öneriyoruz.

## 6. KAYNAKLAR

1. Akarsu AN, Çakır B. Psikiyatrik genetik araştırmalarda kullanılabilir genetik yöntemler: Hastalık Geni Haritalaması. 3 Der. 2004; 12(1): 31-48.
2. Akın T. Rektum ve rektosigmoid kanserlerin tedavisinde laparoskopik cerrahinin perioperatif ve erken dönem onkolojik sonuçları ile yaşam kalitesine etkisi. Dr.Lütfü Kıdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, I.Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2009 (Klinik Şefi: Doç.Dr.Mustafa Öncel).
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (Çev: Bayru N, Dalay N, Özgüç M, Öztürk M, Sakızlı M). Hücrenin Moleküler Biyolojisi. 4. Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi, 2008; p: 1313-1362.
4. Altıntaş R, Durmaz AA, Turna B, Onay H, Özkınay F, Cüreklibatır İK. Böbrek tümörlü hastalarda VHL gen mutasyonu. Türk Üroloji Dergisi - Turkish Journal of Urology. 2011; 37(3): 191-197.
5. Apaydın I, Konac E, Onen HI, Akbaba M, Tekin E, Ekmekçi A. Single nucleotide polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) gene in human sporadic breast cancer. Neoplasma. 2008; 39: 338-345.
6. Apeşos A, Papadopoulou E, Belogiani I, Baratsis S, Triantafillidis JK, Kosmidis P, Karydas E, Briasoulis E, Pisiotis C, Papazisis K, Nasioulas G. Inherited cancer predisposition in Greece. Anticancer Res. 2008; 28 (2B): 1341-1347.
7. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. baskı, Ankara, Güneş Kitabevi. 2001; 251-261.
8. Arima T, Kamikihara T, Hayashida T, Kato K, Inoue T, Shirayoshi Y, Oshimura M, Soejima H, Mukai T, Wake N. ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. Nucleic Acids Res. 2005; 33(8): 2650-60.
9. Arjumand W, Sultana S. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma. Tumor Biol. 2012; 33: 9-16.
10. Aso T, Lane WS, Conaway JW, Conaway RC. Elongin (SIII): A multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. Science. 1995; 269: 1439-43.
11. Avni R, Cohen B, Neeman M. Hypoxic stress and cancer: Imaging the axis of evil in tumor metastasis. NMR Biomed. 2011; 24: 569-581.

12. Bahadori B, Uitz E, Mayer A, Harauer J, Dam K, Truschnig-Wilders M, Pilger E, Renner W. Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene peripheral artery disease. *Vascular Medicine*. 2010; 15(5): 371-374.
13. Bahig M, Christina A, Stockwell B, Amilcar A, Castellano S, Shannon S, Christine L, Haynes R. von Hippel-Lindau (VHL) Disease An update on the Clinico-pathologic and Genetic Aspects. *Adv Anat Pathol*. 2008; 15(3): 165-171.
14. Bailey SM, Mantena SK, Millender-Swain T, et al. Ethanol and tobacco smoke increase hepatic steatosis and hypoxia in the hypercholesterolemic apoE mouse: Implications for a “multihit” hypothesis of fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46: 928–938.
15. Balmain A. Cancer genetics: From Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer*. 2003; 1(1): 77-82.
16. Bangiyeva V, Rosenbloom A, Alexander AE, Isanova B, Popko T, Schoenfeld AR. Differences in regulation of tight junctions and cell morphology between VHL mutations from disease subtypes. *BMC Cancer* 2009; 9: 228-229.
17. Bardos JI, Ashcroft M. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays*. 2004; 26(3): 262-269.
18. Baylin SB, Belinsky SA, Herman JG. Aberrant methylation of gene promoters in cancer-concepts, misconcepts, and promise. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(18): 1460-1461.
19. Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(9): 707-17.
20. Benarroch EE. Hypoxia-induced mediator and neurological. *Clinic Int Neuroscience Research*. 2009; 73: 560-565.
21. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO J*. 2003; 22: 4082-4090.
22. Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Vinals F, Gothie E, Roux D, Pages G, Pouyssegur J. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol*. 2000; 60: 1171-1178.

23. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002; 16(1): 6-21.
24. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimond S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: A metaanalysis. *JAMA.* 2008; 300: 2765-2778.
25. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001; 294: 1337-1340.
26. Brunelle JK, Chandel NS. Oxygen deprivation induced cell death: An update. *Apoptosis.* 2002; 7: 475-482.
27. Brusselmans K, Bono F, Maxwell P, Dor Y, Dewerchin M, Collen D, Herbert JM, Carmeliet P. Hypoxia-inducible factor 2- $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *J Biol Chem.* 2001; 276: 39192-39196.
28. Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev.* 1996; 76: 839-885.
29. Büyükdoğan M, Boruban C, Artac M, Demirel S. Kolorektal Kanserli Hastalarda Sitokrom P450 (CYP2C9 ve CYP2C19) Genetik Polimorfizm Sıklığı. *Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi (International Journal of Hematology and oncology);* 2009; 3(19): 134-139.
30. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, et al. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998; 394: 485–490.
31. Chau CH, Permeter MG, Steinberg SM, et al. Polymorphism in the hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  gene may confer susceptibility to androgen-independent prostate cancer. *Cancer Biol Ther.* 2005; 4: 1222–1225.
32. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem.* 2001; 276: 9519-9525.
33. Chen J, Wu Y, Shao P, Cao Q, Qin C, Li P, Ding Q, Zhu J, Wang M, Zhang Z, Li J, Yin C. Association Between VHL Single Nucleotide Polymorphism (rs779805) and the Susceptibility to Prostate Cancer in Chinese. *DNA and Cell Biology.* 2012; 31: 790-796.

34. Chun YS, Myung-Suk Kim MS, Park JW. Oxygen-Dependent and Independent Regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Korean Med Sci.* 2002; 17: 581-588.
35. Ciani E, Frenquelli M, Contestabile A. Developmental expression of the cell cycle and apoptosis controlling gene, *Lot1*, in the rat cerebellum and in cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003; 142(2): 193-202.
36. Clifford SC, Cockman ME, Smallwood AC, Mole DR, Woodward ER, Maxwell PH, et al. Contrasting effects on HIF-1 regulation by disease causing pVHL mutations correlate with patterns of tumourigenesis in Von Hippel–Lindau disease. *Hum Mol Genet.* 2001; 10: 1029-33.
37. Clinton SK, Giovannucci EL. Nutrition in the Etiology and Prevention of Cancer. Williams and Wilkins Baltimore. 1997; 465-494.
38. Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Hypoxia inducible factor- $\alpha$  binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein. *J Biol Chem.* 2000; 275(33): 25733-41.
39. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001; 49: 507-521.
40. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell A Molecular Approach.* 3rd ed. ASM Press Washington, Sinauer Associates. 2004; p: 632-666
41. Cvetkovic D, Pisarcik D, Lee C, Hamilton TC, Abdollahi A. Altered expression and loss of heterozygosity of the *LOT1* gene in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2004; 95(3): 449-55.
42. Dales JP, Beaufils N, Silvy M, Picard C, Pauly V, Pradel V, Formisano-Treziny C, Bonnier P, Giusiano S, Charpin C, Gabert J. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene (HIF-1 $\alpha$ ) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer. *BMC Medicine.* 2010; 8: 44-49.
43. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24: 68–72.
44. Davidowitz EJ, Schoenfeld AR, Burk RD. VHL induces renal cell differentiation and growth arrest through integration of cell–cell and cell–extracellular matrix signaling. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 865-71.

45. Domene C, Illingworth CJR. Effects of point mutations in pVHL on the binding of HIF-1 $\alpha$ . *Proteins*. 2012; 80: 733-746.
46. Donma MM, Donma O. Wnt signalling pathway in cardiovascular and other clinical diseases: Review. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci*. 2010; 22: 93-103.
47. Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. (Çeviri Editörü, Yıldırım M) *Anatomi*. 2. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi. 2007; p: 266-284.
48. Duan DR, Pause A, Burgess WH, Aso T, Chen DY, Garrett KP, Conaway RC, Conaway JW, Linehan WM, Klausner RD. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumour suppressor protein. *Science*. 1995; 269: 1402-6.
49. Elias JM. Introduction to the genetics of cancer. *Cell Vis*. 1998; 5(1): 37-42.
50. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakola P, Barstead R, Hodgkin PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001; 107: 43-54.
51. Eşrefoğlu M. Genel ve Özel Histoloji. 1. Baskı, Ankara, Pelikan Yayıncılık. 2004; p: 224-226.
52. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*. 2006; 7(1): 21-33.
53. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*. 1999; 59: 3915-3918.
54. Foley R, Marignol L, Thomas AZ, Cullen IM, Perry AS, Prerna-Tewari P, O'Grady A, Kay E, Dunne B, Loftus B, Watson WR, Fitzpatrick JM, Woodson K, Lehman T, Hollywood D, Lynch TH, Lawler M. The HIF-1 $\alpha$  C1772T polymorphism may be associated with susceptibility to clinically localized prostate cancer but not with elevated expression of hypoxic biomarkers. *Cancer Biology & Therapy*. 2009; 8(2): 118-124.
55. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996; 16: 4604-4613.

