

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

KOLOREKTAL KANSERDE YENİ BİYOBELİRTEÇLERİN TANIMLANMASI

Sıdıka Öztop

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Aytekin Akyol

Eş Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Erkan Yılmaz

Şubat

2019

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Sıdıka Öztop

İmzası

ONAY

Doç. Dr. Aytekin Akyol danışmanlığında ve Prof. Dr. Erkan Yılmaz eş danışmanlığında Sıdıka Öztop tarafından hazırlanan bu çalışma 08/02/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN

İmza:

Üye: Doç Dr. Aytekin AKYOL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Arzu ENSARİ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Hakan GÜRDAL

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Kolorektal Kanserlerde Yeni Biyobelirteçlerin Tanımlanması

Sıdıka Öztop

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Aytekin Akyol ve Eş Danışman Prof. Dr. Erkan Yılmaz

Kolorektal kanser multifaktöriyel bir hastalık olması sebebiyle biyolojik davranış ve moleküler altyapı bakımından heterojen bir grup tümörü temsil etmektedir. Heterojen yapıda olan bu tümörlerin kemoterapötik tedavilere yanıtı hastaların genetik ve epigenetik farklılıklardan dolayı değişkenlik göstermektedir. Bu noktada hastalığın alt tiplere ayırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyacı göz önünde bulundurarak yürütülen tez çalışmasında KRK’de yeni bir biyobelirteç ve/veya alt grubun tanımlanması amaçlanmıştır. Çalışmamız kapsamında TUBB3 ifadesinin kolorektal kanser ve kolorektal kanser öncül lezyonlarında dağılımı tespit edildikten sonra TUBB3’ün metastaz ve antimikrotübüler kemoterapi ajanı paklitakसेle duyarlılıktaki rolü incelenmiştir. Çalışmada, TUBB3 ifadesi 14 neoplastik olmayan kolon mukozası örneği, 78 kolorektal kanser öncül lezyonu, 202 kolorektal kanser olgusu ve HCT116 hücre hattında çeşitli yöntemlerle belirlenmiştir. Daha sonra HCT116 hücre hattında siRNA aracılığıyla TUBB3 ifadesi susturulmuştur. TUBB3’ün susturulmasının canlılık ve paklitaksel duyarlılığı üzerindeki etkisi değişen dozlarla incelenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen veriler kolorektal kanser olgularında TUBB3 negatif bir alt grubun varlığını göstermiş ve HCT116 hücrelerinde TUBB3 ifadesinin paklitaksel duyarlılığı ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlar; TUBB3 negatif olguların taksan türevi kemoterapi ajanlarına duyarlı olabileceğini ve düşük dozlar ile tedavinin bu hastalarda değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. TUBB3 kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında kolorektal kanser olgularında antimikrotübüler kemoterapi ajanlarından fayda görebilecek olgular için bir biyobelirteç olarak kullanılabilir.

2019, 114 sayfa

Anahtar kelimeler: Kolorektal kanser; TUBB3; biyobelirteç; paklitaksel

ABSTRACT

PhD Thesis

Identification of Novel Biomarkers In Colorectal Cancers

Sıdıka Öztop

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Dr.Aytekin Akyol and co-advisor Prof. Dr. Erkan Yılmaz

Colorectal cancer represents a heterogeneous group of tumors in terms of biological behavior and molecular structure because it is a multifactorial disease. The response of these heterogeneous tumors to chemotherapeutic treatments is variable due to the genetic and epigenetic differences of the patients. At this point, it is necessary to separate the disease from the subtypes. In the thesis study carried out with this need in mind, it is aimed to define a new biomarker and/or subgroup in the CRC. In our study, the role of TUBB3 in the metastasis and paclitaxel chemosensitivity was examined after the TUBB3 expression was detected in colorectal cancer and colorectal cancer precursor lesions. In the study, TUBB3 expression was determined by various methods in 14 nonneoplastic colon mucosa cases, 78 colorectal cancer precursor lesions, 202 colorectal cancer cases and HCT116 cell line. Subsequently, TUBB3 expression is silenced by way of siRNA in the HCT116 cell line. The effect of TUBB3 silencing on proliferation and paclitaxel chemosensitivity has been examined. The data obtained from the study showed the presence of a negative TUBB3 subgroup in colorectal cancer cases and found that the TUBB3 expression was associated with paclitaxel chemosensitivity in HCT116 cell line. These results suggest that TUBB3 negative cases may be susceptible to taxane-derived chemotherapy agents and treatment with low doses may be evaluated in these patients. TUBB3 can be used as a biomarker to identify cases of colorectal cancer that may benefit from antimicrotubuler chemotherapy agents in precision medicine applications.

2019, 114 pages

Keywords: Colorectal cancer; TUBB3; biomarker; paclitaxel

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yürütebileceğim olanakları sağlayan ve bu süreçte bana çok şey öğreten danışmanım Doç. Dr. Aytekin AKYOL'a, eş danışmanım Prof. Dr. Erkan YILMAZ'a,

HCT116 hücre hattını hediye eden ve önerilerini paylaşan Prof. Dr. Sreeparna Banerjee'ye,

Tezimin patoloji ayağındaki deneyler ve çalışma sürecimdeki yardımları için çalışma arkadaşım doktora öğrencisi Aynur IŞIK'a,

Klinikopatolojik verileri düzenleyen ve boyamaları skorlayan Dr. Güneş GÜNER TAŞ'a,

İlaç deneylerimi yönlendiren ve sonuçların analizini yaparak yorumlarını paylaşan Prof. Dr. Hakan GÜRDAL'a,

Bulgularımı istatistiki açıdan değerlendirip yorumlayan Prof. Dr. Erdem KARABULUT'a,

Çalışmamın sonuçlarını değerlendirerek farklı bakış açıları sunan tez izleme komitesi üyelerim Doç. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN'a ve Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince beni bilimsel anlamda yetiştiren ve ihtiyaç duyduğum her konuda yardım eden Biyoteknoloji Enstitüsü'nün değerli Öğretim Üyelerine,

Bilimsel ve akademik alanda çok şey öğrendiğim, her ihtiyaç duyduğumda kapısını çekinmeden çalabildiğim değerli hocam Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a,

Bu yolda karşılaştığım her zorlukta bana güvenen, başarılı olmam için bilgisini, tecrübesini ve kıymetli zamanını benden esirgemeyen, bilimsel bir vizyon kazanmam için bana yol göstererek destek olan çok değerli hocam Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a,

Hayatıma girdiğinden beri sevgisi, desteği ve bana olan inancından güç aldığım, sevincimi ve üzüntümü yürekten paylaşabildiğim değerli Dr. Ceyla İNMELER'e,

Eğitim hayatım boyunca hayallerimin peşinden koşmama destek olan ve bu süreçte karşılaştığım zorlukları ve sıkıntıları yenmem için bana güç vererek sonsuz sevgi ve sabır gösteren annem Aynur ÖZTOP'a ve her koşulda yanımda olan kıymetli aileme,

en derin şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bilimsel çalışmalar yürütebileceğim imkânlara sahip olduğum için Türkiye Cumhuriyeti'nin yüce kurucusu MUSTAFA KEMAL ATATÜRK'e ve silah arkadaşları ile tüm şehitlerimize minnettarım.

Bu tez çalışması Doç. Dr. Aytekin AKYOL'un yürütücüsü olduğu, TÜBİTAK 1001 SBAG 113S985 no'lu "Kolorektal Kanserlerin Moleküler Alt Tiplendirilmesi ve Yeni Genetik Belirteçlerin Tanımlanması" başlıklı proje kapsamında desteklenmiştir.

Doktora tezimi; okumayı öğrendikten sonra sorduğum her soruda beni araştırmaya yönlendiren, cevapları kendi başıma bulmam için cesaretlendiren, geniş kütüphanesinde keşifler ve kâşifleri anlatan çocukluğumun en güzel bilgi kaynağı ile tanıştığım, anlamasam da her bir cildini sevinç ve heyecanla okuyarak hayal kurduğum ve benliğime bilim aşkını yerleştiren babam Hüseyin ÖZTOP'a ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
2.1. KOLOREKTAL KANSER	2
2.1.1. KOLOREKTAL KANSER ÖNCÜL LEZYONLARI.....	2
2.1.2. KOLOREKTAL KANSER GELİŞİMİNDE RİSK FAKTÖRLERİ.....	4
2.1.3. KOLOREKTAL KANSER İSTATİSTİKLERİ.....	5
2.1.4. KOLOREKTAL KANSER GENETİK MODELİ.....	7
2.1.5. KOLOREKTAL KANSERDE HETEROJENİTE.....	9
2.1.6. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU.....	11
2.1.7. KOLOREKTAL KANSERDE TEDAVİ YAKLAŞIMI.....	15
2.2. BİYOBELİRTEÇ	16
2.3. TUBB3	17
3. GEREKÇE VE AMAC	19

4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
4.1. MATERYAL	20
4.2. YÖNTEM.....	24
4.2.1. DOKU MİKRODİZİNİ BLOKLARININ OLUŞTURULMASI.....	24
4.2.2. DOKU MİKRODİZİN BLOKLARININ İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZİ	26
4.2.3. MLH1 KAYBI OLAN OLGULARDA BRAF MUTASYON TESPİTİ	29
4.2.3.1. FFPE Dokulardan DNA İzolasyonu	29
4.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	30
4.2.3.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi	31
4.2.4. HÜCRE HATTI VE TAZE DOKUDAN RNA İZOLASYONU	31
4.2.5. RNA KALİTE VE KONTROL TAYİNİ	32
4.2.6. CDNA SENTEZİ.....	33
4.2.7. EŞ ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR).....	35
4.2.8. QRT-PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KONTROLU.....	37
4.2.9. HÜCRE HATTINDAN PROTEİN İZOLASYONU	37
4.2.9.1. RIPA Solüsyonunun Hazırlanması	37
4.2.9.2. Protein İzolasyonu	38
4.2.10. PROTEİN KONSANTRASYON TAYİNİ.....	38
4.2.10.1. BSA Standartlarının Hazırlanması	38
4.2.10.2. Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi	39
4.2.11. WESTERN BLOT	41
4.2.11.1. Örneklerin Hazırlanması.....	41
4.2.11.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	42

4.2.11.3. Transfer.....	43
4.2.11.4. Bloklama ve Antikor Uygulaması	44
4.2.11.5. Görüntüleme	45
4.2.12. HCT116 HÜCRE HATTINDA TUBB3'ÜN SUSTURULMASI.....	45
4.2.12.1. Hücrelerin Çoğaltılması.....	46
4.2.12.2. Hücre Peleti Alınması.....	46
4.2.12.3. Hücre Bloğunun Hazırlanması	47
4.2.12.4. siRNA Transfeksiyonu İçin Hücre Sayımı ve Ekimi	48
4.2.12.5. siRNA Transfeksiyonu	48
4.2.12.6. siRNA Transfeksiyonu Yapılan Hücrelere Paklitaksel Muamelesi	54
4.2.12.7. Hücre Canlılık Tayini	54
4.2.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	55
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	56
5.1. OLGULARIN ÖZELLİKLERİ.....	56
5.2. KRK DOKU MİKRODİZİNLERİNDE MSI DÖRTLÜ PANEL BOYAMASI SONUÇLARI... 57	57
5.3. MLH1 KAYBI OLAN OLGULARDA BRAF MUTASYON ANALİZİ SONUÇLARI..... 58	58
5.4. NEOPLASTİK OLMAYAN KOLON MUKOZASINDA TUBB3 İHK ANALİZİ SONUÇLARI 59	59
5.5. KRK ÖNCÜL LEZYONLARINDA TUBB3 İHK ANALİZİ SONUÇLARI..... 60	60
5.6. KRK OLGULARINDA TUBB3 İHK ANALİZİ SONUÇLARI..... 61	61
5.7. KRK DOKU MİKRODİZİNLERİNE AİT TUBB3 İHK ANALİZİ VALİDASYON SONUÇLARI..... 63	63
5.8. KRK TAZE DOKULARINDA TUBB3 QRT-PCR ANALİZİ SONUÇLARI..... 64	64

5.9. KRK HÜCRE HATLARINDA TUBB3 QRT-PCR ANALİZİ SONUÇLARI	66
5.10. siRNA TRANSFEKSİYONU ÖNCESİ HCT116 HÜCRE HATTINDA TUBB3 QRT-PCR ANALİZİ SONUCU	69
5.11. siRNA TRANSFEKSİYONU ÖNCESİ HCT116 HÜCRE HATTINDA TUBB3 WESTERN BLOT VE İHK ANALİZİ SONUCU	70
5.12. siRNA TRANSFEKSİYONU SONRASI HCT116 HÜCRE HATTINDA TUBB3 QRT-PCR VE WESTERN BLOT ANALİZİ SONUÇLARI	71
5.13. CANLILIK TAYİNİ SONUÇLARI.....	75
<u>6. TARTIŞMA VE SONUC.....</u>	<u>80</u>
6.1. TARTIŞMA.....	80
6.2. SONUÇ.....	90
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>91</u>
<u>EKLER</u>	<u>102</u>
Ek 1: Çalışma İçin Alınan Etik İzin Belgesi.....	102
Ek 2: Kullanılan Hücre Hattının Özellikleri.....	103
Ek 3: Kullanılan Makine-Teçhizat Listesi.....	104
Ek 4: Canlılık Tayini Sonuçlarının Ham Absorbans Değerleri.....	106
Ek 5: qRT-PCR Analizlerine Ait Tm ve Amplifikasyon Eğrileri	111
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>112</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>114</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Neoplastik olmayan kolon dokusu histolojisi; A: Kolon duvarı tam kat hematoksilin eozin (H&E) kesiti, B: Kolon mukozası H&E kesiti (Doç. Dr. Aytekin Akyol'un arşivinden).....	2
Şekil 2.2. Kolorektal kanser öncül lezyonu; A: Kolektomi spesmeninde kolon polipleri, B: Polipektomi spesmeni (Doç. Dr. Aytekin Akyol'un arşivinden)	4
Şekil 2.3. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (3) (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (Dünya Standart Nüfusu, 100 000 Kişide)	6
Şekil 2.4. Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (3) (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (Dünya Standart Nüfusu, 100 000 Kişide)	6
Şekil 2.5. KKR'de çok basamaklı karsinogenezis modeli (8)	7
Şekil 2.6. Dört farklı tümör paterninin bir arada görüldüğü metastatik lenf nodunun H&E görüntüsü (Doç. Dr. Aytekin Akyol'un arşivinden).....	11
Şekil 2.7. MMR genlerindeki mutasyonun, hipermutasyonlu ve hipermutasyonlu olmayan tümörlerdeki oranı (47).....	12
Şekil 2.8. Hipermutasyonlu ve hipermutasyonlu olmayan tümörlerde mutant gen paterni (47)	12
Şekil 2.9. Kolorektal kanserde sıklıkla mutasyona uğrayan sinyal yolları (47)	13
Şekil 4.1 Çalışma kapsamında oluşturulan 1 mm, 3 mm ve 5mm'lik doku mikrodizin blokları	26
Şekil 5.1. MMR intakt ve MMR kayıp olan iki olgunun H&E boyaması ve dörtlü İHK paneli sonucu A: Dört geninde pozitif olduğu pMMR olgu, B: MLH1 ve PMS2 kaybı olan dMMR olgu	58
Şekil 5.2. MLH1 kaybı olan 22 vakanın ARMS PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	59

Şekil 5.3. Neoplastik olmayan kolon mukozasında temsili TUBB3 boyanma sonucu; A: H&E görüntüsü, B: TUBB3 İHK boyaması.....	59
Şekil 5.4. KRK öncül lezyonlarında TUBB3 İHK boyaması sonuçları. Adenomatöz polipte; A: H&E boyaması, B: TUBB3 negatif boyanma (4X), C: TUBB3 fokal pozitif boyanma (20X) D: TUBB3 pozitif boyanma, Serrated polipte; E: H&E boyaması (4X), F: TUBB3 negatif boyanma (20X), G: TUBB3 fokal pozitif boyanma, H: TUBB3 pozitif boyanma (4X), Hiperplastik polipte; I: H&E boyaması, K: TUBB3 negatif boyanma (20X), L: TUBB3 fokal pozitif boyanma, M: TUBB3 pozitif boyanma	61
Şekil 5.5. KRK olgularında TUBB3 İHK boyaması sonuçları; A: TUBB3 negatif olgunun H&E boyaması, B: TUBB3 negatif boyanma (4X), C: TUBB3 negatif boyanma (20X) D: TUBB3 fokal pozitif olgunun H&E boyaması, E: TUBB3 fokal pozitif boyanma (4X), F: TUBB3 fokal pozitif boyanma (20X), G: TUBB3 pozitif olgunun H&E boyaması, H: TUBB3 pozitif boyanma (4X), I: TUBB3 pozitif boyanma (20X).....	62
Şekil 5.6. KRK olgularında TUBB3 ifadesine göre postop sağkalım eğrisi.....	63
Şekil 5.7. KRK taze dokularında qRT-PCR analizi sonucuna göre TUBB3 ifade düzeyi..	64
Şekil 5.8. 6 KRK taze dokusuna ait qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	66
Şekil 5.9. 9 KRK hücre hattında TUBB3 ifade düzeyini gösteren qRT-PCR analizi sonucu	68
Şekil 5.10. Dokuz KRK hücre hattına ait TUBB3 qRT-PCR ürünü agaroz jel görüntüsü .	68
Şekil 5.11. Dokuz KRK hücre hattına ait HPRT1 qRT-PCR ürünü agaroz jel görüntüsü..	69
Şekil 5.12. siRNA transfeksiyonu öncesi HCT116 hücre hattında TUBB3 ifade düzeyini gösteren qRT-PCR analizi sonucu.....	70
Şekil 5.13. siRNA transfeksiyonu öncesi HCT116 hücre hattına ait qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	70
Şekil 5.14. HCT116 hücre hattında siRNA transfeksiyonu öncesi TUBB3 ve β -actin'in western blot analizi sonucu.....	71