56. Fransen K, Fenech M, Fredrikson M, Dabrosin C, Soderkvist P. Association between ulcerative growth and hypoxia inducible factor-1alpha polymorphisms in colorectal cancer patients. *Mol Carcinog*. 2006; 45: 833-840.
57. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature*. 2003; 421: 436-40.
58. Fu H, Luo F, Yang L, Wu W, Liu X. Hypoxia stimulates the expression of macrophage migration inhibitory factor in human vascular smooth muscle cells via HIF-1a dependent pathway. *Cell Biology*. 2010; 11: 66-77.
59. Fu XS, Choi E, Bublej GJ, Balk SP. Identification of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-A) polymorphism as a mutation in prostate cancer that prevents normoxia-induced degradation. *Prostate*. 2005; 63: 215-221.
60. Giménez-Bachs JM, Salinas-Sánchez AS, Sánchez-Sánchez F, Lorenzo-Romero JG, Donate-Moreno MJ, Pastor-Navarro H, et al. Determination of VHL gene mutations in sporadic renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2006; 49: 1051-7.
61. Giordano FJ, Johnson RS. Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev*. 2001; 11: 35-40.
62. Girgis CM, Cheng K, Christopher HS, Gunton JE. Novel links between HIFs, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2012; 23-8.
63. Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res*. 2001; 89: 47-54.
64. Gourley EJ, Gering SA. The meandering mesenteric artery: A historical review and surgical implications. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2005; 48(5): 996-1000.
65. Haase VH. The VHL tumor suppressor: Master regulator of HIF. *Curr Pharm Des*. 2009; 15: 3895–3903.
66. Hamano K, Esumi M, Igarashi H, Chino K, Mochida J, et al. Biallelic inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma. *J Urol*. 2002; 167: 713-7.
67. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.



68. Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 38-47.
69. Havelund BM, Spindler KG, Ploen J, Andersen RF, Jakobsen A. Single nucleotide polymorphisms in the HIF-1 $\alpha$  gene and chemoradiotherapy of locally advanced rectal cancer. *Oncology letters*. 2012; 4: 1056-1060.
70. Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-1 alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001; 20: 468-472.
71. Hes FJ, Höppener WM, Luijt RB, Lips CJM. Von Hippel-Lindau Disease. *Hereditary Cancer Clinical Practice*. 2005; 3(4): 171-178.
72. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 by pVHL. *Nature*. 2002; 417: 975-978.
73. Hsiao PC, Chen MK, Su SC, Ueng KC, Chen YC, Hsieh YH, Liu YF, Tsai HT, Yang SY. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  gene polymorphism G1790A and its interaction with tobacco and alcohol consumptions increase susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Journal of Surgical Onc*. 2010; 102: 163-169.
74. <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm> (Mart 2012).
75. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov> (Nisan 2012).
76. [http://primer3plus.com/web\\_3.0.0/primer3web\\_input.htm](http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm) (Mart 2012).
77. <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html> (Nisan 2012).
78. Hupp TR, Hayward RL, Wojtesek B. Strategies for p53 reactivation in human sarcoma. *Cancer Cell*. 2012; 22(3): 283-5.
79. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(20): 10595-9.
80. Illingworth CJR, Loenarz C, Schofield CJ, Domene C. Chemical basis for the selectivity of the von Hippel Lindau tumor suppressor pVHL for prolyl-hydroxylated HIF-1 $\alpha$ . *Biochemistry*. 2010; 49: 6936-6944.

81. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*. 2001; 292: 464-468.
82. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev*. 1998; 12: 149-162.
83. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001; 292: 468-472.
84. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Kaelin W, Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006; 70: 1469-1480.
85. Jacobs EJ, Hsing AW, Bain EB, Stevens VL, Wang Y, Chen J, et al. Polymorphisms in angiogenesis-related genes and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17: 972-7.
86. Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA. Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev*. 1998; 73: 117-123.
87. James GH, Stephen BB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*. 2003; 349: 2042-2054.
88. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW. Regulation and destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 2002; 111: 709-720.
89. Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: Involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res*. 1997; 57: 5328-5335.
90. Jiang J, Tang Y, Liang X. A new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biology and Therapy*. 2011; 11: 714-723.

91. Jin T. The Wnt signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2008; 51 (10): 1771-80.
92. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(6): 415-28.
93. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999; 21(2): 163-167.
94. Josko J, Gwozdz B, Jedrzejowska-Szypulka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit*. 2000; 6: 1047-1052.
95. Kaelin W. The von Hippel-Lindau tumour suppressor gene and kidney cancer. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(18): 6290-6295.
96. Kaelin W. The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 338(1): 627-38.
97. Kaelin W. von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol*. 2007a; 2: 145-173.
98. Kaelin W. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007b; 13(2): 680-684.
99. Kalaycı G. Kolon Kanserleri, Genel Cerrahi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. 2002; p: 1343-59.
100. Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW. Activation of HIF 1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 10430-10435.
101. Kanno H, Saljooque F, Yamamoto I, Hattori S, Yao M, Shuin T. Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during neuronal differentiation. *Cancer Res*. 2000; 60: 2820-2924.
102. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006; 70: 1469-1480.
103. Kelsey JL. Breast cancer epidemiology: Summary and future direction. *Epidemiol Rev*. 1993; 15: 256-263.
104. Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin WG. Binding of the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein to Elongin B and C. *Science*. 1995; 269: 1444-6.

105. Kim HO, Jo YH, Lee J, Lee SS, Yoon KS. The C1772T genetic polymorphism in human HIF-1alpha gene associates with expression of HIF-1alpha protein in breast cancer. *Oncol Rep.* 2008; 20: 1181-1187.
106. Kim JH, Jung CW, Cho YH, Lee J, Lee SH, Kim HY, Park J, Park JO, Kim K, Kim WS, Park YS, Im YH, Kang WK, Park K. Somatic VHL alteration and its impact on prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2005; 13(5): 859-864.
107. Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med.* 2001; 7: 437-443.
108. Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22(24): 4991-5004.
109. Kinshasa T, Stackhouse TM, Chen F, Lerman MI, Zbar B. Cellular proteins that bind the von Hippel-Lindau disease gene product: Mapping of binding domains and the effect of missense mutations. *Cancer Res.* 1995; 55(20): 4544-8.
110. Knechtel G, Szkandera J, Stotz M, Hofmann G, Langsenlehner U, Kripp P, Samonigg H, Renner W, Langner C, Dehchamani D, Gerger A. Single nucleotide polymorphisms in the Hypoxia-Inducible Factor-1 gene and colorectal cancer risk. *Molecular Carcinogenesis.* 2010; 49: 805-809.
111. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.* 1985; 45(4): 1437-43.
112. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001; 1(2): 157-62.
113. Knudson AG. Cancer genetics. *Am J Med Genet.* 2002; 111(1): 96-102.
114. Kodner IJ, Fry DR, Fleshman JW, Birnbaum EH. Colon Rektum and Anus. *Diagnosis Schwartz Principles of Surgery,* 1994; 2: 1262-64.
115. Komarova NL, Sengupta A, Nowak MA. Mutation-selection networks of cancer initiation: tumour suppressor genes and chromosomal instability. *J Theor Biol.* 2003; 223(4): 433-50.

116. Konac E, Dogan I, Onen HI, Yurdakul AS, Ozturk C, Varol A, Ekmecki A. Genetic Variations in the Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Gene and Lung Cancer. *Experimental Biology and Medicine*. 2009; 234: 1109-1116.
117. Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin WG. Inhibition of HIF-2 $\alpha$  is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PloS Biol*. 2003; 1: 439-444.
118. Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel Lindau protein. *Cancer Cell*. 2002; 1: 237-246.
119. Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. Defective vascularization of HIF-1 $\alpha$ -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol*. 1999; 209: 254-267.
120. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Polychronidis A, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, Sivridis E. Endogenous markers of hypoxia/anaerobic metabolism and anemia in primary colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2006; 97 (7): 582-588.
121. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*. 2003; 63: 1138-1143.
122. Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Hiyama T, Hiyama T, Tanimoto K, Chayama K. Mutation of the von Hippel-Lindau (VHL) gene in human colorectal carcinoma: Association with cytoplasmic accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1. *Cancer Sci*. 2004; 95: 149-153.
123. Laird P, Jaenisch R. DNA methylation and cancer. *Human Molecular Genetics*. 1994; 3: 1487-1495.
124. Laird P. Cancer epigenetics. *Human Molecular Genetics*. 2005; 14(1): 65-76.
125. Landi S, Gemignani F, Moreno V, et al. A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphism and risk of colorectal cancer. *Pharmacogenet Genomics*. 2005; 15: 535-546.
126. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of HIF. *Genes Dev*. 2002; 16: 1466-1471.

127. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 3995-4004.
128. Le Marchand L. Combined influence of genetic and dietary factors on colorectal cancer in Japanese Americans. *JNCI.* 1999; 26: 101-105.
129. Lee J, Bae S, Jeong J, Kim S, Kim K. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004; 36: 1-12.
130. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998; 396: 643-9.
131. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989; 246: 1306-1309.
132. Levy AP, Levy NS, Iliopoulos O, Jiang C, Kaplin WG, Goldberg MA. Regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia and its modulation by the von Hippel-Lindau tumour suppressor gene. *Kidney Int.* 1997; 51(2): 575-8.
133. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem.* 1995; 270: 13333-13340.
134. Li H, Bublely GJ, Balk SP, Gaziano JM, Pollak M, Stampfer MJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) gene polymorphisms, circulating insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 levels and prostate cancer. *Prostate.* 2007; 67: 1354-61.
135. Li J, Davidson G, Huang Y, Jiang BH, Shi X, Costa M, Huang C. Nickel compounds act through phosphatidylinositol-3-kinase/Akt-dependent, p70(S6k)-independent pathway to induce hypoxia inducible factor transactivation and Cap43 expression in mouse epidermal C141 cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 94-101.
136. Li L, Chen SH, Zhang Y, et al. Is the hypoxia-inducible factor-1 alpha mRNA expression activated by ethanol-induced injury, the mechanism underlying alcoholic liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2006; 5: 560-563.