Şekil 5.15. HCT116 hücre hattından yapılan hücre bloğunun boyama sonuçları; A: H&E görüntüsü, B: TUBB3 pozitif boyanma	71
Şekil 5.16. siRNA transfeksiyonu sonrası HCT116 hücre hattında TUBB3 ifade düzeyini gösteren qRT-PCR analizi sonucu.....	73
Şekil 5.17. siRNA transfeksiyonu sonrası HCT116 hücre hattına ait TUBB3 qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	73
Şekil 5.18. siRNA transfeksiyonu sonrası HCT116 hücre hattına ait HPRT1 qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	74
Şekil 5.19. HCT116 hücre hattında siRNA transfeksiyonu sonrası TUBB3 ve β -actin'in western blot analizi sonucu.....	74
Şekil 5.20. siRNA transfeksiyonu sonrası 24. ve 48. saatte proliferasyon düzeyi.....	76
Şekil 5.21. HCT116 hücrelerinin 48 saatlik paklitaksel muamelesinde doz ve absorbans düzeyi değişimi.....	79
Şekil 5.22. HCT116 hücrelerinin 48 saatlik paklitaksel muamelesinde doz ve sağkalım (%) düzeyi değişimi.....	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. KRK'da tekrarlayan somatik mutasyonların hedefi olan onkogenler ve tümör baskılayıcı genler (7)	14
Çizelge 2.2. Kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılan yöntem ve ajanlar (71)	17
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan hücre hattına ait bilgiler.....	21
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan kitler ve kimyasallar	21
Çizelge 4.3. İHK için kullanılan antikorların bazı özellikleri	28
Çizelge 4.4. ARMS PCR'da kullanılan primerlerin bazı özellikleri	30
Çizelge 4.5. ARMS PCR reaksiyonu bileşenleri.....	31
Çizelge 4.6. ARMS PCR termal döngü programı	31
Çizelge 4.7. Taze doku ve hücre hattından elde edilen RNA'ların konsantrasyonları	33
Çizelge 4.8. cDNA sentez protokolüne göre bileşenlerin miktarı.....	34
Çizelge 4.9. Reverse transkriptaz PCR için termal döngü programı	34
Çizelge 4.10. qRT-PCR'da kullanılan primerlerin özellikleri	35
Çizelge 4.11. qRT-PCR reaksiyonu bileşenleri.....	36
Çizelge 4.12. qRT-PCR termal döngü programı.....	36
Çizelge 4.13. RIPA solüsyonu bileşenleri.....	37
Çizelge 4.14. BSA standartlarının hazırlanışı	39
Çizelge 4.15 BCA assay için örneklerin hazırlanması	40
Çizelge 4.16 Ölçülen protein konsantrasyonları	40
Çizelge 4.17. %10'luk ayırıcı akrilamid jel bileşenleri.....	43

Çizelge 4.18. %5'lik paketleyici akrilamid jel bileşenleri	43
Çizelge 4.19 siRNA transfeksiyonu optimizasyon plakası	49
Çizelge 4.20. 12 kuyulu plakalar için siRNA konsantrasyonlarının hazırlanışı	50
Çizelge 4.21. 96 kuyulu plakalar için siRNA konsantrasyonlarının hazırlanışı	51
Çizelge 4.22. Proliferasyon takibi için hazırlanan 96 kuyulu plaka.....	52
Çizelge 5.1 Çalışma örneklemini oluşturan olguların klinikopatolojik özellikleri	56
Çizelge 5.2. Öncül lezyonlarda TUBB3 İHK boyanma sıklığının sınıflandırılmış dağılımı	60
Çizelge 5.3. 6 KRK taze dokusunun qRT-PCR ürününe ait ortalama Cp değerleri ve $2^{-\Delta ct}$ yöntemi ile analiz sonuçları.....	65
Çizelge 5.4. 9 KRK hücre hattında TUBB3 qRT-PCR ürününe ait ortalama Ct değerleri ve $2^{-\Delta ct}$ yöntemi ile analiz sonuçları	67
Çizelge 5.5. HCT116 hücre hattında siRNA transfeksiyonu öncesi TUBB3 qRT-PCR ürününe ait ortalama Ct değerleri ve $2^{-\Delta ct}$ yöntemi ile analiz sonucu.....	69
Çizelge 5.6. siRNA transfeksiyonu sonrası TUBB3 qRT-PCR ürününe ait ortalama Ct değerleri ve $2^{-\Delta \Delta ct}$ yöntemi ile analiz sonuçları.....	72
Çizelge 5.7. siRNA transfeksiyonu sonrası yapılan canlılık tayini analiz sonucu.....	76
Çizelge 5.8. siRNA transfeksiyonu sonrası 48 saat paklitaksel muamelesi uygulanan hücrelerde canlılık tayini analiz sonucu	78
Çizelge 5.9. HCT116 hücrelerinde 48 saat paklitaksel muamelesine ait IC_{50} dozları	78

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
22Rv1	Prostat kanseri hücre hattı
3'UTR	Untranslated Region
5-FU	5-Flouro-Urasil
Ac/BisAc	Akrilamid/Bisakrilamid
ACTB	β-actin
ACVR2	Activin A Receptor Type 2A
AFAP	Attenuated Familial Adenomatous Polyposis
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APS	Amonyum Persülfat
ARMS	Amplification-Refractory Mutation System
Bax	BCL2 Associated X
BCA	Bicinchoninic Acid Assay
bç	Baz Çifti
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene
BSA	Bovine Serum Albumine
CCNE1	Cyclin E1
CDK8	Cyclin Dependent Kinase 8
cDNA	Complementer DNA
CEA	Karsinoembriyonik Antijen
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CIN	Chromosomal Instability
CMYC	MYC Proto-Oncogene
CP	Crossing Point

CTNNB1	Catenin Beta 1
ddH ₂ O	Çift Distile Su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dMMR	Deficient MMR
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DU145	Prostat Kanseri Hücre Hattı
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EtBr	Etidyum Bromür
EtOH	Etil Alkol
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum
FBXW7	F-box And WD Repeat Domain Containing 7
FFPE	Formalin Fixed Parafin Embedded
GİS	Gastrointestinal Sistem
H&E	Hematoksilen-Eozin
HIF1A	Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1A
HIF2A	Hipoksi İndüklenebilir Faktör 2A
HMV-I	Melanoma Hücre Hattı
HMV-II	Melanoma Hücre Hattı
HNPCC	Hereditör Nonpolyposis Colorectal Cancer
HP	Hiperplastik Polip
IARC	International Agency For Research On Cancer
IC ₅₀	%50 İnhibisyon Konsantrasyonu

İFP	İnflamatuar Fibroid Polip
İHK	İmmünohistokimya
İP	İnflamatuar Polip
kDa	Kilo Dalton
KRAS	KRAS Proto-Oncogene
KRK	Kolorektal Kanser
LNCap	Prostat Kanseri Hücre Hattı
LOH	Loss Of Heterozygosity
MLH1	mutL Homolog 1
MMR	Mismatch Repair
MSH2	mutS Homolog 2
MSH6	mutS Homolog 6
MSI	Mikrosatellit Instablity
MSI-H	MSI-High
MSI-L	MSI-Low
MSS	Mikrosatellit Stable
MYB	MYB Proto-Oncogene
NEU	erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 2
NHEM	Neonatal Epidermal Melanosit Hücre Hattı
nM	Nanomolar
NSCLC	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
pMMR	Proficient MMR
PMS2	PMS1 Homolog 2
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog

PTX	Paklitaksel
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
qRT-PCR	Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
REST	RE-1 Silencing Transcription Factor
RIPA	Radioimmunpresipitation Assay Buffer
RNA	Ribo Nükleik asit
SA	Serrated Adenom
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
siRNA	Small Interfing RNA
SMAD2	SMAD Family Member 2
SMAD3	SMAD Family Member 3
SMAD4	SMAD Family member 4
SSA	Sessile Serrated Adenom
TA	Tübüler Adenom
TCF7L2	Transcription Factor 7 Like 2
TGFβIIR	Transforming Growth Factor Beta Receptor 2
TGFβR	Transforming Growth Factor Beta Receptor
Tp53	Tumor Protein p53
TSA	Traditional Serrated Adenom
TSG	Tumor Suppressor Gene
TUBB	Tubulin Beta Class I
TUBB1	Tubulin Beta 1 Class VI
TUBB2A	Tubulin Beta 2A Class IIa
TUBB2B	Tubulin Beta 2B Class IIb
TUBB2C	Tubulin Beta 4B Class IVb
TUBB3	Tubulin Beta 3 Class III

TUBB6	Tubulin Beta 6 Class V
TVA	Tübülovillöz Adenom
WHO	World Health Organization
β-TrCP	Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase



1. GİRİŞ

Kanser, son yıllarda dünyada en yaygın görülen sağlık problemleri arasında yer almaktadır (1). Epitel hücrelerinde gelişen adenokarsinomlar, insidansı oldukça yüksek olan meme, prostat ve kolorektal kanser (KRK) gibi kanser tiplerini barındırmaktadır (2). Cinsiyet baz alındığında dünyada kadınlar arasında ikinci, erkekler arasında üçüncü en yaygın görülen kanser tipi olan KRK, ülkemizde her iki cinsiyette de en yaygın görülen üçüncü kanser tipidir (1, 3). KRK çevresel faktörler, genetik ve ailesel yatkınlık gibi geniş bir etken spekturumuna sahip olması nedeniyle multifaktöriyel bir hastalıktır (4). Heterojen yapıda olan bu tümörlerin kemoterapötik tedavilere yanıtı hastaların genetik ve epigenetik farklılıklardan dolayı değişkenlik göstermektedir (5). Bu noktada hastalığın alt tiplere ayrılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Hastalıkların tanısında, tedavisinde ve alt tiplere ayrılmasında yol gösterici olan biyobelirteçler gelişen teknoloji ve yeni teknikler sayesinde daha kolay tespit edilebilmektedir. Son yıllarda kanser biyobelirteci keşfetmek kanser araştırmalarının major odak noktası haline gelmiştir. Özellikle insidansı artma eğiliminde olan ve erken tanı/tedavide hala mutlak başarı sağlanamayan KRK için yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

KRK hem sporadik hem kalıtsal formda görüldüğü için diğer kanserlerden daha detaylı çalışılmış olup klasik yolak ve alternatif yolak olarak adlandırılan iki gelişim mekanizması ortaya çıkarılmıştır (6-8). Bu mekanizmalar hastaya uygulanabilecek tedaviler ve prognoz hakkında çeşitli bilgiler sunmakta ancak bireysel genetik ve epigenetik farklılıklarından dolayı yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle yeni biyobelirteçler ile hastalığın daha küçük alt gruplara ayrılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut bu ihtiyacı göz önünde bulundurarak tez çalışmasında kolorektal kanserde yeni bir biyobelirtecin tanımlanması hedeflenmiştir.

Çalışma kapsamında TUBB3 geni biyobelirteç adayı olarak seçilmiştir. Bu genin KRK hastalarına uygun tedaviyi belirleme aşamasında yeni bir alt grup oluşturabileceği çeşitli yöntemler ile arşiv olguları, taze dokular ve hücre hattında yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

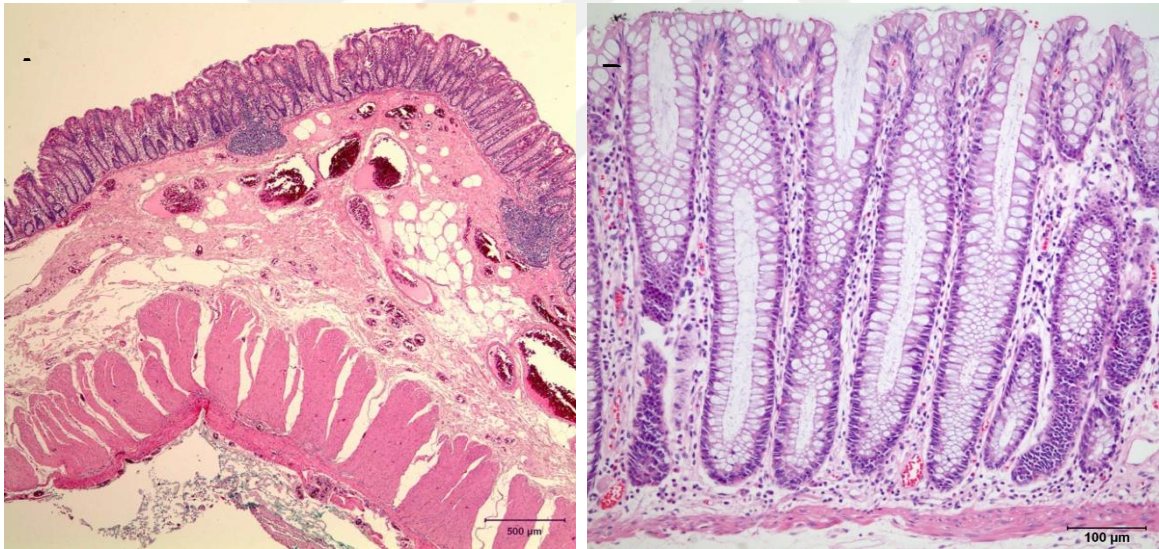
2. KURAMSAL TEMELLER

Çalışma konusu olan KRK tanımı, istatistikleri, genetiği, biyolojisi ve tedavisi ile ilgili bilgiler bu bölümde detaylandırılmaktadır.

2.1. KOLOREKTAL KANSER

Kolon ve rektum, gastrointestinal sistem (GİS) olarak adlandırılan sindirim kanalının son bölümünde yer alan ve kalın bağırsağı oluşturan yapılardır. Kalın bağırsakta görülen malign neoplaziler kolorektal kanser olarak tanımlanmaktadır.

Kolon dokusu histolojik olarak dört tabakadan oluşmaktadır. Kolon duvarı tam kat kesitinde içten dışa doğru bu tabakalar; mukoza, submukoza, kas tabakası ve seroza şeklinde yerleşim göstermektedir. Luminal yapıları döşeyen mukoza tabakası; emici ve salgılayıcı özellikteki basit kolumnar epitel hücreleri ile kaplıdır ve kolon kanseri bu tabakayı oluşturan epitel hücrelerinde ortaya çıkmaktadır. (Şekil 2.1.)



Şekil 2.1. Neoplastik olmayan kolon dokusu histolojisi; **A:** Kolon duvarı tam kat hematoxilen eozin (H&E) kesiti, **B:** Kolon mukozası H&E kesiti (Doç. Dr. Aytekin Akyol'un arşivinden)

2.1.1. KOLOREKTAL KANSER ÖNCÜL LEZYONLARI

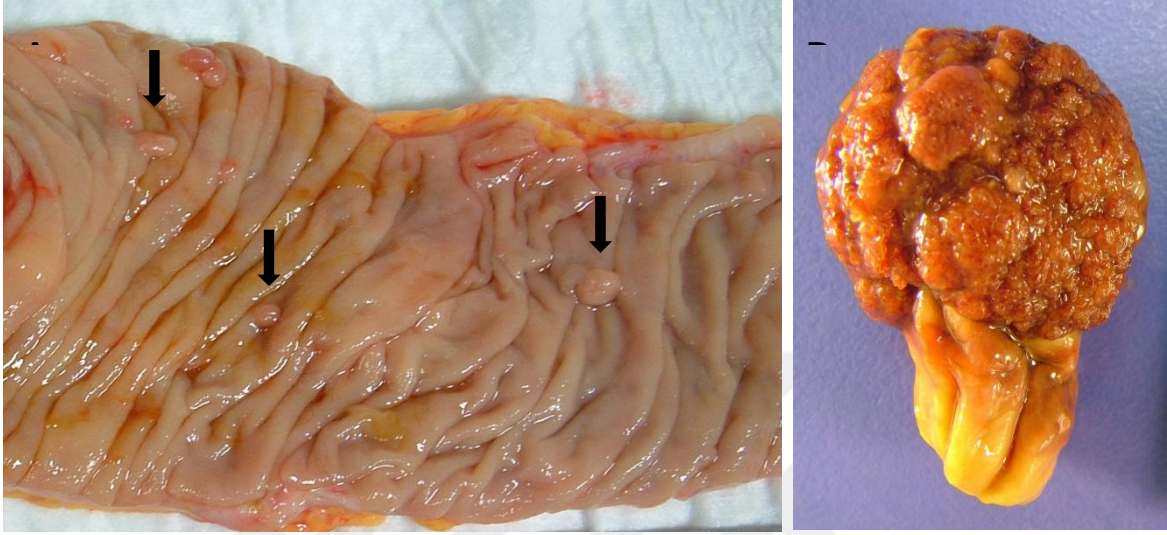
Kolon mukozası üzerinde hücre yığınlarının şekillendirdiği farklı büyüklükteki kabarıklıklar “polip” olarak tanımlanmaktadır, ileri yaşla birlikte görülme sıklığı artan bu lezyonları neoplastik ve neoplastik olmayan polipler olarak ikiye ayırmak mümkündür (9).

Neoplastik karakterli polipler KRK öncül lezyonlarıdır ve histomorfolojik özellikleri dikkate alınarak Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından tübüler adenom, tübülovillöz adenom, villöz adenom ve “serrated” adenom olarak sınıflandırılmıştır (10-12).

Histolojik görünümleri açısından çıkıntılı veya düz, küresel ve saplı olabilen adenomatöz polip olarak da adlandırılan tübüler adenomlar (TA) kolon adenomları arasında %65-80 oranla en sık görülen adenom tipidir (13, 14). Çapı ortalama bir cm'den küçük olmakla beraber 0,5 cm'den büyük olan adenomlar genellikle saplı histoloji göstermektedir (9). Adenom-karsinom teorisine göre birçok kolorektal kanserin öncül lezyonu olan adenomatöz poliplerin (15, 16) prevalansı yaşa bağımlı olarak artmaktadır (12). Villöz adenomlar, çok sayıda parmaklı çıkıntıdan oluşan genellikle sapsız yapıdaki adenomlardır (13, 17). Papiller polip olarak da bilinen villöz adenomlar neoplastik polipler arasında %10-15 oranında görülmektedir (14). Tübüler ve villöz adenom yapılarının birlikte görüldüğü lezyonlar tübülovillöz adenom (TVA) olarak adlandırılırken tübüler/villöz adenom oranları %20-80 veya %80-20 olarak bildirilmektedir (13). Neoplastik polipler arasında TVA adenomlar % 10-25 oranında görülmektedir (14). Sapsız morfolojileri ile bilinen serrated adenomlar (SA) WHO tarafından yapılan sınıflandırmada; traditional serrated adenom (TSA), sessil serrated adenom (SSA) ve hiperplastik polip (HP) olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadırlar (18, 19). SSA geleneksel adenomlardan farklı olarak heterojen yapılu lezyonlar olup kolonik kripta tabanında bozukluk, dallanma, testere dişli yapı ve genellikle proksimal kolonda yerleşim ile karakterizedir (20). KRK moleküler profilinin belirlenmesiyle serrated adenomların yüksek oranda metillenme gösterdiği ve diğer adenomlardan farklı şekilde kanser gelişimine gittiği gösterilmiştir (7). Yapısında tübüler ve villöz bileşen de içerebilen serrated adenomlarda değişken müsin oranları da bu lezyonların karakteristiğidir (13, 21). Tekli veya çok sayıda görülebilmelerinin yanı sıra tümörlü dokularla birlikte de görülebilen hiperplastik polipler; sitoplazmasında belirgin müsin vaküolleri olan olan poliplerdir (13). Daha önce non-neoplastik olduğu düşünülen bu poliplerin bir kısmının morfolojik ve genetik açıdan non-neoplastik poliplerden farklı olduğu ve serrated neoplazi yolağı ile gelişen KRK ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (13, 22, 23).

Neoplastik olmayan polipler ise inflamatuvar polip (İP), inflamatuvar fibroid polip (İFP) ve hamartomatöz polipten oluşmaktadır. Hamartomatöz polipler tümör benzeri yapısal gelişim

gösterebilen ancak malign özellikte olmayan poliplerdir (24). Kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı ve divertikülit gibi kronik inflamatuvarlarda görülen inflamatuvar polipler reaktif epitelium, fibröz doku ve granülasyon dokusundan oluşmaktadır (13). Kolonoskopi sırasında görülen polipler polipektomi ile çıkarılmaktadır.



Şekil 2.2. Kolorektal kanser öncül lezyonu; **A:** Kolektomi spesmeninde kolon polipleri, **B:** Polipektomi spesmeni (Doç. Dr. Aytekin Akyol'un arşivinden)

2.1.2. KOLOREKTAL KANSER GELİŞİMİNDE RİSK FAKTÖRLERİ

KRK gelişimi %65-85 sporadik, %25-30 ailesel ve %3-6 oranında kalıtsal olmak üzere üç farklı paternde gözlenmektedir (25). Kalıtsal kolorektal kanserlerin en sık rastlanılan iki formu %1 ile Ailesel Adenomatöz Polipozis (Familial adenomatous polyposis, FAP) ve %5 ile Lynch Sendromu (Hereditär nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)'dur (25, 26).

KRK'de en önemli risk faktörü yaş olmakla beraber KRK epidemiyolojisi üzerine yapılan çalışmalar hastalığın çevresel, genetik ve ailesel risk faktörlerinden etkilendiğini göstermektedir (4, 27). Sigara ve uzun süreli alkol tüketimi (28-30), hareketsiz yaşam, beslenme ve obezite (31-33) gibi çevresel etmenlerin yanı sıra kolorektal polip varlığı, aile hikâyesi, FAP, HNPCC, Attenuated Familial Adenomatous Polyposis (AFAP) ve bazı inflamatuvar bağırsak hastalıklarının da KRK gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (4, 7, 25, 34).

FAP pozitif bireyler 40'lı yaşlardan önce çok sayıda polip geliştirirler, bu hastalarda koruma amaçlı total kolektomi yapılmazsa erken yaşta KRK geliştirme riski %100'dür (7, 34).

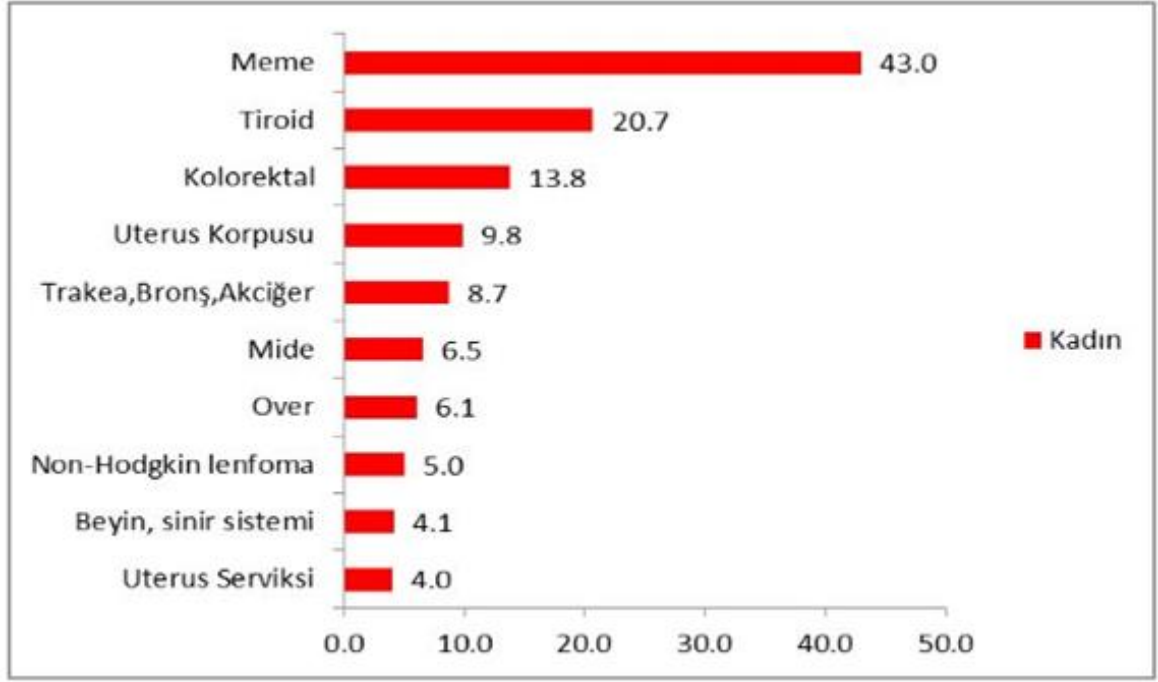
Lynch sendromuna sahip kişilerde ise 20-30 yaş arasında KRK geliştirme riski %80'dir ancak bu hastalarda KRK dışında endometrium, mide, yumurtalık, idrar yolları gibi farklı tümörlerin oluşması da olasıdır (7, 34).

2.1.3. KOLOREKTAL KANSER İSTATİSTİKLERİ

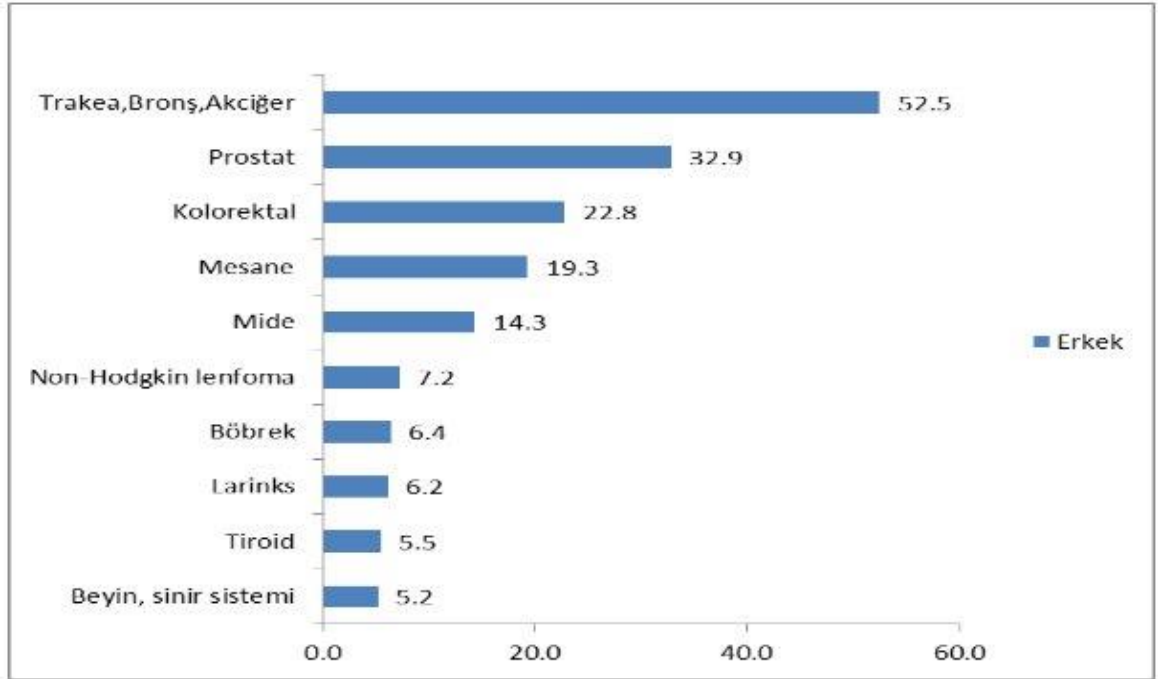
Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2018 verilerine göre KRK dünyada en yaygın görülen üçüncü kanser tipi olup kanser ilişkili ölümlerde ise ikinci sırada yer almaktadır (1). Cinsiyet baz alındığında dünyada kadınlar arasında ikinci, erkekler arasında üçüncü en yaygın görülen KRK için 2018 yılında 1,8 milyondan fazla yeni vakanın tanı aldığı ve 881,000 vakanın hayatını kaybettiği bildirilmektedir (1). Sosyoekonomik gelişimin bir işareti olarak kabul edilebilen KRK insidansı gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre 3 kat daha fazladır ve KRK insidansı dünyada bölgelere göre kolon ve rektum için sırasıyla 6-8 kat gibi geniş bir ölçüde değişkenlik göstermektedir (1).

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Daire Başkanlığı'nın 2014 yılı verilerine göre KRK ülkemizde en yaygın görülen kanserler arasında hem kadınlarda hem erkeklerde üçüncü sırada yer almaktadır (3). 2014 yılında ülkemizde en sık görülen kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları dikkate alındığında KRK'in kadınlarda 100 000'de 13,8 oranında erkeklerde ise 100 000'de 22,8 oranında görüldüğü bildirilmiştir (3). (Şekil 2.3. ve Şekil 2.4.)

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'na bağlı Kanser Savaş Daire Başkanlığı "Türkiye'de Kanser Önleme ve Taramaları 2014 Kısa Raporu" başlıklı bir faaliyet raporu yayınlamıştır. Bu rapora göre KRK'in erken teşhisine yönelik 2012 yılında birinci basamak sağlık kuruluşlarında başlatılan tarama programlarının hedefinde olan 6 400 000 kadın ve erkeğin %22,4'üne ulaşıldığı ve bu taramalarda 2012-2014 yılları arasında büyük çoğunluğu erken evre olan 234 olgunun teşhis edildiği bildirilmiştir (35).



Şekil 2.3. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (3) (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (Dünya Standart Nüfusu, 100 000 Kişide)



Şekil 2.4. Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (3) (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (Dünya Standart Nüfusu, 100 000 Kişide)

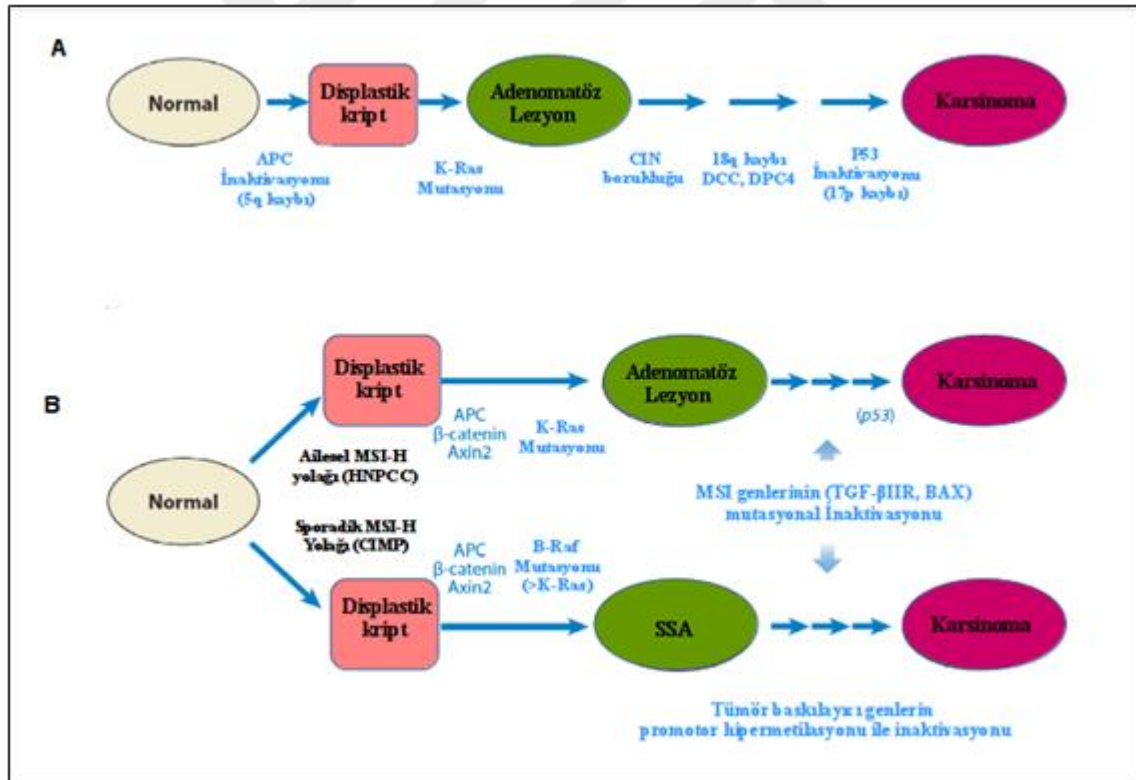
2.1.4. KOLOREKTAL KANSER GENETİK MODELİ

KRK'in hem kalıtsal hem de sporadik formda görülmesinden dolayı KRK hakkında diğer kanser tiplerine göre daha fazla bilgi birikimi mevcuttur. Yapılan çalışmalar sonucunda KRK gelişiminde iki ayrı mekanizma olduğu gösterilmiştir (6-8).

Birinci mekanizma "klasik yolak" olarak tanımlanan adenom-karsinom yolağıdır (7, 8). Bu yolak ile oluşan KRK olguları mikrosatellit kararlı (Mikrosatellit stable, MSS) karaktere sahiptir, MSS KRK'ler;

1. Adenomatöz polipozis koli (Adenomatous polyposis coli, APC) geninde oluşan germline mutasyonun otozomal dominant taşınmasıyla ortaya çıkan FAP sendromu,
2. Kendiliğinden oluşan APC mutasyonu sonucu gelişen sporadik KRK

olmak üzere iki ayrı formda gözlenmektedir (6, 7, 36).



Şekil 2.5. KRK'de çok basamaklı karsinogenezis modeli (7)

Şekil 2.5. A'da klasik yolak ile oluşan KRK aşamaları şematize edilmiştir. Bu mekanizmada; beşinci kromozomun uzun kolunda bulunan APC geninin inaktivasyonu veya kaybı

sonucunda normal bir epitel hücresi displastik kripte dönüşmektedir. Bu aşamada KRAS onkogeni mutasyonu ile adenomatöz lezyon oluşumu şekillenmektedir. Sürecin devamında adenomatöz lezyonda ortaya çıkan kromozomal kararsızlık (Chromosomal Instability, CIN) ve tümör baskılayıcı genlerin (Tumor Suppressor Gene, TSG) bulunduğu kromozom kollarının kaybı adenomun karsinoma dönüşmesine neden olmaktadır.

Klasik yolak ile gelişen MSS KRK'lerin CIN profili gösterdiği, yaygın olarak heterozigotluk kaybına (loss of heterozygosity, LOH) uğradığı, anöploid ve poliploidi özelliği taşıdığı bildirilmiştir (6, 7, 36). Yine MSS KRK'lerin sol kolon tutulumu sergilediği, kötü diferansiye, nadiren müsinöz karakterli, kötü prognozlu ve lenf nodu infiltrasyonunun az olduğu da belirtilmiştir (6, 7, 36).

İkinci mekanizma “alternatif yolak” olarak tanımlanmaktadır (7). Alternatif yolak ile oluşan KRK olguları DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması genlerindeki (Mismatch repair, MMR) bozukluklar nedeniyle mikrosatellit kararsızlık (Mikrosatellit instablity, MSI) göstermektedir, MSI KRK'ler;

1. MMR genlerinde oluşan germline mutasyonun otozomal dominant taşınmasıyla gelişen Lynch Sendromu (HNPCC)
2. MMR genlerinde kendiliğinden oluşan mutasyonlar ve metilasyon ile ortaya çıkan sporadik KRK

olmak üzere iki ayrı formda gözlenmektedir (7, 37).

Şekil 2.5. B'de alternatif yolak ile oluşan kalıtsal ve sporadik KRK aşamaları şematize edilmiştir. Bu mekanizmaya göre kalıtsal form olan Lynch sendromunda normal epitel hücresinin displastik kripte dönüşmesi MMR genlerindeki bozulmaların oluşturduğu MSI ile tetiklenmektedir. Displastik kriptin adenomatöz lezyona dönüşümü ise Wnt yolağı genleri ile KRAS onkogenindeki mutasyonlar neticesinde ortaya çıkmaktadır. Sürecin devamında TGFβR, BAX, TP53 gibi TSG'lerdeki mutasyonel inaktivasyonlar da adenomatöz lezyonları karsinomaya dönüştürmektedir. Sporadik KRK formunda ise MMR genlerindeki kalıtsal olmayan bozulmalar displastik kripti oluşturmaktadır. Displastik kript Wnt yolağı genleri ve KRAS/BRAF onkogen mutasyonları ile sapsız morfolojiye sahip SSA'lara dönüşmektedir. Sapsız adenomlar daha sık görülen sapsız adenomlara göre moleküler olarak

daha yüksek oranda metillenme profiline sahiptir. Bu nedenle sürecin devamında çeşitli genlerin metilasyon ile susturulması adenomadan karsinoma gelişimini şekillendirmektedir.

Alternatif yolak ile gelişen MSI KRK'lerin diploidi özelliği taşıdığı, baskın olarak sağ kolon tutulumu sergilediği, iyi diferansiye, genellikle müsinöz karakterde, iyi prognozlu ve lenf nodu infiltrasyonunun pozitif olduğu bilinmektedir (6, 7, 36). Sporadik yolla oluşan MSI KRK'lerde genellikle MLH1 kaybı görülmektedir ve bu olgularda MLH1 promotor metilasyonu ve eşlik eden BRAF V600E mutasyonu mevcuttur (38-40).

Literatürde; KRK'lerin %85'inin klasik yolak üzerinden gelişirken %15'inin MSI yolağı üzerinden geliştiği bildirilmiştir (7, 36). KRK olgularının %5'ini sendromik form olan HNPCC oluştururken %10'unu sporadik MSI KRK'ler oluşturmaktadır (6, 7, 36).

MMR genlerindeki bozukluklar ile ortaya çıkan “deficient MMR” (dMMR) profili MSI tümörlerin oluşumuyla ilişkili iken bu genlerde herhangi bir bozukluk görülmeyen “proficient MMR” (pMMR) profili MSS tümörlerin gelişimiyle ilişkilendirilmektedir (6). Bu nedenle MSI açısından değerlendirilen KRK olguları MMR sisteminde bozukluk olanlar “dMMR” ve MMR sisteminde bozukluk olmayanlar “pMMR” şeklinde sınıflandırılabilir.