137. Li Y, Park J, Piao L, Kong G, Kim Y, Park KA, Zhang T, Hong J, Hur GM, Seok JH, Choi SW, Yoo BC, Hemmings BA, Brazil DP, Kim SH, Park J. PKB-mediated PHF20 phosphorylation on Ser291 is required for p53 function in DNA damage. South Korea, Cancer Research Institute. 2012; 301-331.
138. Liao D, Corle C, Seagroves TN, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer Res.* 2007; 67(2): 563-572.
139. Liu E, Percy MJ, Amos CI, Guan Y, Shete S., Stockton DW, McMullin MF, Polyakova LA, Ang SO, Pastore YD, Jedlickova K, Terry RJ. The worldwide distribution of the *VHL* 598C-T mutation indicates a single founding event. *Blood.* 2004; 103: 1937-1940.
140. Liu LX, Lu H, Luo Y, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Goldberg M, Cheng SH, Gregory RJ, Jianq C. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys Res Commun.* 2002; 291: 908-914.
141. Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, Oldfield EH. von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2003; 361: 2059-2067.
142. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2002; 277: 23111-23115.
143. Lu X, Kang Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: Master regulators of metastasis. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 5928-5935.
144. Mabeesh NJ, Amir S. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol Histopathol.* 2007; 22: 559-572.
145. Macleod K. Tumour suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev.* 2000; 10(1): 81-93.
146. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2001; 15: 2675-2686.

147. Maina EN, Morris MR, Zatyka M, Raval RR, Banks RE, Richards FM, Johnson CM, Maher ER. Identification of novel VHL target genes and relationship to hypoxic response pathways. *Oncogene*. 2005; 24(28): 4549-58.
148. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 $\alpha$  locus. *J Biol Chem*. 2002; 277: 32405-32408.
149. Malazgirt Z. Kolon Kanseri Etiyolojisi, Genel Cerrahi, 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. 1996; p: 371-372.
150. Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*. 1997; 386: 403-407.
151. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Joe G, Semenza G, Gregg L. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2004; 10: 1182-90.
152. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005; 105: 659-669.
153. Manohar SM, Padgaonkar AA, Jalota-Badhwar A, Sonawane V, Rathos MJ, Kumar S, Joshi KS. A novel inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  P3155 also modulates PI3K pathway and inhibits growth of prostate cancer cells. *BMC Cancer*. 2011; 11: 338-348.
154. Martinez A, Fullwood P, Kondo K, Kishida T, Yao M, Maher ER, et al. Role of chromosome 3p12-p21 tumour suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma: analysing of VHL dependent and VHL independent pathways of tumorigenesis. *Mol Pathol*. 2000; 53: 137-144.
155. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*. 2001; 20: 5197-206.
156. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele RTH. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 2000; 403: 501-503.



157. Maynard MA, Ohh M. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *Am J Nephrol*. 2004; 24: 1-13.
158. Maynard MA, Ohh M. Molecular targets from VHL studies into the oxygen-sensing pathway. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005; 5(5): 345-56.
159. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EHL, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M. Multiple splice variants of the human HIF-3 $\alpha$  locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 Ubiquitin Ligase complex. *J Biol Chem*. 2003; 278: 11032-11040.
160. Maxwell PH. The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2005; 16(4-5): 523-30.
161. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 8104-8109.
162. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399: 271-275.
163. McClintock DS, Santore MT, Lee VY, Brunelle J, Budinger GR, Zong WX, Thompson CB, Hay N, Chandel NS. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 94-104.
164. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(12): 924-35.
165. Michelle JN, Gerald C, O'sullivan and Sharon LM. Role of the VHL (von Hippel-Lindau) gene in renal cancer: a multifunctional tumour suppressor. *Biochem society transaction*. 2008; 36: 472-478.
166. Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Pavletich NP. Structure of an HIF-1 $\alpha$  -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science*. 2002; 296: 1886-1889.

167. Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M, Michiels C. Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 847-855.
168. Monti S, Chapuy B, Takeyama K, Rodig SJ, Hao Y, Yeda KT, Ingulizian H, Mermel C, Currie T, Dogan A, Kutok JL, Beroukhim R, Neuberg D, Habermann TM, Getz G, Kung AL, Golub TR, Shipp MA. Integrative analysis reveals an outcome-associated and targetable pattern of p53 and cell cycle deregulation in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2012; 22(3): 359-72.
169. Moon RT, Kohn AD, De-Ferrari GV, Kaykas A. Wnt and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet.* 2004; 5(9): 691-701.
170. Moore LE, Nickerson ML, Brennan P, Toro JR, Jaeger E, Rinsky J, Han SS, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Schmidt LS, Lenz P, Karami S, Linehan WM, Merino M, Chanock S, Boffetta P, Chow WH, Waldman FM, Rothman N. Von Hippel-Lindau (VHL) Inactivation in sporadic clear cell renal cancer: Associations with germline VHL polymorphisms and etiologic risk factors. *PLOS Genetics.* 2011; 7: 1-13.
171. Munoz-Guerra MF, Fernandez-Contreras ME, Moreno AL, Martin ID, Herraiz B, Gamallo C. Polymorphisms in the hypoxia inducible factor 1-alpha and the impact on the prognosis of early stages of oral cancer. *Ann Surg Oncol.* 2009; 16: 2351-2358.
172. Naidu R, Har YC, Taib NA. Associations between hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) gene polymorphisms and risk of developing breast cancer. *Arch Med Res.* 2009; 56: 441-447.
173. Navaratnam RM, Chowaniec J, Winslet MC. The molecular biology of colorectal cancer development and the associated genetic events. *Ann R Coll Surg Engl.* 1999; 81: 312-319.
174. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999; 13: 9-22.
175. Nowell PC. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol.* 2002; 12(4): 261-6.

176. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel CF, Thompson & Thompson. (Çeviri: Tunçbilek E, Ayter Ş ve ark) Tıbbi Genetik. 6. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 2005; p: 202-206.
177. Ohh M. Ubiquitin pathway in VHL cancer syndrome. *Neoplasia*. 2006; 8(8): 623-629.
178. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim T, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the  $\beta$ -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*. 2000; 2: 423-427.
179. Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Gavin BJ, Kley N, Kaelin WG, Iliopoulos O. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein is required for proper assembly of an extra cellular fibronectin matrix. *Mol Cell*. 1998; 1(7): 959-68.
180. Ollerenshaw M, Page T, Hammonds J, Demaine A. Polymorphisms in the hypoxia inducible factor-1alpha gene (HIF1A) are associated with the renal cell carcinoma phenotype. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004; 153: 122-126.
181. Orr-Urtreger A, Bar-Shira A, Matzkin H, Mabjeesh NJ. The homozygous P582S mutation in the oxygen-dependent degradation domain of HIF-1alpha is associated with increased risk for prostate cancer. *Prostate*. 2007; 67: 8-13.
182. Panning BJR. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev*. 1996; 10(16): 1991-2002.
183. Park S, Dadak AM, Haase V, Fontana L, Giaccia AJ, Johnson R. Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ): role of cytoplasmic trapping of HIF-2 $\alpha$ . *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 4959-4971.
184. Peifer M, Polakis P. Wnt signalling in oncogenesis and embryogenesis a look outside the nucleus. *Science*. 2000; 287: 1606-1609.
185. Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 8386-8391.
186. Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*. 2001; 411: 390-395.

187. Phalman L, Cremer M, Krejs G, Ramadori G, Madsen RJ. Gastroenterology and hepatology. London, M Graw-Hill. 1999; p: 351-364.
188. Piccinin S, Tonin E, Sessa S, Demontis S, Rossi S, Pecciarini L, Zanatta L, Pivetta F, Grizzo A, Sonogo M, Rosano C, Dei Tos AP, Doglioni C, Maestro R. A "Twist box" Code of p53 Inactivation: Twist box:p53 Interaction Promotes p53 Degradation. *Cancer Cell*. 2012; 22(3): 404-415.
189. Prior SJ, Hagberg JM, Phares DA, Brown MD, Fairfull L, Ferrell RE, Roth SM. Sequence variation in hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF1A): Association with maximal oxygen consumption. *Physiol Genomics*. 2003; 15(1): 20-6.
190. Putra A, Tanimoto K, Arifin M, Hiyama K. Hypoxia inducible factor-1alpha polymorphisms are associated with genetic aberrations in lung cancer. *Respirology*. 2011; 16: 796-802.
191. Qin C, Cao Q, Ju X, Wang M, Meng X, Zhu J, Yan F, Li P, Ding Q, Chen J, Gu M, Zhang W, Yin C, Zhang Z. The polymorphisms in the VHL and HIF1A genes are associated with the prognosis but not the development of renal cell carcinoma. *Annals of Oncology*. 2012; 23: 981-989.
192. Rannala B. Finding genes influencing susceptibility to complex diseases in the post-genome era. *Am J Pharmacogenomics*. 2001; 1: 203-221.
193. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev*. 2000; 14: 34-44.
194. Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog*. 1993; 7(3): 139-146.
195. Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 1996; 56(24): 5754-5757.
196. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005; 6(8): 597-610.
197. Rock CL. Nutritional factors in cancer prevention. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1998; 12: 975-992.