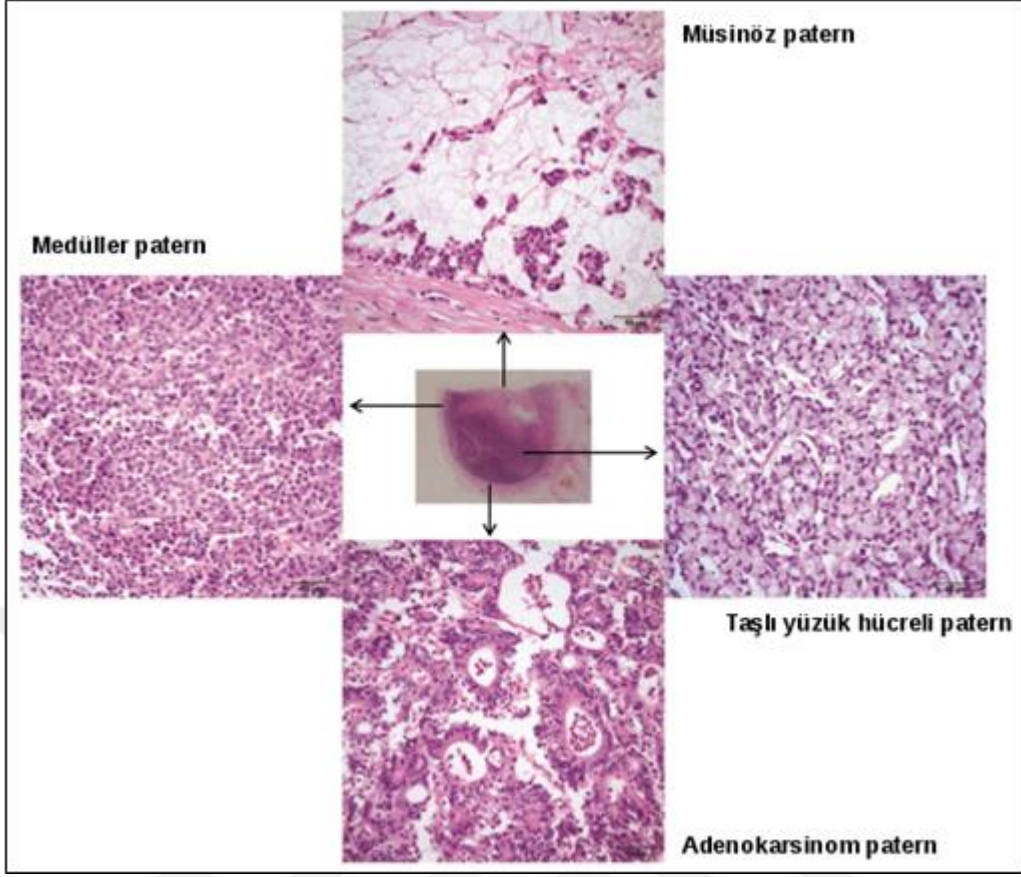
Tümörlerin MSI olup olmadığı immunohistokimyasal yöntemle ve yaygın görülen MSI marker setlerinin analizi yöntemiyle belirlenebilir (41, 42). MSI durumunda gözlenen 5-10 mikrosatellit bölgesini belirteç olarak içeren referans bir panelin kullanıldığı analizde çalışılan belirteçlerin %30'undan fazlası instabil ise yüksek MSI (MSI-High, MSI-H) belirteçlerin %10-30'u instabil ise düşük MSI (MSI-Low, MSI-L) ve instabil belirteç saptanmaması durumunda da MSS olarak sonuç verilmektedir (42). İmmünohistokimyasal analiz yönteminde ise tümör dokusunda MMR sisteminde görevli olan genlerin (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) proteinleri incelenmektedir. Bu proteinlerin dokudaki varlığını tespit etmek için ilgili antikorlar ile dörtlü immünohistokimya (İHK) paneli uygulanmaktadır. İHK paneline göre MMR genlerinde kayıp olup olmadığı belirlenen olgular dMMR ve pMMR şeklinde sınıflandırılmaktadır (41-43).

2.1.5. KOLOREKTAL KANSERDE HETEROJENİTE

Tümör heterojenitesi; genetik, epigenetik ve fenotipik açıdan kanser hücrelerinin evrimleşebilmesine ve klonal seleksiyon yeteneğini arttırarak farklı küçük alt gruplar

oluşturabilmesine neden olmaktadır (44). On dokuzuncu yüzyılın başlarında Virchow'un kanser hücrelerindeki morfolojik gözlemleri, tümörlü hücrelerin pleomorfik özellikte olabileceği fikrini ortaya atmıştır. Daha sonra yapılan kapsamlı genetik ve moleküler araştırmalar kanser hücrelerinin morfoloji, tümörojenite, metabolizma, gen ekspresyon paterni, mutasyon profili, metastaz yeteneği ve tedaviye direnç açısından farklı alt gruplara ayrıldığını bu nedenle tümör kitlesinin hem bireysel hem de hastalar arasında heterojen yapıda olduğu göstermiştir (7, 44-47). Bu heterojenliği açıklamak için “kanser kök hücresi modeli (hiyerarşik model)” ve “stokastik model” olarak adlandırılan iki farklı yaklaşım dikkate alınmaktadır (45). Kanser kök hücresi modelinde; tümör kitlesinin tek bir kanser kök hücresinden köken aldığı düşünülürken stokastik modelde ise tüm hücrelerin bu kitleyi oluşturabilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir (45, 48, 49).

KRK multifaktöriyel bir hastalık olması sebebiyle biyolojik davranış ve moleküler altyapı bakımından heterojen bir grup tümörü temsil etmektedir (44). Şekil 2.6.'da bir hastanın lenf nodu tümör örneğine ait H&E boyaması görülmektedir. Bu hastaya ait dört metastatik lenf nodundan bir tanesinde müsinöz, medüller, taşlı yüzük hücreli ve adenokarsinom olmak üzere dört farklı tümör paterninin bir arada bulunduğu tespit edilmiştir. Tümör heterojenitesi dikkate alındığında kanser teşhisinde önemli bir bileşen olan ve tümörün tamamına kıyasla küçük bir alanı temsil eden biyopsi örnekleri tümörün tüm paternini belirlemede yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle heterojen alt gruplar arasındaki ilişkiyi belirleyebilecek moleküler yaklaşımlar önem kazanmaktadır.

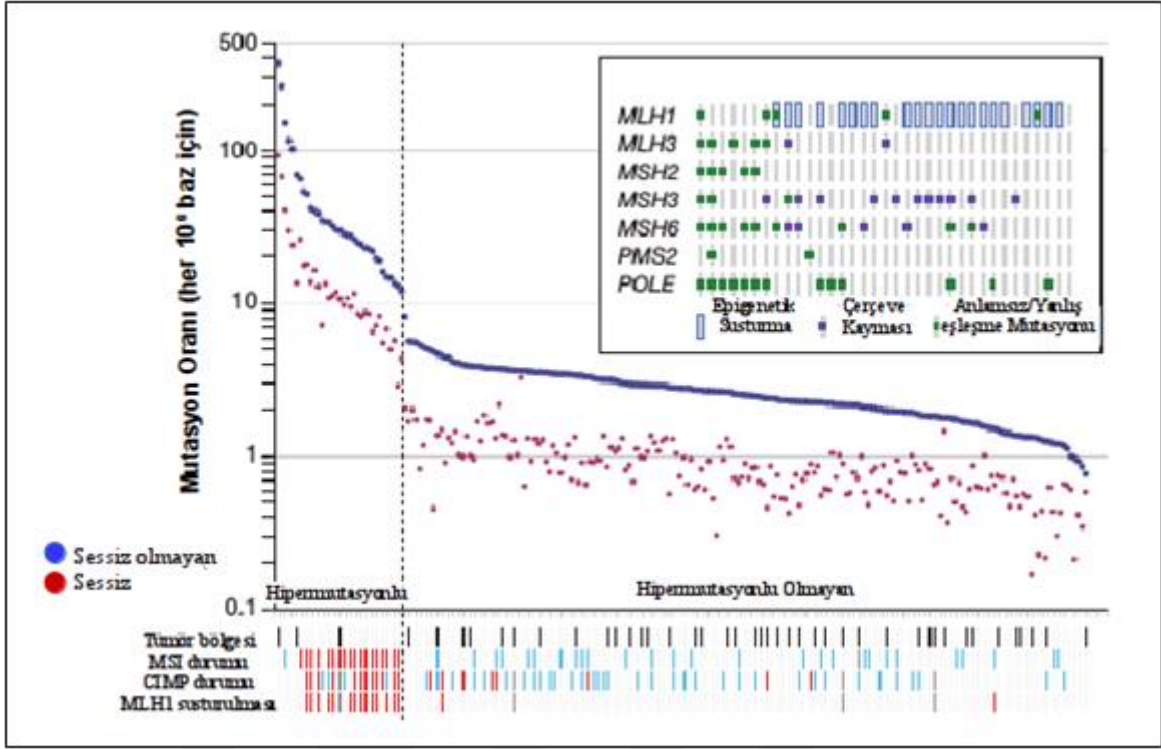


Şekil 2.6. Dört farklı tümör paterninin bir arada görüldüğü metastatik lenf nodunun H&E görüntüsü (Doç. Dr. Aytekin Akyol'un arşivinden)

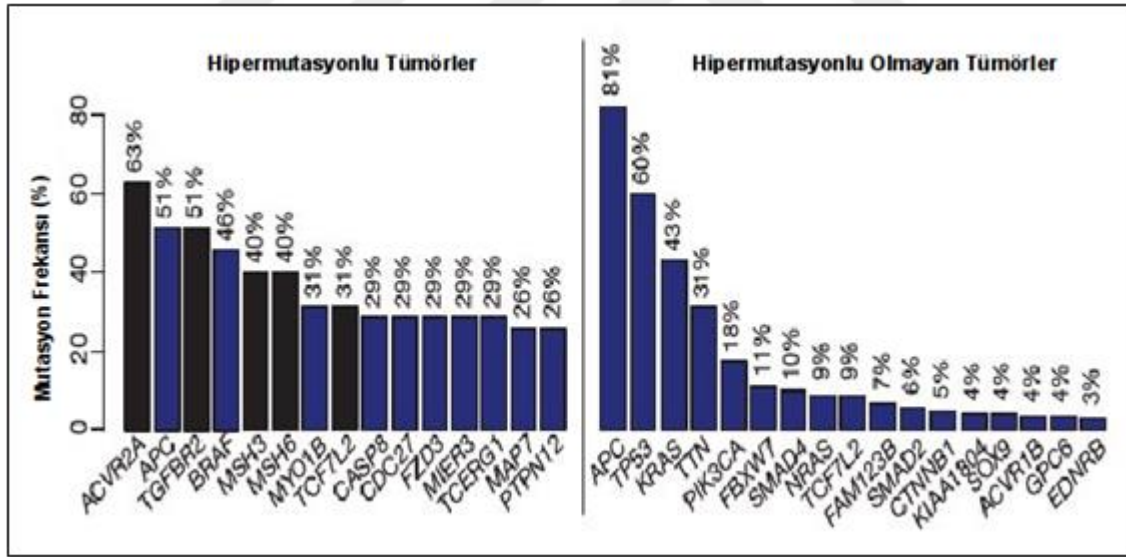
2.1.6. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Mutasyon ve/veya promotor metilasyonu sonucu genlerde ortaya çıkan işlev bozuklukları, değişen sinyal yolak aktiviteleri ve kromozomal yapı değişiklikleri KRK'in moleküler profilinin anlaşılmasında önemli bileşenleri temsil etmektedir (46, 47, 50).

Kanser Genom Atlası (The Cancer Genome Atlas, <https://cancergenome.nih.gov/>) projesi kapsamında KRK oluşumunda etkili olan somatik değişikliklerin profilini çıkarmak amacıyla yapılan analizler 2012 yılında Nature dergisinde yayınlanmıştır (46). Bu proje kapsamında mutasyon spektrumunu belirlemek için tümörlü ve normal dokularda ekzom sekans analizi yapılmış, tümörler taşıdıkları mutasyon oranına göre hipermutasyonlu ve hipermutasyonlu olmayan tümörler olarak iki kategoride sınıflandırılmış ve MSI profili incelenmiştir (Şekil 2.7.). Bu sonuçlar MMR genlerindeki mutasyon oranı ile hücrenin hipermutasyon profili arasında bir doğru orantı olduğunu göstermektedir (46).



Şekil 2.7. MMR genlerindeki mutasyonun, hipermutasyonlu ve hipermutasyonlu olmayan tümörlerdeki oranı (46)

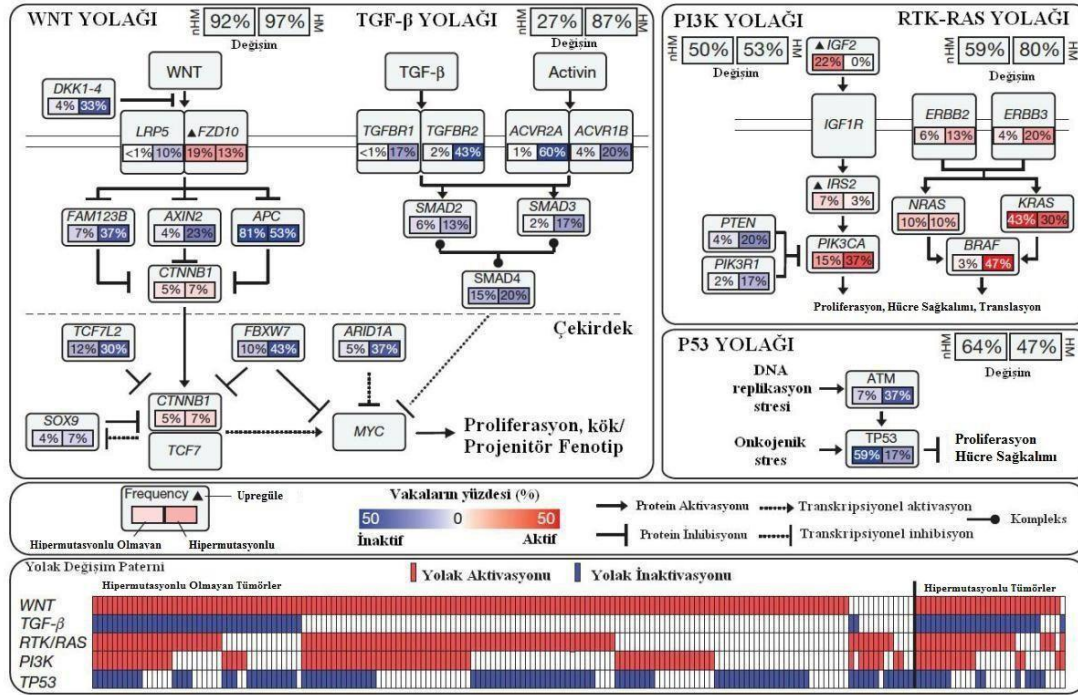


Şekil 2.8. Hipermutasyonlu ve hipermutasyonlu olmayan tümörlerde mutant gen paterni (46)

Tümörde bening-maling geçişi ciddi şekilde mutasyon birikimi gerektirir ve bu süreç kolorektal kanserde çok iyi çalışılmıştır (7, 47, 50). APC, BRAF, KRAS, TP53, PIK3CA, SMAD4, FBXW7, CDK8 KKR' de mutasyon hedefi olan genlerden bazılarıdır (7, 47). Bu genlerde görülen mutasyon çeşitleri ve frekansları Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir. Bu veriler Kanser Genom Atlası projesinde yapılan mutasyon analizleri ile de desteklenirken, analiz

sonucunda hipermutasyonlu ve hipermutasyonlu olmayan tümörler karşılaştırıldığında iki grupta mutasyonların farklı genlerde biriktiği görülmüştür (46). (Şekil 2.8.)

Hücre metabolizması, proliferasyon, farklılaşma gibi hücresel süreçler üzerinde etkili olan sinyal yollarındaki bozukluklar da kanser gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. KRK'de en sık mutasyona uğrayan önemli sinyal yolları Wnt, TGF- β , PI3K, RTK-RAS yollarıdır (7, 46, 47). (Şekil 2.9.)



Şekil 2.9. Kolorektal kanserde sıklıkla mutasyona uğrayan sinyal yolları (46)

Genetik değişikliklerin yanı sıra promotor metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların da gen ifadesini etkilediği bilinmektedir. Metilasyonda, genin promotor bölgesinin 5' ucunda bulunan sitozinden zengin CpG adacıkları metillendiği için transkripsiyon faktörleri promotora bağlanamamakta ve gen ifadesi inhibe olmaktadır (51). Hücrede metilasyon paternini anlamak için ilgili gendeki CpG adalarının metilasyon fenotipi (CpG Island methylator phenotype, CIMP) kontrol edilir. KRK vakalarında birçok farklı bölgede CIMP gösteren hipermetilasyon değişiklikleri gözlenmektedir (46, 51).

CIMP gösteren tümörlerin bir alt grubunda MMR genlerinden MLH1'in hipermetilasyonu söz konusudur (46). Bu metilasyonu taşıyan tümörler, sporadik MSI-H KRK tümörlerinin önemli bir kısmını temsil eder ve bu tümörler sıklıkla BRAF geninde fonksiyon kaybı

mutasyonları barındırmaktadır (38-40). HNPCC olgularında ise BRAF mutasyonuna rastlanmadığı bildirilmiştir (38-40, 52).

Çizelge 2.1. KRK'da tekrarlayan somatik mutasyonların hedefi olan onkogenler ve tümör baskılayıcı genler (7)

Gen	Mutasyon tipi	Değişimin tahmini frekansı
Onkogenler		
KRAS	Nokta mutasyonu (kodon 12,13,61)	%40 (>%75'den fazlası kodon 12'de)
NRAS	Nokta mutasyonu (kodon 12,13,61)	< %5
PIK3CA	Kinaz aktivitesini aktifleyici nokta mutasyonu	%15-25
BRAF	Kinaz aktivitesini aktifleyici nokta mutasyonu	%5-10 (CIMP+KRK ile ilişkili)
EGFR	Gen amplifikasyonu	%5-15
CDK8	Gen amplifikasyonu	%10-15
CMYC	Gen amplifikasyonu	%5-10
CCNE1	Gen amplifikasyonu	%5
CTNNB1	Dengeleyici nokta mutasyonları ve N-terminal ucunda çerçeve içinde delesyonlar)	< %5
NEU (HER2)	Gen amplifikasyonu	< %5
MYB	Gen amplifikasyonu	< %5
Tümör baskılayıcı genler		
p53	Nokta mutasyonu, allel kaybı	%60-70 (nokta mutasyonlarının >%95 yanlış eşleşme)
APC	Çerçeve kayması, nokta mutasyonu, delesyon, allel kaybı	%70-80 (neredeyse tüm mutasyonlar proteini kesmekte)
FBXW7	Sessiz mutasyon, yanlış eşleşme, delesyon	%20
PTEN	Sessiz mutasyon, delesyon	%10

SMAD4	Sessiz mutasyon, delesyon, allel kaybı	%10-15
SMAD2	Sessiz mutasyon, delesyon, allel kaybı	%5-10
SMAD3	Sessiz mutasyon, delesyon	%5
TGFβIIIR	Çerçeve kayması, sessiz mutasyon	%10-15 ((MSI-H KRK'in %90'ında mutasyon var)
TCF7L2	Çerçeve kayması, sessiz mutasyon	%5 (hem MSI-H hem de MSS KRK'de mutasyon)
ACVR2	Çerçeve kayması	%10 (MSI-H KRK'in %80'inde mutasyon var)
BAX	Çerçeve kayması	%5 (MSI-H KRK'nın ~%50'sinde genellikle tek allel)

2.1.7. KOLOREKTAL KANSERDE TEDAVİ YAKLAŞIMI

KRK tedavisini yönlendiren en önemli faktör hastalığın evresidir. Tümörün evresi ve derecesi patolojik tanıyla belirlendikten sonra cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi yaklaşımlarından uygun olanı ile tedavi planlanmaktadır.

KRK'de en çok fayda sağlayan tedavi seçeneği cerrahidir. Cerrahi tedavinin amacı tümör tutulumu olan bölgenin eksizyonudur. Tümörlü dokuların tamamının çıkarılması klinik açıdan bir sıkıntı oluşturmuyor ise hastalığın tüm evrelerinde cerrahi tedavi uygulanır.

Radyoterapi; iyonizan radyasyon ile kanserleşen hücrenin DNA yapısını bozarak hücre ölümünü hedefleyen bölgesel bir tedavidir, nüks olasılığını azaltmak amacıyla ameliyat öncesinde veya sonrasında kullanılabilir (53, 54).

Kemoterapi; spesifik olmaksızın kanser hücrelerini öldürmeyi amaçlayan sistemik bir tedavidir. Genellikle cerrahi sonrası koruma amaçlı uygulanan adjuvan kemoterapi ile hastada kalmış olabilecek tümör hücrelerinin eradike edilmesi hedeflenmektedir. KKK hastalarında kemoterapi için sıklıkla kullanılan protokoller; İrinotekan, 5-FU (5-fluorourasil) ve Oksaliptin'dir (55, 56). İrinotekan; topoizomeraaz I enzimini inhibe ederek transkripsiyon hataları oluşturmayı ve hücre proliferasyonunu engellemeyi amaçlarken, Oksaliptin; replikasyon ve transkripsiyonu inhibe ederek apoptozisi indüklemeyi

amaçlamaktadır. 5-FU ise DNA replikasyonu için gerekli olan timidin sentezinden sorumlu olan timidilat sentaz inhibitörü olarak işlev görmektedir (55, 56).

Akciğer, meme ve ovaryum kanseri tedavisinde primer olarak kullanılan kemoteröpatiklerden biri olan taksan grubu (paklitaksel, dosetaksel vb.) ajanlar mikrotübül yapısının dinamikliğini bozarak hücre bölünmesini inhibe etmektedir (57-60). Kolorektal tümörlerinin taksan grubu kemoterapi ajanlarına gösterdiği antimikrotübüler direnç nedeniyle bu ajanlar KRK hastalarında çok az etki göstermekte veya hiç etki göstermemektedir (61-66).

Bağımsız çalışmalar ve Kanser Genom Atlası analizleri tümörlerin farklı moleküler profillere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (7, 44, 46, 47). Tümörlerde görülen bu heterojenlik; KRK tedavisinde kullanılan kemoterapi ve hedefe yönelik ilaçlarda farklı cevaplarla kendini göstermektedir (5, 44). Bu noktada hastaya uygun tedaviyi verebilmek için tümörlerin moleküler profiline göre sınıflandırılması ve tedaviden fayda görüp göremeyeceğini işaret eden belirteçlerin tanımlanması önem kazanmaktadır (67).

2.2. BİYOBELİRTEÇ

Biyobelirteç; WHO tarafından "vücut veya vücut ürünlerinde ölçülebilen ve hastalık veya akıbet ile ilgili etki veya insidansların tahmin edilebilmesinde kullanılan herhangi bir madde, yapı ya da süreç" olarak tanımlanmıştır (68, 69). Biyobelirteç; bir laboratuvar testi gibi basit olabileceği gibi genlerin veya proteinlerin paterni kadar kompleks de olabilir.

Kanser hücresinin DNA, RNA, protein veya metabolit seviyesindeki ölçülebilir spesifik moleküler değişimler "kanser biyobelirteci" olarak nitelendirilebilir (70). Son yıllarda kanser biyobelirteci keşfetmek kanser araştırmalarının da major odak noktası haline gelmiştir.

KRK olgularında hem geleneksel hem de moleküler çalışmaları içeren bir kısım deneysel belirteçler tanımlanmıştır (71). Bunları; risk değerlendirilmesi/yatkınlık biyobelirteçleri, tarama/erken tanı biyobelirteçleri, tanısal biyobelirteçler, farmakolojik biyobelirteçler, tahmin ettirici biyobelirteçler ve prognostik biyobelirteçler şeklinde sınıflandırmak mümkündür (71). KRK tanı ve tedavisinde dikkate alınan bu biyobelirteçler Çizelge 2.2.'de görülmektedir.

Çizelge 2.2. Kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılan yöntem ve ajanlar (71)

1- Risk değerlendirilmesine yönelik biyobelirteçler
Aile hikâyesi
Kalıtsal kanser sendromu tanısı
2- Tarama/erken tanı biyobelirteçleri
Gaitada gizli kan
Kolonoskopi
3- Tanısal biyobelirteçler
Karsinoembriyonik antijen (CEA)
Sirkülasyondaki nükleik asitler
4- Farmakolojik biyobelirteçler
UGTA1*28 genotipleme
Dihidroprimidin dehidrogenaz polimorfizmi
5- Tahmin ettirici biyobelirteçler
DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu ve MSI
KRAS ve BRAF mutasyonu
6- Prognostik biyobelirteçler
TNM evresi
DNA hatalı eşleşme tamir mekanizması bozukluğu ve MSI
KRAS ve BRAF mutasyonu

2.3. TUBB3

Mikrotübüller; alfa ve beta tubulinlerden oluşan dinamik karakterde sitoplazmik filamentler olup hücre iskeletinin kurulması, hücrelerarası taşıma, mitoz bölünme, nöron morfolojisi ve hücre hareketinde etkin rol oynamaktadır (72). Mikrotübüllerin yapısına katılan beta tubulinler farklı kromozomlarda yer alan sekiz izotipten oluşan geniş bir gen ailesidir (73-75). TUBB, TUBB1, TUBB2A, TUBB2B, TUBB2C, TUBB3 ve TUBB4, TUBB6'yı içeren bu izotiplerin mikrotübül yapısına katılma oranları hücre ve doku tipine göre değişkenlik göstermektedir (72, 75, 76).

Bu aile üyelerinden biri olan tubulin beta III; genomda 16q24.3 lokasyonunda bulunan TUBB3 geni tarafından eksprese edilir (77). Beş ekzondan oluşan TUBB3 geninin en büyük ürünü 450 aminoasit uzunluğunda ve 50 kDa ağırlığında olan TUBB3 proteindir.

Sağlıklı insan dokuları TUBB3 ekspresyonu açısından incelendiğinde en yüksek ifadenin beyin (77, 78) dokusunda ve nöronlarda(79) olduğu gösterilmiştir. Nöronal spesifik tubulin izoformu olan TUBB3 proteini sıklıkla nöronlarda farklılaşma belirteci olarak kullanılmaktadır (80, 81). TUBB3'ün ayrıca sağlıklı fibroblast ve keratinosit hücrelerinde ifade edildiği (82) çok düşük düzeyde de ince bağırsak, testis ve plesantada eksprese olduğu, diğer sağlıklı dokularda ise ifade edilmediği bildirilmiştir (72, 78). Tümör dokularında tubulin beta alt tiplerinin ifade düzeyi incelendiğinde en fazla artışın TUBB3 izotipinde olduğu, sağlıklı meme ve akciğere kıyasla tümörlü meme ve akciğerde TUBB3 ekspresyonunun sırasıyla 43 ve 71 kat fazla olduğu gösterilmiştir (72). Yüksek TUBB3 ekspresyonu küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) (83), yumurtalık kanseri kolorektal kanser (84), pankreas kanseri (85) ve mesanenin ürotelial karsinoması (86) gibi pek çok solid tümörde zayıf klinik çıktılarla da ilişkilendirilmiştir.

TUBB3 ekspresyonu hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyede regüle edilmektedir. TUBB3 regülasyonunun transkripsiyonel seviyede REST (RE-1 silencing transcription factor) (87, 88), HIF1A ve HIF2A (hipoksi indüklenbilir faktör 1A ve 2A) (89, 90) ve histon asetilasyonu (87) aracılığıyla translasyonel seviyede mikro RNA miR-200c (91, 92) ile protein düzeyinde ise fizyolojik olarak ubiquitin-proteozom sistemi (87) üzerinden kontrol edildiği bildirilmiştir.

Kemoterapide kullanılan antimikrotübüler ilaçlar hücrenin iskelet yapısını hedefleyerek hücre ölümünü tetiklemeyi amaçlamaktadır (57-59). TUBB3 ekspresyonunun taksan grubu kemoterapi ajanlarına düşük duyarlılık gösterdiği yumurtalık kanseri (93), prostat kanseri (94), NSCLC (95), gastrik kanser (96) gibi birçok epitelyal kökenli kanser tipinde bildirilmiştir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

KRK gelişimi çok basamaklı uzun bir sürecin sonucudur. Hücrenin geçirdiği moleküler, genetik ve epigenetik değişimler tümör hücrelerinde farklı kombinasyonlar şeklinde görülmektedir. Bu durum tümörlerin biyolojik davranış ve moleküler altyapı bakımından heterojen olmasına sebep olmaktadır. Tümörlerin ileri derecede heterojen olması nedeniyle standart kemoterapi tedavileri her hastaya aynı şekilde etki etmemektedir. Bu noktada uygulanabilen mevcut tedavilerden en yüksek oranda fayda görebilecek spesifik alt grupların veya bu alt grupları tespit edebilen biyobelirteçlerin tanımlanması gerekmektedir. Bu ihtiyacı göz önünde bulundurarak yürütülen tez çalışmasında KRK'de yeni bir biyobelirteç ve/veya alt grubun tanımlanması amaçlanmıştır.

Bu bağlamda birkaç aday gen ile laboratuvarımızda yapılan ön çalışma sonucuna göre KRK hücrelerinde artış gösteren TUBB3 geni bu tez çalışmasında araştırılmak üzere seçilmiştir. Çalışmamızın üç temel amacı vardır. Birinci amacımız neoplastik olmayan kolon mukozasında, KRK öncül lezyonlarında, KRK olgularında ve KRK hücre hatlarında TUBB3 ifade düzeyinin dağılımını belirlemektir. İkinci amacımız elde edilen verilere dayanarak KRK'de TUBB3 ifadesinin proliferasyona ve invazyona etkisini incelemektir. Üçüncü amacımız ise TUBB3 ifadesinin taksan grubu kemoterapi ajanlarından paklitaksel tedavisine kemo-duyarlılıktaki rolünü inceleyerek KRK hastalarında tedaviden fayda görebilecek bir alt grup varlığını araştırmaktır.

Çalışmayı yaptığımız örnekleme TUBB3 ifadesi ile dMMR KRK ve pMMR KRK alt grupları arasında bir bağlantı olup olmadığı belirlenecektir. Çalışmamız sonucunda TUBB3'ün KRK öncül lezyonlarındaki ifade düzeyleri gösterilecektir. TUBB3 ifadesinin taksan grubu kemoterapi ajanlarına karşı gösterilen kemo-duyarlılıkta rol oynayıp oynamadığı akciğer, meme, prostat gibi farklı epitelyal tümörlerde çalışılmıştır ancak kolorektal kanserde bu yönde bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Literatürde bu iki konuda veri bulunmadığından çalışmamız bu açıdan özgündür.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Bu çalışma; KRK tanısı almış olguların formalinle fikse edilmiş parafine gömülü (Formalin Fixed Parafin Embedded, FFPE) dokuları, ameliyat spesmenlerinden elde edilen taze tümör doku örnekleri ve HCT116 KRK hücre hattı üzerinden yürütülmüştür. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 07.02.2017 tarihli toplantısından GO 16/720-03 karar numarası ile alınan etik izin belgesi Ek 1'de mevcuttur.

Çalışmaya dahil edilecek retrospektif olguların belirlenebilmesi için 2004-2016 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde opere olmuş ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nca KRK tanısı almış hastaların listesi çıkarılmıştır. Kolon rezeksiyon materyaline ait H&E boyalı kesitler arşivden çıkarılarak değerlendirilmiş ve operasyon öncesinde kemoterapi almamış 202 KRK olgusu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu olgulardan 14 tanesinin neoplastik olmayan kolon mukozası örnekleri de çalışmaya dâhil edilmiştir. Kesitlerin morfolojik incelenmesi sırasında hastaların operasyon tarihleri, patoloji raporu tanıları ile TNM evreleri gibi ölçütler dikkate alınmamıştır. Klinikopatolojik verilerin incelenmesi olgular belirlendikten sonra yapılmıştır.

Çalışmaya dâhil edilecek KRK öncülü lezyonların belirlenebilmesi için 2004-2016 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde opere olmuş ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nca öncül lezyon tanısı almış hastaların listesi çıkarılmıştır. Kolon rezeksiyon materyaline ait H&E boyalı kesitler arşivden çıkarılarak değerlendirilmiş ve 78 KRK öncül lezyon olgusu çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen öncül lezyonlar; tübüler adenom (n=37), tübülovillöz adenom (n=8), traditional serrated adenom (n=18), sessile serrated adenom (n=1), serrated adenom (n=2), hiperplastik polip (n=6), hamartomatöz polip (n=4), inflamatuvar fibroid polip (n=1) ve inflamatuvar polipi (n=1) kapsamaktadır.

Çalışmamıza; KRK örnekleminden altı adet olgunun taze tümör dokuları ve HCT116 KRK hücre hattı (Ortadoğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü'nden Prof. Dr.

Sreeparna Banerjee'nin hediyesidir) da dâhil edilmiştir. Hücre hattı ile ilgili bilgiler Çizelge 4.1'de, çalışma kapsamında kullanılan kitler ve kimyasallar ise Çizelge 4.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan hücre hattına ait bilgiler

Tarih	Pasaj no	Hücre hattı	Hücre tipi	Kullanılan besiyeri ve katalog numarası	Ortam içeriği
01.03.2017	19	HCT116	Adherent	Biowest DMEM-F12, L0092-500	Glutamin, 15 mM HEPES, %10 FCS, %1 Pen/Strep

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan kitler ve kimyasallar

Malzeme Adı	Marka	Katalog No	Kullanım Amacı
Agaroz	Biomax	100 gr	Agaroz Jel Elektrofrezisi
100 bp DNA Ladder	SOLIS BIODYNE	07-11-00050	Agaroz Jel Elektrofrezisi
Etidyum Bromür (EtBr)	Thermo Scientific	15585011	Agaroz Jel Elektrofrezisi
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Invitrogen	4368814	cDNA sentezi
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	QIAGEN	56404	DNA İzolasyonu
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12	Biowest	L-0092-500	Hücre Kültürü
Trypsin	Biowest	L-0909-100	Hücre Kültürü
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biowest	S181H-100	Hücre Kültürü
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Biowest	L0615-500	Hücre Kültürü
Penicilin-Streptomycin 100X	Biowest	L0022-100	Hücre Kültürü
ON-TARGETplus Smart Pool TUBB3 siRNA	Dharmacon	L-020099-00-0005 5 nmol	Hücre Kültürü
ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool	Dharmacon	D-001810-10-05	Hücre Kültürü
Dharmafect I Transfection Reagent	Dharmacon	T-2001-03	Hücre Kültürü

Ebetaxel	SANDOZ	30mg/5ml	Hücre Kültürü
WST1 - 8 ML	ROCHE	05015944001	Hücre Kültürü
Penicillin–Streptomycin Solution 100X	Biowest	L0022	Hücre Kültürü
Trypan Blue Solution	Thermo Scientific	15250061	Hücre Kültürü
Ksilen	Sigma-Aldrich	CAS-1330-20-7	İmmünohistokimya
Etil Alkol (EtOH)	SIGMA	32221 5L	İmmünohistokimya
Sitrat	Genemed Biotechnologies	10-0062C	İmmünohistokimya
EDTA	Dr. Zeydanlı	DZEDTA10-05	İmmünohistokimya
Methanol	Merck	1.06009 2.5L	İmmünohistokimya
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Merck	108597	İmmünohistokimya
Acu-Satin Mouse+Rabbit HRP Kit	Genemed Biotechnologies	54-0003C	İmmünohistokimya
UltraVision Detection System Large Volume DAB Substrate System (RTU)	Thermo Scientific	TA-125-HD	İmmünohistokimya
Hematoksilen	Merck	104302	İmmünohistokimya
Anti-beta III tubulin antibody (TUV-1)	Abcam	Ab14545	İmmünohistokimya Western Blot
Large Volume UltrAb Diluent	Thermo Scientific	TA-125-UD	İmmünohistokimya
UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP(RTU)	Thermo Scientific	TP-125-HL	İmmünohistokimya
Taq DNA Polymerase	Thermo Scientific	EP0402	PCR
dNTP Mix	SIGMA	D7295	PCR
Trizol Reagent	Thermo Scientific	15596-018	RNA İzolasyonu

Phenol-Chloroform-isoamyl alcohol mixture	Sigma-Aldrich	77617-100ML	RNA İzolasyonu
RNaseZAP	Sigma	R2020-250ML	RNA İzolasyonu
DEPC Water, Sterile	OmniPur	9610	RNA İzolasyonu
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific	34080	Western Blot
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225	Western Blot
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	26616	Western Blot
Monoconal Anti- β -Actin	SIGMA-ALDRICH	A3854	Western Blot
Amonyum Persülfat	SIGMA-ALDRICH	A9164 100g	Western Blot
Proteaz İnhibitörü	SIGMA-ALDRICH	P8340	Western Blot
Anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Thermo Scientific	31430	Western Blot
Glisin	SIGMA	G8898-1KG	Western Blot
Glisin	Merck	1.04169.0250	Western Blot
TrisBase	Merck	1.08387.2500	Western Blot
Sodyum klorür	Merck	1.06400.500	Western Blot
PVDF membrane Roll	BIO-RAD	162-0177	Western Blot
Tween 20	Merck	8.22184 500ml	Western Blot
2-propanol	Merck	100272	Western Blot
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck	8.22050 1L	Western Blot
Beta-mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH	M6250	Western Blot
TEMED	Thermo Scientific	17919	Western Blot
Acrylamide/BisAcrylamide	SIGMA-ALDRICH	A3574-5X100ML	Western Blot

4.2. YÖNTEM

4.2.1. DOKU MİKRODİZİNİ BLOKLARININ OLUŞTURULMASI

Çalışmada üç farklı boyutta doku mikrodizini bloğu oluşturuldu. KRK olguları için bir mm'lik, KRK öncül lezyonları için üç mm'lik, KRK olgularının validasyonu için ise beş mm'lik bloklar hazırlandı. Bu bloklardan bir mm'lik olanlar Advanced Tissue Arrayer (ATA100) cihazı kullanılarak üç ve beş mm'lik olanlar ise Recipient Block Mold Kit (Quick Mold) kullanılarak yapıldı.

ATA100 cihazı ile oluşturulan bir mm'lik dört doku mikrodizin bloğundan üç tanesi (TMA-K2, TMA-K3, TMA-K4) 64'er olgunun tümör doku örneklerinden oluşurken bir tanesi (TMA-K1) 16 olgunun tümör, KRK öncül lezyon ve neoplastik olmayan kolon mukozası örneklerinden oluşmaktadır. Şekil 4.1.'de belirtilen bu bloklar aşağıdaki protokole göre hazırlandı.

Çalışmaya dâhil edilen 202 KRK olgusunun H&E kesitlerinde tümör morfolojisinin en iyi temsil edildiği iki tümör odağı işaretlendi. Kesitler ilgili parafin blok ile eşleştirilerek bloktan alınacak doku alanı işaretlendi.

İşaretlenen parafin bloktan bir mm çaplı tümör doku odakları alınarak manuel mikrodizin cihazı ATA100 aracılığıyla alıcı bloğa aktarıldı.

Her olgu iki tekrarlı olmak suretiyle 202 olguyu içeren dört adet doku mikrodizin parafin bloğu oluşturuldu.

Oluşturulan parafin bloklar 50 °C'deki etüvde 15 dk bekletildikten sonra kuyulardaki tümör örnekleri aynı seviyeye getirilerek sabitlendi.