198. Roe JS, Kim H, Lee SM, Kim ST, Cho EJ, Youn HD. P53 stabilization and reactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell*. 2006; 22: 395-405.
199. Romolo JL. Embryology and anatomy of the colon. *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract*, Philadelphia. 1996; 4: 3-16.
200. Rovera F, Dionigi G, Boni L. Colorectal cancer: The Role of Laparoscopy. *Surg Onc*. 2007; 16: 65-7.
201. Rowley JD. Human oncogene locations and chromosome aberrations. *Nature*. 1983; 301: 290-4.
202. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*. 1998; 17: 3005-3015.
203. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res*. 2000; 60: 4010-4015.
204. Safran M, Kaelin WG. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest*. 2003; 111: 779-783.
205. Salnikow K, Blagosklonny MV, Ryan H, Johnson R, Costa M. Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. *Cancer Res*. 2000; 60: 38-41.
206. Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem*. 2004; 279: 40337-40344.
207. Sayek İ. Kolon-Rektum Kanserleri, Temel Cerrahi, 3. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi. 2004; p: 1243-9.
208. Schraml P, Struckmann K, Hatz F, Sonnet S, Kully C, Gasser T, et al. VHL mutations and their correlation with tumor cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol*. 2002; 196: 186-93.
209. Schutte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis*. 2009; 27: 80-92.
210. Schwab LP, Peacock DL, Majumdar D, Ingels JF, Jensen LC, Smith KD, Cushing CR, Seagroves TN. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  promotes primary tumor

growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2012; 14: 6-8.

211. Scrock T R. Colon and Rectum, Diagnostic Tehcniques. *Tract*. 1996; 4: 23-38.

212. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 3436-3444.

213. Secomb TW, Hsu R, Dewhirst MW, Klitzman B, Gross JF. Analysis of oxygen transport to tumor tissue by microvascular networks. *Int J Radiat Oncol biol Phys*. 1993; 25(3): 481-489.

214. Semenza GL. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxiainducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999; 15: 551-578.

215. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3 to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 5680-5684.

216. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992; 12: 5447-54.

217. Semenza GL. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Intern Med*. 2002; 41: 79-83.

218. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 721-732.

219. Semenza GL. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Physiology*. 2008; 24: 97-106.

220. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Seminars in Cancer Biology*. 2009; 19: 12-16.

221. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2010; 20: 51-56.

222. Shen L, Li J, Xu L, Ma J, Li H, Xiao X, Zhao J, Fang L. miR-497 induces apoptosis of breast cancer cells by targeting Bcl-w. *Exp Ther Med*. 2012; 3(3): 475-480.

223. Shieh TM, Chang KW, Tu HF, Shih YH , Ko SY, Chen YC, Liu CJ. Association between the polymorphisms in exon 12 of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and the clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2010; 46: 47-53.
224. Shimomura M, Hinoi T, Kuroda S, Adachi T, Kawaguchi Y, Sasada T, Takakura Y, Egi H, Okajima M, Tashiro H, Nishizaka T, Ohdan H. Overexpression of Hypoxia Inducible Factor-1  $\alpha$  is an independent risk factor for recurrence after curative resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol*. 2013; 10434: 2945-52.
225. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992; 359: 843-5.
226. Sieber O, Heinimann K, Tomlinson I. Genomic stability and tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*. 2005; 15(1): 61-6.
227. Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, Gutkind JS. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor upregulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Cancer Res*. 2000; 60: 4873-4880.
228. Sonnenberg A, Delco F, Inadomi JM. Cost-effectiveness of colonoscopy in screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2000; 133: 573-584.
229. Stickle NH, Cheng LS, Watson IR, Alon N, Malkin D, Irwin MS, Ohh M. Expression of p53 in renal carcinoma cells is independent of pVHL. *Mutat Res*. 2005; 578; 23-32.
230. Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by insulin and interleukin-1 $\beta$  involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett*. 2002; 512: 157-162.
231. Strate L, Syngal S. Hereditary colon cancer syndromes. *Cancer Cause and Control*. 2005; 16: 201-213.
232. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı (2003) Yayın No: 582.

233. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2000; 157: 411-421.
234. Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, Oue N, Yasui W, Imai K, Nakachi K, Poellinger L, Nishiyama M. Hypoxia-inducible factor-1a polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis.* 2003; 24 (11): 1779-1783.
235. Telatar H, Şimşek H. *Gastroenteroloji. 1. Baskı.* Ankara, Hekimler Yayın Birliği, 1993; p: 467-498.
236. Thiery LP, Sleeman JP. Complex Networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 131-142.
237. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.* 1998; 12: 3320-3324.
238. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997; 11: 72-82.
239. Tipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature.* 2001; 411: 349-354.
240. Topuz E, Aykan FN. *Sindirim sistemi kanserleri.* İstanbul, Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 1998; p: 373-475.
241. Tsutsumi H, Miyamoto C, Furuichi Y, Yoshiike M, Nozawa S, Iwamoto T. VHL tumor suppressor gene: its mutation and protein level in renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2003; 10: 1357-61.
242. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol.* 2004; 14(3): 198-206.
243. Vaupel P, Hockel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9(8): 4010-4015.



244. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26(2): 225-239.
245. Veronica A, Ashcroft C, Ashcroft M. HIF-1 $\alpha$  regulation by proline hydroxylation. *Expert Reviews in molecular Medicine.* 2005; 7: 6-8.
246. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(6): 425-36.
247. Vleugel MM, Greijer AE, Van Der WE, Van Diest PJ. Mutation analysis of the HIF-1 $\alpha$  oxygen-dependent degradation domain in invasive breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2005; 163: 168-172.
248. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004; 10(8): 789-99.
249. Vogelstein BD, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000; 408: 307-310.
250. Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res.* 2000; 20: 1527-1533.
251. Waxner SD, Forde KA, Sellers G, Geron N, Lopes A, Weisse G. How well can surgeons perform colonoscopy. *Surg End.* 1998; 12(12): 1410-12.
252. Wei Q, He W, Lu Y, Yao J, Cao X. Effect of the tumor suppressor gene ING4 on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol Lett.* 2012; 4(3): 438-442.
253. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J.* 2002; 16: 1151-1162.
254. White FC, Carroll SM, Kamps MP. VEGF mRNA is reversibly stabilized by hypoxia and persistently stabilized in VEGF-overexpressing human tumour cell lines. *Growth Factors.* 1995; 12(4): 289-301.
255. Whiteway M, Szostak JW. The ARD1 gene of yeast functions in the switch between the mitotic cell cycle and alternative developmental pathways. *Cell.* 1985; 43: 483-492.

256. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 2003; 17: 271-273.
257. Wojciechowics DC, Mallon RG, Picon A, Paty PB. Characterisation of lectin resistant cell populations derived from human colon carcinoma, correlation of K-ras whitbetal-6 branching of N-linked carbohydrate and CEA production. *Biophys Res Commun.* 1999; 259 (3): 588-93.
258. Yamada N, Horikava Y, Oda N, Lizuka K, Shihara N, Kishi S, Takeda J. Genetik variation in the Hypoxia-Inducible-1 $\alpha$  gene is associated with type 2 diabet in Japanese. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolisma.* 2005; 90: 5841-47.
259. Zatyka M, Morrissey C, Kuzmin I, Lerman MI, Latif F, Richards FM, Maher ER. Genetic and functional analysis of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene promoter. *J Med Genet.* 2002; 39: 463-472.
260. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxiainducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999; 59: 5830-5835.
261. Zhong H, Semenza GL, Simons JW, De Marzo AM. Upregulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is an early event in prostate carcinogenesis. *Cancer Detect Prev.* 2004; 28: 88-93.
262. Zimmer M, Doucette D, Siddiqui N, Iliopoulos O. Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL tumours. *Mol Cancer Res.* 2004; 2(2): 89-95.
263. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 2000; 14: 391-396.


## 7. EKLER

### EK-1 Etik Kurul Onayı

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ  
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

<b>Toplantı Sayısı:08</b>	<b>Toplantı Tarihi: 01.06.2012</b>
---------------------------	------------------------------------

**Karar Sayısı:2012/177;**Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. S. Sennur DEMİREL' in "Kolonorektal Kanseri Riski İle Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) ve von Hippel-Lindau (VHL) Gen Polimorfizimleri Arasındaki İlişki" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 30.05.2012 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, doktora tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. S. Sennur DEMİREL' in sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

  
ASLI GEBİR  
01.06.2012  
Prof. Dr. İsmail REİSLİ  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkan Yardımcısı

## **EK-2 Hasta Onam Formu**

### **Hasta Tarama ve Kontrol Onam Formu**

Adı Soyadı:

Yaş:

Cinsiyet:

Meslek:

Eğitim Düzeyi:

Kan Grubu:

Adres:

Hastalığın Saptanma Yaşı:

Ailede Kanser Öyküsü: -meme -over -kolon -diğer

Eşlik Eden Sistemik Hastalık -dm -ht -hiperkolesterolemi -diğer

Sigara Kullanımı: evet hayır

Alkol Kullanımı: evet hayır

Vücut Kitle İndeksi:

Beyaz Toprak Maruziyeti: evet hayır

N.E.Üniversitesi Meram Tıp Fakültesinde Kolorektal Kanserlerle ilgili tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili bilgiler bana aktarıldı. Yukardaki bilgilerin ve benden alınan kan örneğinin bilimsel araştırmada kullanılması için onay veriyorum. İmza

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Diyarbakır'da doğdu. İlkokulu Diyarbakır'da ortaokul ve liseyi Konya'da tamamladı. Lisans eğitimini 1988-1994 yılları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesinde yaptı. 1994-2002 yılları arasında Konya İl Sağlık Müdürlüğünde çalıştı. Bu süre içinde, mecburi hizmet ve askerlik görevlerini tamamladı ve Konya İl Sağlık Müdürlüğüne bağlı farklı birimlerde pratisyen hekim olarak görev aldı. 2002-2007 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında ihtisasını tamamladı. 2007 yılında mecburi hizmetini yapmak üzere Trabzon Vakfıkebir Devlet Hastanesine atandı. 2010 yılında Sağlık Bakanlığında istifa etti. Halen biyokimya uzmanı olarak çalışmaktadır.