Sabitlenen bloktaki dokuların kurummasını önlemek için bloğun üzeri sıvı parafin ile kapatıldı. Böylece oluşturulan doku mikrodizini parafin bloğu kesit almak için hazır hale getirildi.

Recipient Block Mold Kit kullanılarak oluşturulan üç mm'lik iki doku mikrodizin bloğu 78 KRK öncül lezyon olgusunu, beş mm'lik iki doku mikrodizin bloğu ise KRK olgularından

seçilen TUBB3 pozitif ve negatif 15'er olguyu içermektedir. Bu bloklar aşağıdaki protokole göre hazırlanmıştır.

Çalışmaya dâhil edilen 78 adenom ve validasyonu yapılacak KRK olgularının H&E tümör kesitlerinde tümör morfolojisinin en iyi temsil edildiği iki odak işaretlendi. Kesitler ilgili parafin blok ile eşleştirilerek bloktan alınacak bölge belirlendi.

Silikon kalıplar (üç ve beş mm'lik) 70-80 °C'lik etüvde 30 dakika bekletildi.

Etüvden alınan kalıplar 60-65 °C sıcaklığındaki sıvı parafin ile doldurularak üzerine kaset yerleştirildi. Kasetin üzeri yeterli miktarda sıvı parafin ile kaplandı ve parafinin donması için oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

Parafin blok ve silikon kalıp birbirinden ayrılarak parafin blok kullanıma hazır hale getirildi.

Alıcı bloktan aktarılacak tümör alanı, tek kullanımlık deri (punch) biyopsi iğneleriyle alındı ve hazırlanan parafin bloğa aktarıldı.

Oluşturulan parafin bloklar 50 °C'deki etüvde 15 dk bekletildikten sonra kuyulardaki tümör örnekleri aynı seviyeye getirilerek sabitlendi.

Sabitlenen bloktaki dokuların kurummasını önlemek için bloğun üzeri sıvı parafin ile kapatıldı. Böylece oluşturulan doku mikrodizin parafin bloğu kesit almak için hazır hale getirildi.

KRK olgularından oluşturulan 1 mm'lik dört doku mikrodizin bloğu TMA_K1, TMA_K2, TMA_K3, TMA_K4 şeklinde isimlendirildi. 16 olgu içerecek şekilde tasarlanan doku dizini bloğundan iki tane yapıldı. (TMA_K1A ve TMA_K1B). Bu doku bloğu normal, adenom ve adenokarsinom kolon içeriğini birlikte gösterebildiği için H&E ve İHK boyamalarının optimizasyonu için kullanıldı. TUBB3 validasyonu için hazırlanan parafin bloklardan pozitif olguların bulunduğu blok TMA_K5, negatif olguların bulunduğu blok TMA_K6 şeklinde isimlendirilirken KRK öncül lezyonlarının bulunduğu bloklar ise TMA_K7 ve TMA_K8 şeklinde isimlendirildi.



Şekil 4.1 Çalışma kapsamında oluşturulan 1 mm, 3 mm ve 5mm'lik doku mikrodizin blokları

4.2.2. DOKU MİKRODİZİN BLOKLARININ İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZİ

Oluşturulan tüm doku mikrodizin bloklarından 3,5 mikronluk seri kesitler alındı. Alınan kesitlerde doku seviyesinin preparatlar arasındaki değişimini görmek amacıyla periyodik aralıklarla H&E boyaması yapıldı.

KRK olgularında MMR proteinlerinin kayıp/intakt durumunu belirlemek için dörtlü İHK paneli (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) yapıldı. H&E boyaması ve dörtlü İHK paneli Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji ABD laboratuvarı otomatize boyama sistemi ile yapıldı. İHK analizlerinde kullanılan antikorların ideal dilüsyonları ve ön işlem bilgileri Çizelge 4.3.'de görülmektedir. KRK ve öncül lezyon doku mikrodizin bloklarında (TMA-K1, TMA-K2, TMA-K3, TMA-K4, TMA-K7, TMA-K8) TUBB3 protein tespiti için TUJ-1 antikorunu kullanılarak aşağıdaki protokole göre İHK yapıldı.

Birinci Gün

Preparatlar etüvde bir gece 60 °C'de veya işlem öncesi 45 dk 75 °C'de deparafinize edildi.

İkinci Gün

1. Parafini uzaklaştırmak için 2 x 10 dk ksilen inkübasyonu uygulandı.

2. Rehidrasyon için %96, %90, %70'lik EtOH inkübasyonu 2 x 5 dk uygulandı.
3. Lamlar manyetik karıştırıcı üzerinde ddH₂O ile 3 x 3 dk yıkandı.
4. Antijen retrieval için lamlar 1X Sitrat veya 1X EDTA (300 ml) solüsyonu içerisine alındı.
5. Mikrodalga en yüksek güçte çalıştırılarak solüsyon kaynayana kadar gözlemlendi. Kaynama başlayınca fırının gücü 540W'a indirilerek 10 dk daha işleme devam edildi.
6. Lamlar oda ısısında 10 dk bekletildi.
7. Lamlar manyetik karıştırıcıda ddH₂O ile 3 x 3 dk yıkandı.
8. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için lamlar %6 H₂O₂ + %80 Metanol karışımında 20 dk bekletildi.
9. Lamlar manyetik karıştırıcıda ddH₂O ile 2 x 3 dk yıkandı.
10. Lamlar manyetik karıştırıcıda 1X PBS (phosphate buffered saline) ile 2 x 5 dk yıkandı.
11. Lamlara antikor dilüent uygulandı ve 5 dk oda sıcaklığındaki nemli tepsi içerisinde bekletildi.
12. Lam üzerindeki solüsyon yıkamadan uzaklaştırıldı, fazla solüsyon 3 MM kâğıt ile silindi.
13. Birincil antikor (TUJ-1) ile 60 dk oda sıcaklığında inkübasyon uygulandı.
14. Lamlar manyetik karıştırıcıda 1X PBS ile 3 x 5 dk yıkandı.
15. İkincil antikor ile 30 dk oda sıcaklığında inkübasyon uygulandı.
16. Lamlar manyetik karıştırıcıda 1X PBS ile 3 x 5 dk yıkandı.
17. Streptavidin-peroksidaz ile 30 dk oda sıcaklığında inkübasyon uygulandı.

18. Lamlar manyetik karıştırıcıda 1X PBS ile 3 x 5 dk yıkandı.
19. DAB (3,3'-Diaminobenzidine) hazırlandı. (40 µl DAB + 1 ml substrat)
20. DAB solüsyonu 30 sn ile 2 dk arasında mikroskop altında kontrol edilerek uygulandı.
21. Optimum süreden sonra preparatlar ddH₂O'ya koyularak reaksiyon durduruldu.
22. Zıt boyama için lamlar hematoksilin boyasına 5 sn batırılıp çıkarıldı.
23. Lamlar ılık musluk suyunda minimum 10 dk yıkandı.
24. Dehidratasyon için %70, %90, %96'lık EtOH'de 2 x 2 dk inkübasyon uygulandı.
25. Lamlara 2 x 10 dk ksilen inkübasyonu uygulandı.
26. Lamlar hafif eğimli olacak şekilde havlu peçete üzerine alındı ve balsam damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Çizelge 4.3. İHK için kullanılan antikorların bazı özellikleri

Antikor	Dilüsyon	Ön İşlem	Klon
MLH1	1/75	EDTA	Zm 001
PMS2	1/250	EDTA	A16-4
MSH2	1/80	EDTA	25D12
MSH6	1/50	EDTA	2D4B5
TUBB3	1/500	Sitrat	TUJ-1

4.2.3. MLH1 KAYBI OLAN OLGULARDA BRAF MUTASYON TESPİTİ

4.2.3.1. FFPE Dokulardan DNA İzolasyonu

Dörtlü İHK paneline göre dMMR olduğu belirlenen ve MLH1 kaybı bulunan 21 vakadan QIAamp DNA FFPE Tissue Kit ile aşağıdaki protokole göre DNA izolasyonu yapıldı.

1. Parafin dokudan 1 mm kalınlıktaki enjektör ucu ile iki adet doku örneği alınarak 2 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı.
2. Kesitlerin üzerine 1 ml ksilen eklenerek kuvvetlice 10 sn vortekslendi.
3. Oda sıcaklığında 2 dk maksimum hızda santrifüjlendi.
4. Supernatant, pelete temas edilmeden dikkatlice alınıp atıldı.
5. Peletin üzerine 1 ml %96-100'lük EtOH eklenerek vortekslendi.
6. Oda sıcaklığında 2 dk maksimum hızda santrifüjlendi.
7. Supernatant, pelete temas edilmeden dikkatlice alınıp atıldı.
8. Ependorf kapağı açılarak oda sıcaklığında veya 37°C'de 10 dk veya EtOH tamamen uçana kadar inkübasyona bırakıldı.
9. Pelete 180 µl Buffer ATL ve 20 µl Proteinaz K eklenerek vortekslendi.
10. 56 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
11. 90 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
12. Kapakta biriken damlaları indirmek için kısa süreli santrifüjlendi.
13. 200 µl Buffer AL eklenerek vortekslendi, üzerine 200 µl %96-100'lük EtOH eklenerek tekrar vortekslendi.
14. Kapakta biriken damlaları indirmek için kısa süreli santrifüjlendi.

15. Lizat, 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilen QIAamp MinElute kolona aktarıldı. 6000 g'de 1 dk santrifüjlendi, santrifüj sonrası kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.
16. 500 µl Buffer AW1 kolona eklenerek 6000 g'de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.
17. 500 µl Buffer AW2 kolona eklenerek 6000 g'de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.
18. Etanolden arındırmak için maksimum hızda 3 dk santrifüjlendi.
19. Elüsyon için kolon 1.5 ml'lik ependorf tüpe alındı, 50 µl Buffer ATE eklenerek maksimum hızda 1 dk santrifüjlendi.
20. Kolon atıldıktan sonra DNA kalitesi Nano-drop ile ölçüldü ve -20 °C'de muhafaza edilmek üzere kaldırıldı.

4.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA izolasyonu yapılan 37 olgudan MLH1 mutasyonu olan 22 vaka ile BRAF mutasyon tespiti için ARMS (Amplification-refractory mutation system) PCR kuruldu. PCR'da kullanılan primerlerin bazı özellikleri Çizelge 4.4.'de görülmektedir. PCR bileşenlerinin karışımı aşağıda Çizelge 4.5.'de belirtilen miktarlara göre hazırlandı. Kalıp DNA her örnek için 1000 ng/µl olacak şekilde kullanıldı.

Çizelge 4.4. ARMS PCR'da kullanılan primerlerin bazı özellikleri

Primer	Primer boyu	5'-3' DNA Sekansı
Rimut	20 bç	CCCACTCCATCGAGATTCT
Fo	25 bç	CTCTTCATAATGCTTGCTCTGATAG
Ro	21 bç	GCCTCAATTCTTACCATCCAC
Fiwt	22 bç	GTGATTTTGGTCTAGCTACAGT

Çizelge 4.5. ARMS PCR reaksiyonu bileşenleri

ddH₂O	14,8 µl	x örnek sayısı
10X PCR tamponu	2,5 µl	x örnek sayısı
25 mM MgCl₂	2 µl	x örnek sayısı
Fo primer (10 mM)	1 µl	x örnek sayısı
Ro primer 10 mM)	0,5 µl	x örnek sayısı
Fiwt primer (10 mM)	0,5 µl	x örnek sayısı
Rimut primer (10 mM)	2 µl	x örnek sayısı
dNTP	0,5 µl	x örnek sayısı
Taq polimeraz	0,2 µl	x örnek sayısı
DNA	1 µl	
Son hacim	25 µl	

Hazırlanan PCR tüpleri Çizelge 4.6.'da belirtilen programın girildiği termal döngü cihazına yerleştirildi ve reaksiyon başlatıldı.

Çizelge 4.6. ARMS PCR termal döngü programı

Basamak	1	2	3	4	5	6
Sıcaklık (°C)	95	95	60	72	72	4
Süre	2 sn	45 sn	45 sn	1 dk	5 dk	∞
Döngü		39 döngü				

4.2.3.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi

Reaksiyon sonrası PCR ürünlerinin kontrolü %1,5'luk agaroz jel elektrofrezinde yapıldı. Hazırlanan agaroz jelde 10 µl PCR ürünü ve 2 µl 6X yükleme boyası karışımı yürütüldü. Böylece PCR ile yapılan mutasyon analizi sonuçları jelde görüntülenerek kontrol edildi.

4.2.4. HÜCRE HATTI VE TAZE DOKUDAN RNA İZOLASYONU

1. İzolasyon kaynağına göre uygun homojenizasyon aşaması uygulandı.

A- RNALater içindeki taze doku homojenizatöre alındı ve 1 ml Trizol eklendi. Homojenize edilen hücre lizatı 2 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı.

B- Hücre peleti üzerine 1 ml Trizol eklendi. Homojenizasyon için pipetaj yapıldı.

C- Hücre kuyularına 1 ml Trizol eklendi. Homojenizasyon için pipetaj yapıldı

2. Hücre lizatı nükleoprotein kompleksinin çözülmesi için 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
3. 0,2 ml kloroform eklendi, 15 sn kuvvetlice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2-3 dk inkübasyona bırakıldı.
4. 12000 g'de 15 dk 4 °C'de santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası oluşan üç fazdan en üstteki renksiz faz diğer fazlardan bulaş olmayacak şekilde alındı ve yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
6. RNA'yı çöktürmek amacıyla 0.5 ml izopropanol eklendi. Tüp, aşağı yukarı çevrilerek homojenlik sağlandıktan sonra 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
7. 12000 g'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
8. Peletin yıkamak için %75'lik EtOH'dan 1 ml eklenerek vortekslendi.
9. 7500 g'de 5 dk 4 °C'de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
10. Pelet oda sıcaklığında 5-10 dk bekletilerek alkolün uçması sağlandı.
11. 100 µl RNase içermeyen su eklendi.
12. 10 dk 55-60 °C'de inkübe edildikten sonra RNA -80 °C'ye kaldırıldı.

4.2.5. RNA KALİTE VE KONTROL TAYİNİ

Elde edilen RNA örneklerinin saflık ve miktar tayini ölçümü Nano-Drop ile yapıldı. (Çizelge 4.7.) Ölçüm sonunda 200 ng/µl konsantrasyonda ve 50 µl hacimde alikodlanan RNA örnekleri -80 °C'ye kaldırıldı.

Çizelge 4.7. Taze doku ve hücre hattından elde edilen RNA'ların konsantrasyonları

Örnek Adı	A ₂₆₀ oranı	A ₂₆₀ /A ₂₃₀ oranı	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ oranı
1 (taze doku)	673	2,3	2,0
2 (taze doku)	1398,9	2,2	2,0
3 (taze doku)	251,9	2,2	2,0
4 (taze doku)	1367,3	2,2	2,0
5 (taze doku)	277,9	2,2	2,0
6 (taze doku)	309,3	2,1	2,0
HCT116 (siRNA öncesi-birinci biyolojik tekrar)	1630	1,91	2,0
HCT116 (siRNA öncesi-ikinci biyolojik tekrar)	1500	1,9	2,0
HCT116 - 12.5 nM TUBB3 siRNA	160	1,64	0,36
HCT116 - 25 nM TUBB3 siRNA	144,9	1,67	0,45
HCT116 - 50 nM TUBB3 siRNA	459,9	1,87	1,10
HCT116 - 12.5 nM kontrol siRNA	876	1,87	1,26
HCT116 - 25 nM kontrol siRNA	73,8	1,60	0,36
HCT116 - 50 nM kontrol siRNA	50,6	1,62	0,48
HCT116 – birinci kontrol	144,9	1,75	0,85
HCT116 – ikinci kontrol	528,2	1,84	1,68

4.2.6. CDNA SENTEZİ

İzole edilen RNA örneklerinden Invitrogen High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Hücre hatları, taze KKK dokuları ve siRNA transfeksiyonu öncesinde HCT116 hücre hattı RNA örneklerinden 2000 ng ile transfeksiyon

sonrası elde edilen RNA örneklerinden 500 ng ile cDNA reaksiyonu kuruldu. Kit protokolü aşağıdaki gibi uygulandı.

1. Son hacimi 20 µl olması gereken her bir reaksiyon için 2X revers transkriptaz (RT) karışımı Çizelge 4.8.'de belirtilen miktarlara göre hazırlandı.

Çizelge 4.8. cDNA sentez protokolüne göre bileşenlerin miktarı

10X RT tamponu	2 µl	x örnek sayısı
25X dNTP karışımı (100mM)	0,8 µl	x örnek sayısı
10X RT Random Primer	2,0 µl	x örnek sayısı
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0 µl	x örnek sayısı
RNase İnhibitörü	1,0 µl	x örnek sayısı
Nükleaz içermeyen ddH₂O	3,2 µl	x örnek sayısı
Toplam	10 µl	

2. Hazırlanan karışım örnek tüplerine 10 µl olacak şekilde dağıtıldı, üzerine belirlenen RNA konsantrasyonuna denk gelen hacim ve gerekiyorsa son hacmi 20 µl'ye tamamlayacak kadar nükleaz içermeyen su eklendi.
3. Kısa bir santrifüjleme yapılan reaksiyon tüpleri Çizelge 4.9.'daki programın girildiği termal döngü cihazına yerleştirildi ve reaksiyon başlatıldı.
4. Reaksiyon sonrası cDNA'lar -20 °C'ye kaldırıldı.

Çizelge 4.9. Reverse transkriptaz PCR için termal döngü programı

Basamak	1	2	3	4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk	120 dk	5 Dk	∞

4.2.7. EŞ ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (qRT-PCR)

Bu çalışmada eş zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) SYBR Green bazlı qRT-PCR olarak planlandı ve primer tasarımları yapıldı. TUBB3 normalizasyonu için HPRT1 geni referans olarak kullanıldı. siRNA uygulaması öncesinde yapılan qRT-PCR reaksiyonları iki biyolojik ve iki teknik tekrarlı olup diğer reaksiyonlar bir biyolojik ve iki teknik tekrar olacak şekilde çalışıldı. siRNA transfeksiyonu öncesinde yapılan qRT-PCR reaksiyonlarında cDNA başlangıç miktarı çok yoğun olduğu için 20X dilüe edilerek kullanılırken siRNA transfeksiyonu sonrası cDNA 2X dilüe edilerek kullanıldı. Kullanılan primerlerin özellikleri Çizelge 4.10.'da görülmektedir. Reaksiyonlar, Thermo Scientific Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix (2X) kiti ile aşağıdaki protokole göre hazırlandı ve Stratagene Mx3005P sisteminde çalıştırıldı.

Çizelge 4.10. qRT-PCR'da kullanılan primerlerin özellikleri

Primer	Primer boyu	Tm (°C)	5'-3' DNA Sekansı	Amplikon boyu
TUBB3-F	19 bç	61	GGCCAAGGGTCACTACACG	85 bç
TUBB3-R	21 bç	60	GCAGTCGCAGTTTTTCACACTC	
HPRT1-F	21 bç	56	TGACACTGGCAAAACAATGCA	106 bç
HPRT1-R	21 bç	60	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	

Çalışmada farklı kaynaklarından elde edilen cDNA'lar kullanılarak qRT-PCR tekniği birkaç kez kullanıldı. Bunlar sırasıyla;

1. çalışmaya dâhil edilecek hücre hattının belirlenebilmesi için Caco-2, DLD-1, HCT116, HT-29, LoVo, LS174T, SW480, SW837 ve RKO hücre hatlarını kapsayan dokuz adet KRK hücre hattında TUBB3 ifade düzeyinin belirlenmesi,
2. taze dokularda TUBB3 ifade düzeyinin belirlenmesi,
3. HCT116 hücre hattında siRNA transfeksiyonu öncesi ve sonrasında TUBB3 ifade düzeyinin belirlenmesi

şeklindedir. Tüm aşamalarda aşağıdaki protokol uygulandı.

1. Kit bileşenleri -20 °C'den çıkarılarak buz üzerinde çözdürüldü ve çok kısa santrifüjlendi.
2. qRT-PCR karışımı Çizelge 4.11.'de belirtilen miktarlara göre hazırlandı.

Çizelge 4.11. qRT-PCR reaksiyonu bileşenleri

2X qRT-PCR karışımı	10 µl	x örnek sayısı
Primer karışımı	2 µl	x örnek sayısı
cDNA	8 µl	
Toplam	20 µl	

3. Hazırlanan primer ve 2X qRT-PCR karışımı tüplere 12 µl olarak dağıtıldı.
4. Yukarıdaki tabloda belirtilen miktarda cDNA reaksiyon tüplerine eklendi ve son hacim 20 µl olacak şekilde tamamlandı.
5. Tüplerde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek çok kısa santrifüjlendi.
6. Reaksiyon tüpleri cihaza yerleştirildi ve Çizelge 4.12.'de belirtilen programda reaksiyon başlatıldı.
7. Reaksiyon sonrası ürünler agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi, kalan miktar -20 °C'ye kaldırıldı.

Çizelge 4.12. qRT-PCR termal döngü programı

Basamak	Ön işlem ve Denatürasyon		Amplifikasyon			Erime Eğrisi		
	1	2	3	4	5	6	7	8
Sıcaklık (°C)	50	95	95	60	72	95	60	95
Süre	2 dk	10 dk	15 sn	30 sn	30 sn	15 sn	30 sn	30 sn
Döngü Sayısı			40					

4.2.8. QRT-PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KONTROLU

qRT-PCR reaksiyonlarından elde edilen tüm ürünlerin kontrol edilmesi için %2'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Hazırlanan agaroz jele 10 µl PCR ürünü ve 2 µl 6X yükleme boyası karışımı yüklendi. Ürünler jelin yarısını geçene kadar yürütüldü ve daha sonra UV altında görüntüledi.

4.2.9. HÜCRE HATTINDAN PROTEİN İZOLASYONU

Çalışmada HCT116 hücre hattından siRNA uygulaması öncesi ve sonrasında RIPA (Radioimmunpresipitation assay buffer) solüsyonu kullanılarak protein izolasyonu yapıldı.

4.2.9.1. RIPA Solüsyonunun Hazırlanması

Çizelge 4.13.'de 1 ml RIPA solüsyonu için belirtilen miktarlar, izolasyonda kullanılacak örnek sayısı ve hacmi dikkate alınarak istenen son hacime göre değiştirilebilmektedir.

1. Kullanılacak bileşenler buz üzerine alındı.
2. Aşağıda belirtilen miktarlar buz üzerindeki 2 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı.

Çizelge 4.13. RIPA solüsyonu bileşenleri

2M NaCl	75 µl
1M TrisHCl (pH 8.0)	50 µl
NP-40	10 µl
%10 SDS	10 µl
25X Proteaz inhibitörü	40 µl
ddH₂O	815 µl
Toplam	1 ml

3. Karışım homojen bir görüntü kazanana kadar kuvvetlice vortekslendi.
4. Kullanıma hazır hale gelen RIPA solüsyonu buz üzerine alındı.

4.2.9.2. Protein İzolasyonu

HCT116 hücre hattında siRNA uygulaması öncesinde T75 flasktan, siRNA uygulaması sonrasında ise 12 kuyulu plakanın bir kuyusundan protein izolasyonu yapıldı. Protein izolasyonunda aşağıdaki protokol uygulandı.

1. Hücre peletinin üzerine 100 µl RIPA solüsyonu eklenerek homojen bir görüntü elde edene kadar pipetaj yapıldı.
2. Homojenizasyon sonrasında kalan RIPA tekrar buza alınarak protein konsantrasyon ölçümünde kullanılmak üzere saklandı.
3. Homojen görüntüye ulaşan örnekler her 10 dakikada bir kuvvetlice vortekslenmek üzere 30 dk buzda inkübasyona bırakıldı.
4. Örnekler 11.000 rpm'de (HETTICH ROTINA 380 R) 4 °C'de 20 dk santrifüjlendi.
5. Süpernatant pelet bulaşması olmayacak şekilde yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
6. İzole edilen protein konsantrasyonunun belirlenebilmesi için örnekler sonraki aşamaya kadar buzda inkübe edildi.

4.2.10. PROTEİN KONSANTRASYON TAYİNİ

Protein konsantrasyonu bisinkoninik asit yöntemi (bicinchoninic acid assay, BCA) ile belirlendi. Bu aşamada Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit kullanıldı. Kit açıldığında önce her ölçümde kullanılacak olan sığır serum albümin (bovine serum albumine, BSA) standartları (std) hazırlandı ve konsantrasyon tayini için aşağıdaki protokol uygulandı.

4.2.10.1. BSA Standartlarının Hazırlanması

Konsantrasyonu bilinmeyen proteinin doğru ölçülebilmesi amacıyla standart eğrinin çizilebilmesini sağlayan BSA standartları, kit protokolünde Tablo-1'de belirtilen 20-2000 µg/ml protein çalışma aralığı dikkate alınarak Çizelge 4.14.'de belirtildiği gibi hazırlandı ve -20 °C'ye kaldırıldı.

Çizelge 4.14. BSA standartlarının hazırlanışı

Tüp	Dilüent hacmi	Hacim ve BSA kaynağı	Son BSA konsantrasyonu (mg)
A	0	300 µl stok	2000
B	125	375 µl stok	1500
C	325	325 µl stok	1000
D	175	175 µl B tüpü	750
E	325	325 µl C tüpü	500
F	325	325 µl E tüpü	250
G	325	325 µl F tüpü	125

4.2.10.2. Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Bu aşamada kit protokolüne uygun olarak aşağıda belirtilen protokol takip edildi. Ölçüm sonuçları Çizelge 4.16.'da görülmektedir.

1. Çalışma solüsyonu kit içerisindeki Reagent A ve Reagent B bileşenlerinden 50:1 oranında hazırlanacağı için sırasıyla 1 ml ve 20 µl alındı ve ependorf tüpe aktarıldı.
2. Hazırlanan çalışma solüsyonu buza alındı.
3. Çizelge 4.15.'de belirtildiği gibi ölçüm tüpleri hazırlandı.
4. Hazırlanan tüpler 37 °C'de 30 dk karanlıkta inkübe edildi.
5. Nano-drop cihazında 2 µl çalışma solüsyonu ile blank yapıldı.
6. 1-7 arasındaki tüm tüplerin konsantrasyonu 2 µl hacim ile ikişer kez ölçüldü.
7. Standartların tamamı ölçülerek standart eğri çizildikten sonra kontrol örneği 2 µl hacim ile ölçüldü.
8. İzole edilen protein örneği 2 µl hacim ile ölçüldü.

9. Ölçüm sonucuna göre izole edilen protein, belirlenen konsantrasyon ve hacimde alikodlandı ve -20 °C'ye kaldırıldı.

Çizelge 4.15 BCA assay için örneklerin hazırlanması

	1	2	3	4	5	6	7	Kontrol	Protein
Çalışma Solüsyonu	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
BSA standartları	2µl A	2µl B	2µl C	2µl D	2µl E	2µl F	2µl G	-	-
RIPA	-	-	-	-	-	-	-	2 µl	-
İzole Protein	-	-	-	-	-	-	-	-	2 µl
Standartların Konsantrasyonu	2 µg/ml	1.5 µg/ml	1 µg/ml	0.75 µg/ml	0.50 µg/ml	0.25 µg/ml	0.125 µg/ml	-	-
Son Hacim	42 µl	42 µl	42 µl	42 µl	42 µl	42 µl	42 µl	42 µl	42 µl

Çizelge 4.16 Ölçülen protein konsantrasyonları

Örnek Adı	Protein Konsantrasyonu (mg/ml)
HCT116 siRNA öncesi	11,45
HCT116 50 nM TUBB3 siRNA	1,385
HCT116 50 nM kontrol siRNA	1,501
HCT116 kontrol	1,597

4.2.11. WESTERN BLOT

HCT116 hücre hattında siRNA uygulaması öncesi ve sonrasında TUBB3 ve referans olarak kullanılan β -actin (ACTB) protein düzeyleri western blot ile analiz edildi. Western blot analizinde çalışılan kaynaktaki TUBB3 ve ACTB'nin aynı membranda görüntülenebilmesi için membranda önce TUBB3 primer antikor uygulaması ve görüntülemesi yapıldı. Aynı membran görüntüleme aşamasından sonra tekrar bloklandı ve işlemler ACTB antikoruna için tekrarlandı. Western blot analizi dört temel aşamada aşağıdaki protokole belirtildiği gibi uygulandı.

4.2.11.1. Örneklerin Hazırlanması

Jele yüklenecek protein miktarı 30 μ g olarak belirlendi. Yükleme için 6X Laemmli tampon kullanıldı. Bu aşamada aşağıdaki protokol ile proteinler denatüre edilip indirgenerek yürütmeye hazır hale getirildi.

1. Konsantrasyonu bilinen protein alikodundan 30 μ g protein için alınması gereken hacim hesaplandı.
2. Protein alikodu -20 °C'den buz üzerine alınarak çözündürüldü.
3. Hacminin 1:8'i kadar β -merkaptoetanol eklenen 6X Laemmli tampondan uygun hacim ependorf tüpe aktarıldı.
4. Protein alikodundan hesaplanan hacimde alındı ve yükleme tamponunun üzerine eklendi.
5. Protein ve tampon karışım 95 °C'de 10 dk inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası kısa süre santrifüjlenen örnekler yüklemeye hazır halde buza alındı.

4.2.11.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ile görüntülemek istenilen TUBB3 proteini 50 kDa referans protein ACTB ise 42 kDa ağırlığındadır. Bu nedenle ayırıcı jelin %10'luk, paketleyici jelin ise %5'lik dökülmesi kararlaştırıldı. %30'luk akrilamid/bisakrilamid (Ac/BisAc) karışımı ticari olarak satın alındı. SDS-PAGE için aşağıdaki protokol uygulandı.

1. Jelin döküleceği camlar EtOH ile silindi.
2. Jelin döküleceği istasyon hazırlandı ve camlar yerleştirildi.
3. %10'luk ayırıcı poliakrilamid jel Çizelge 4.17.'deki gibi hazırlandı.
4. Jel döküldükten sonra havayla temasını kesmek için üzeri 200 µl 2-propanol ile kaplandı.
5. Jelin polimerleşmesi için 30 dk beklendi, polimerleşen jelin üzerindeki 2-propanol ddH₂O ile yıkanarak uzaklaştırıldı.
6. %5'lik paketleyici poliakrilamid jel Çizelge 4.18.'deki gibi hazırlandı.
7. Paketleyici jel döküldükten sonra tarak yerleştirildi.
8. Jelin polimerleşmesi için 30 dk beklendi, polimerleşen jelden tarak çıkarıldı.
9. Kuyularda kalan hava kabarcıkları kuyuların ddH₂O ile yıkanmasıyla uzaklaştırıldı.
10. Jel sistemi tank içerisine yerleştirildi ve jel seviyesine kadar 1X yürütme tamponu eklendi.
11. Önce örnekler en son ladder özel uçlu pipet ile jele yüklendi.
12. Paketleyici jelde 90 V ile ayırıcı jelde 120 V ile örnekler yürütüldü.

Çizelge 4.17. %10'luk ayırıcı akrilamid jel bileşenleri

%10 poliakrilamid jel	1 jel	2 jel
ddH₂O (ml)	1,9	4
1.5 M Tris (pH: 8.8) (ml)	1,3	2,5
%30'luk Ac/BisAc (ml)	1,7	3,3
%10 SDS (µl)	50	100
%10 APS (µl)	50	100
TEMED (µl)	2	4
Son Hacim (ml)	5	10

Çizelge 4.18. %5'lik paketleyici akrilamid jel bileşenleri

%5'lik poliakrilamid jel	1 jel	2 jel
ddH₂O (ml)	1,4	2,7
0.5 M Tris (pH: 6.8) (ml)	0,25	0,50
%30'luk Ac/BisAc (ml)	0,33	0,67
%10 SDS (µl)	20	40
%10 APS (µl)	20	40
TEMED (µl)	2	4
Son Hacim (ml)	2	4

4.2.11.3. Transfer

Transfer için poli-viniliden florür (PVDF) membran kullanıldı ve transfer işlemi ıslak transfer şeklinde yapıldı. Bu aşamada aşağıdaki protokol uygulandı.

13. Elektroforez sonrası jel aparatı açıldı ve paketleyici jel kesilerek uzaklaştırıldı.

14. Örneklerin bulunduğu ayırıcı jel transfer tamponu içerisine alındı.
15. PVDF membran jel boyutunda kesildi ve %100 metanol içerisinde 20 sn inkübe edildi.
16. Metanolden alınan membran önce ddH₂O daha sonra transfer tamponu içine alındı. Bu aşamada membran ve jel farklı ortamlarda transfer tampon içerisinde tutuldu.
17. Transfer süngerleri ve dört adet kurutma kâğıdı da jel ve membrandan ayrı bir yerde transfer tamponu içerisine alındı.
18. Tüm bileşenlerin transfer tamponu içerisindeki yaklaşık 10 dk inkübasyonundan sonra elektriksel yöne dikkat ederek transfer sandviçi hazırlandı.
19. Sandviç tank içerisine yerleştirilerek transfer tamponu eklendi.
20. Transfer işlemi +4 °C’de 90 V’da 90 dakikada gerçekleştirildi.
21. Transfer sonrası sandviçten alınan PVDF membran TBST içerisinde oda sıcaklığında 5 dk çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

4.2.11.4. Bloklama ve Antikor Uygulaması

Bu aşamada proteinlerin transfer edildiği PVDF membran ile birincil antikor arasındaki spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla yağsız süt tozu kullanılarak bloklama yapıldı. Bloklama solüsyonu olarak %5’lik süt tozu içeren 15 ml TBST kullanıldı. Birincil antikor olarak; TUBB3 için İHK analizinde kullanılan TUJ-1 antikor, ACTB için Monoconal Anti-β-Actin antikor kullanıldı. İkincil antikor olarak Anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP kullanıldı. Birincil ve ikincil antikorların dilüsyonu bloklama solüsyonu ile yapıldı. TUJ-1 antikor 1:1000 dilüsyonda, ACTB antikor 1:20000 dilüsyonda, ikincil antikor ise 1:4000 dilüsyonda kullanıldı.

22. Membran TBST içerisinde 5 dk yıkandıktan sonra TBST döküldü, bloklama solüsyonu membranın üzerine eklendi.
23. Membran bloklama solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde bir saat inkübe edildi.

24. Bloklama sonrası membran TBST ile 5 x 5 dk yıkandı.

25. Membran birincil antikor ile +4 °C'de çalkalayıcı üzerinde bir gece boyunca muamele edildi.

2. gün

26. Birincil antikordan alınan membran 5 dk x 5 TBST ile yıkandı.

27. Membran çalkalayıcı üzerinde 1:4000 dilüsyondaki ikincil antikor ile bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

28. İkincil antikordan alınan membran TBST ile 5 x 5 dk yıkandı.

4.2.11.5. Görüntüleme

PVDF membranın görüntülenmesi için Thermo Scientific SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kullanıldı. Görüntüleme cihazında kemilüminesans filtre ile görüntüleme yapıldı.

29. Görüntüleme substratı bileşenleri 1:1 oranında son hacim 1 ml olacak şekilde ependorf tüpe aktarıldı.

30. Substrat TBST içinden alınan membran üzerine eklendi.

31. Membran ve substrat oda sıcaklığında karanlıkta 5 dk inkibe edildi.

32. Görüntüleme cihazında protein bantları kontrol edildi.

4.2.12. HCT116 HÜCRE HATTINDA TUBB3'ÜN SUSTURULMASI

HCT116 hücre hattı on dokuzuncu pasajda alındığı için tüm işlemler on dokuzuncu ve otuz beşinci pasajlar arasında yapıldı. Hücre hattı çoğaltılarak TUBB3 ifade düzeyi qRT-PCR ve western blot ile incelendi. Ayrıca hücre hattından alınan hücreler parafin bloğa gömülerek İHK ile de TUBB3 ifadesi gösterildi. Daha sonra 12 kuyulu plakalara ekilen hücrelere siRNA transfeksiyonu yapıldı. siRNA transfeksiyonu sonuçları qRT-PCR ve western blot ile gösterildi. İkinci aşama olarak 96 kuyulu plakalarda siRNA transfeksiyonu yapılan

hücreler belirlenen dozlarda paklitaksel ile muamele edildi ve hücrelere canlılık tayini yapıldı ve paklitaksel için IC₅₀ dozları belirlendi.

4.2.12.1. Hücrelerin Çoğaltılması

HCT116 hücre hattı %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 Penycilin-Streptomycin (pen/strep) eklenen Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12 ile çoğaltıldı ve aşağıdaki protokole göre pasajlandı. Bu protokole kullanılan malzemeler işlem öncesinde oda sıcaklığına getirilerek kullanıldı. Çalışma süresince pasajlamalar 1:3 oranında yapıldı ve T25 flaskta hücrelerin 2-3 gün içerisinde yüzeyi kaplayarak pasajlanmaya uygun hale geldiği görüldü.

1. Hücreler T25 flask alanını %80-90 oranında doldurduğunda pasaj işlemi için kültür kabine alındı.
2. Flask içerisindeki besiyeri aspiratör ile çekilerek uzaklaştırıldı.
3. Flask yüzeyi 5 ml DPBS ile iki kez yıkandı.
4. Flask içerisine 500 µl tripsin flask içerisine aktarıldı ve flask 1 dk süre ile 37 °C'lik etüvde inkübe edildi.
5. Etüvden alınan flask içerisine 5 ml DMEM-F12 aktarıldı, besiyeri birkaç kez yavaşça çekilip bırakılarak hücrelerin yüzeyden ayrıldığı görüldü.
6. Son durumda 5,5 ml olan flask içeriği 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.
7. Hücreler 125 g'de 5 dk santrifüjlendi, süpernatant aspire edildi.
8. Hücreleri yıkamak için pelet 5 ml DPBS ile süspanse edildi.
9. Hücreler 125 g'de 5 dk santrifüjlendi, süpernatant aspire edildi.
10. Pelet 3 ml DMEM-F12 ile süspanse edildi.
11. Yeni açılan T25 flask içerisine 5 ml DMEM-F12 aktarıldı.
12. Süspanse edilen hücrelerden 1 ml alındı ve yeni flaska aktarıldı.
13. Flaska aktarılan hücreler mikroskop altında kontrol edildi ve %5 CO₂'li 37 °C'deki etüve kaldırıldı.

4.2.12.2. Hücre Peleti Alınması

HCT116 hücrelerinden RNA ve protein izolasyonu yapmak için hücreler T75 flasklarda çoğaltıldı ve aşağıdaki protokole göre hücre peleti alındı.

1. T75 flaska 1:3 oranında ekilen hücreler yüzey alanını %80-90 oranında kapladığında flask kültür kabinine alındı.
2. Flask içerisindeki besiyeri aspiratör ile çekilerek uzaklaştırıldı.
3. Flask yüzeyi 5 ml DPBS ile iki kez yıkandı.
4. Flask içerisine 4 °C'den alınan 5 ml DPBS aktarıldı.
5. Hücreler kazıyıcı yardımıyla DPBS içerisinde flask yüzeyinden kaldırıldı.
6. Flask içeriği 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.
7. Hücreler 125 g'de 5 dk santrifüjlendi, süpernatant aspire edildi.
8. Hücre peleti izolasyon işlemine kadar -20 °C'ye kaldırıldı.

4.2.12.3. Hücre Bloğunun Hazırlanması

Hücre bloğu hazırlanırken hücre kaybı olabileceği düşünülerek hücreler T75 flaskta çoğaltıldı. Hücreler flaskların birinden kazıyıcı diğerinden ise tripsin kullanılarak yukarıdaki protokollerde belirtilen şekilde kaldırıldı ve iki ayrı hücre bloğu aşağıdaki protokol takip edilerek oluşturuldu.

1. Tripsin ile kaldırılan hücreler DPBS ile yıkanır, pelet DPBS ile süspansedildi.
2. 10 ml DPBS içerisinde süspansedildi hücreler 50 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.
3. Hücreler 1670 rpm'de (HETTICH ROTINA 380 R) 5 dk santrifüjlendi.
4. Süpernatant tamamen dökülmeden dibinde 5 ml bırakıldı.
5. Falkon tüpe 10 ml %96'lık EtOH eklendi.
6. Falkon tüp çalkalanarak pelet kaldırıldı.
7. Hücreler tekrar çökebilmeleri için oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
8. Hücreler 1670 rpm'de (HETTICH ROTINA 380 R) 5 dk santrifüjlendi.
9. Süpernatant tamamen dökülmeden dibinde 5 ml bırakıldı.
10. Falkon tüpe 10 ml %96'lık EtOH eklendi.
11. Falkon tüp çalkalanarak pelet kaldırıldı.
12. Hücreler tekrar çökebilmeleri için oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
13. Süpernatant tamamen döküldü.
14. Kaset üzeri uygun şekilde yazıldı.
15. Falkon tüp uygun şekilde kesilmiş kâğıt havlu üzerine ters çevrildi ve fazla sıvı alındı.

16. Spatül yardımıyla pelet kaldırıldı, kavut havlu içerisine paketlenerek kasete yerleştirildi.
17. Kaset yarısı tamponlu formaldehit yarısı %96'lık EtOH olan 200 ml'lik karışım içerisinde en az bir saat inkübe edildi.
18. Kaset patoloji anabilim dalında küçük doku takibine verildi.
19. Ertesi gün doku takibinden alınan kaset bloklandı.
20. Hücre bloğundan kesitler alındı patoloji anabilim dalı H&E boyamasına verildi.
21. Kesitlere H&E ve TUBB3 İHK boyaması yapıldı.

4.2.12.4. siRNA Transfeksiyonu İçin Hücre Sayımı ve Ekimi

Çalışma öncesi yapılan optimizasyona göre 12 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 1 ml besiyeri içerisinde 50000 hücre, 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna ise 100 µl besiyeri içerisinde 5000 hücre ekilmesine karar verildi. T25 flasktan kaldırılan hücreler aşağıdaki gibi sayılarak 12 veya 96 kuyulu plakalara siRNA üreticisinin protokolde belirttiği gibi antibiyotik içermeyen sadece %10 FBS eklenmiş DMEM-F12 ile ekildi.

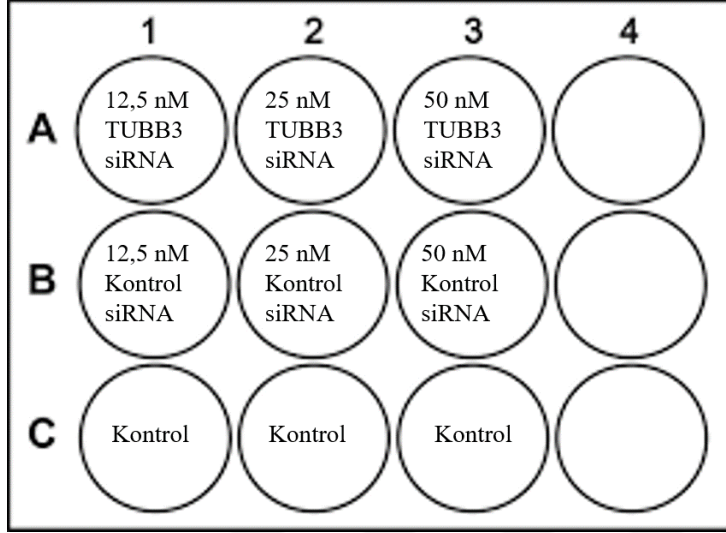
1. T25 flasktan tripsin ile kaldırılan hücreler DPBS ile yıkandı.
2. Pelet 3 ml sadece %10 FBS eklenmiş DMEM-F12 ile süspansede edildi.
3. Süspansede hücreden 20 µl ve trypan blue boyasından 20 µl alınarak 1:1 oranında karıştırıldı.
4. Boya ve hücre karışımı 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. Karışım hemasitometre haznesine aktarıldı.
6. Hücre sayımı yapıldı ve 1 ml içerisindeki hücre sayısı belirlendi.
7. Ekilecek hücre sayısı için süspansede hücre stoğundan alınması gereken hacim hesaplandı.
8. Süspansede hücre stoğundan ekim için gereken hacim çekildi ve %10 FBS eklenmiş DMEM-F12 bulunan kuyulara hücre ekimi yapıldı.
9. Ekim yapılan plaka %5 CO₂'li 37 °C'lik etüve 24 saat inkübasyon için bırakıldı.

4.2.12.5. siRNA Transfeksiyonu

HCT116 hücrelerinde TUBB3 genini en yüksek oranda susturan siRNA miktarını belirlemek amacıyla 12,5 nM, 25nM ve 50 nM olmak üzere üç farklı siRNA konsantrasyonu kullanılmasına karar verildi. Optimizasyon çalışması 12 kuyulu plakalarda yapıldı.

Çalışmada her bir konsantrasyon için TUBB3 siRNA, kontrol siRNA ve herhangi bir müdahalede bulunulmayan kontrol hücre kuyusu olmak üzere üç kuyu çalışılması planlandı. (Çizelge 4.19.) siRNA konsantrasyonları hazırlanırken antibiyotik ve FBS içermeyen saf DMEM-F12 ile sadece %10 FBS içeren DMEM-F12 kullanıldı. Transfeksiyon aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

Çizelge 4.19 siRNA transfeksiyonu optimizasyon plakası



1. Her bir kuyuda son hacim 1 ml olacağı için 5 µM konsantrasyondaki stoktan çekilmesi gereken siRNA miktarı aşağıdaki gibi belirlendi.

$$5 \mu\text{M} \times A = 12,5 \text{ nM} \times 1000 \mu\text{l} \rightarrow A = 2,5 \mu\text{l}$$

$$5 \mu\text{M} \times A = 25 \text{ nM} \times 1000 \mu\text{l} \rightarrow A = 5 \mu\text{l}$$

$$5 \mu\text{M} \times A = 50 \text{ nM} \times 1000 \mu\text{l} \rightarrow A = 10 \mu\text{l}$$

2. Kontrol siRNA ve TUBB3 siRNA'nın her bir konsantrasyonu için ikişer tane endorf tüp hazırlandı.
3. Transfeksiyon ajanı (Dharmafect I) ve saf DMEM-F12 içeren, hacmi 100 µl olan ikinci tüpler kontrol siRNA ve TUBB3 siRNA için Çizelge 4.20.'de belirtilen miktarlara göre hazırlandı.
4. siRNA ve saf DMEM-F12 içeren, hacmi 100 µl olan birinci tüpler kontrol siRNA ve TUBB3 siRNA için Çizelge 4.20.'de belirtilen miktarlara göre hazırlanarak oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.

5. İnkübasyon sonrası birinci tüplerin içeriği her konsantrasyonun ikinci tüpüne aktarıldı ve 200 µl hacimdeki karışım 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası tüplerin üzerine 800 µl antibiyotiksiz, %10 FBS içeren DMEM-F12 eklendi.
7. Sonuçta, her biri 1 ml hacimde olan üç adet kontrol siRNA konsantrasyonu ve üç adet TUBB3 siRNA konsantrasyonu kuyulara verilmek üzere hazırlandı.
8. 24 saat önce kuyularına 50000 hücre ekilen Çizelge 4.19.'daki 12 kuyulu plaka etüvden alındı.
9. Hücreler mikroskop altında kontrol edildi.
10. Kuyulardaki besiyeri aspire edildi.
11. siRNA içeren besiyerleri Çizelge 4.19.'da belirtilen kuyulara aktarıldı.
12. Hücreler %5 CO₂'li 37 °C'deki etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı.
13. siRNA transfeksiyonunun 48.saatinde besiyeri aspire edildi ve hücrelerin üzerine trizol eklenerek RNA izolasyonu protokolü uygulandı.

Çizelge 4.20. 12 kuyulu plakalar için siRNA konsantrasyonlarının hazırlanışı

	12,5 nM	25 nM	50 nM
1.tüp	5µM siRNA → 2,5 µl Saf DMEM-F12 →97,5 µl	5µM siRNA → 5 µl Saf DMEM-F12 95 µl	5µM siRNA →10 µl Saf DMEM-F12 →90 µl
2.tüp	Dharmafect I → 1 µl Saf DMEM-F12 →99 µl	Dharmafect I → 1 µl Saf DMEM-F12 →99 µl	Dharmafect I → 1 µl Saf DMEM-F12 →99 µl
Antibiyotiksiz, FBS içeren DMEM-F12	800 µl	800 µl	800 µl
Son Hacim	1ml	1ml	1ml

Optimizasyon sonucunda qRT-PCR verilerine dayanarak 50 nM siRNA kullanılmasına karar verildi. TUBB3 ifadesinin sustuğunu protein düzeyinde de görmek için transfeksiyon 12 kuyulu plakada 50 nM kontrol siRNA ve TUBB3 siRNA ile tekrarlandı. Transfeksiyonun 72. saatinde protein izolasyonu için kuyulardan hücre kazıyıcı ile pelet alınarak protein izolasyonu ve western blot protokolü uygulandı.

TUBB3 ifadesi susturulan hücrelere paklitaksel muamelesi ve canlılık tayini için siRNA transfeksiyonu 96 kuyulu plakalarda da tekrarlandı. 96 kuyulu plakalarda da 50 nM siRNA transfeksiyonu üç teknik ve üç biyolojik tekrar olacak şekilde aşağıdaki protokole göre yapıldı. HCT116 hücrelerinde TUBB3 ifadesinin proliferasyon üzerindeki etkisini belirlemek için Çizelge 4.22.'de görülen plaka iki replikada siRNA transfeksiyonu yapıldı. Replika plakalardan birine transfeksiyondan 24 saat diğereine 48 saat inkübasyon sonunda canlılık tayini protokolü uygulandı. Paklitaksel uygulaması ve sonrasında canlılık tayini için Çizelge 4.23.'de belirtilen üç plakada siRNA transfeksiyonu yapıldı.

Çizelge 4.21. 96 kuyulu plakalar için siRNA konsantrasyonlarının hazırlanışı

50 nM siRNA	1 kuyu	10 kuyu
1.tüp	5µM siRNA →1 µl Saf DMEM-F12 →9 µl	5µM siRNA →10 µl Saf DMEM-F12 →90 µl
2.tüp	Dharmafect I → 0.1 µl Saf DMEM-F12 →9.9 µl	Dharmafect I → 1 µl Saf DMEM-F12 →99 µl
Antibiyotiksiz, FBS içeren DMEM-F12	80 µl	800 µl
Son Hacim	100 µl	1000 µl

1. Her bir kuyuda son hacim 100 µl olacağından 50 nM siRNA uygulamak için 5 µM konsantrasyondaki stoktan çekilmesi gereken siRNA miktarı aşağıdaki gibi belirlendi.

$$5 \mu\text{M} \times A = 50 \text{ nM} \times 100 \mu\text{l} \rightarrow A = 1 \mu\text{l}$$

Çalışma üç teknik ve üç biyolojik tekrarlı planlandığı için pipetaj hatası dikkate alınarak 10 kuyuya uygulama yapılacak gibi hesaplama yapıldı.

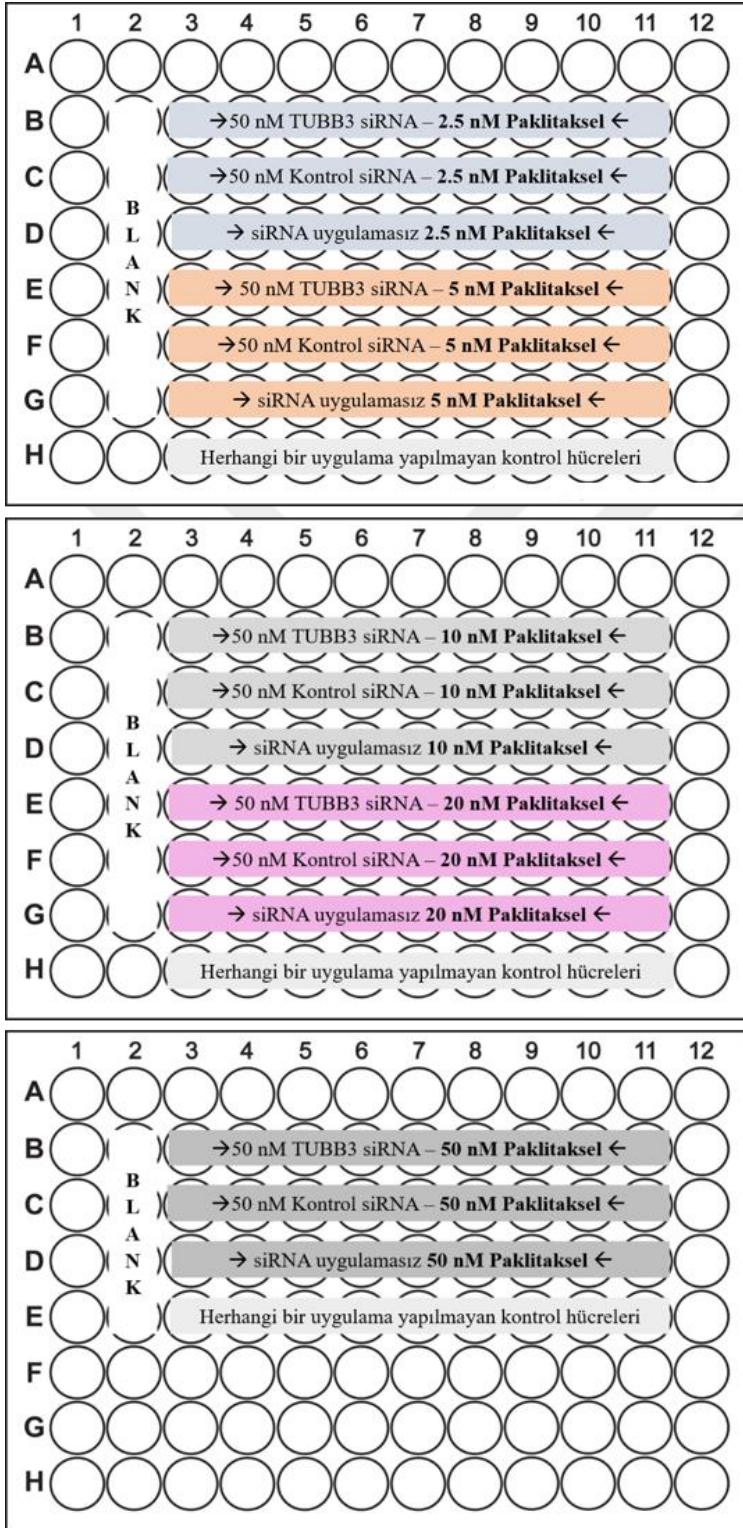
2. Kontrol siRNA ve TUBB3 siRNA için ikişer tane ependorf tüp hazırlandı.
3. Dharmafect I ve saf DMEM-F12 içeren, hacmi 100 µl olan ikinci tüp, kontrol siRNA ve TUBB3 siRNA için Çizelge 4.21.'de belirtilen miktara göre hazırlandı.

4. siRNA ve saf DMEM-F12 içeren, hacmi 100 µl olan birinci tüp kontrol siRNA ve TUBB3 siRNA için Çizelge 4.21.'de belirtilen miktara göre hazırlanarak oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası birinci tüp içeriği ikinci tüpe aktarıldı ve 200 µl hacimdeki karışım 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası tüpün üzerine 800 µl antibiyotiksiz, %10 FBS içeren DMEM-F12 eklendi.
7. Son hacmi 1 ml olan kontrol siRNA ve TUBB3 siRNA kuyulara verilmek üzere hazırlandı.
8. 24 saat önce kuyularına 5000 hücre ekilen 96 kuyulu plaka etüvden alındı.
9. Hücreler mikroskop altında kontrol edildi.
10. Kuyulardaki besiyeri aspire edildi.
11. siRNA içeren besiyeri belirlenen kuyulara 100 µl olacak şekilde dağıtıldı.
12. Blank olarak belirtilen kuyulara hücre ekimi yapılmamıştır, bu kuyular proliferasyon tayininde blank olarak kullanılacağından kuyulara 100 µl siRNA içermeyen besiyeri eklendi.
13. Hücre plakası %5 CO₂'li 37 °C'deki etüvde inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 4.22. Proliferasyon takibi için hazırlanan 96 kuyulu plaka

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	L	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	N	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	K	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri										
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Çizelge 4.23. siRNA transfeksiyonu sonrası paklitaksel muamelesi için hazırlanan 96 kuyulu plakalar



4.2.12.6. siRNA Transfeksiyonu Yapılan Hücrelere Paklitaksel Muamelesi

Hücreler, siRNA transfeksiyonu yapıldıktan sonra değişen dozlarda paklitaksel (PTX) muamelesine maruz bırakıldı. Çizelge 4.23.'de belirtilen üç adet plakada;

1. TUBB3 siRNA ile susturulan ve paklitaksel verilen hücreler,
2. kontrol siRNA ile susturulan ve paklitaksel verilen hücreler,
3. sadece paklitaksel verilen hücreler,
4. herhangi bir müdahalede bulunulmayan kontrol hücreleri

olmak üzere dört hücre grubu bulunmaktadır. Her hücre grubu üç biyolojik ve üç teknik tekrar olacak şekilde çalışıldı. Paklitaksel; 2.5 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM ve 50 nM olmak üzere beş farklı konsantrasyonda uygulandı. Çalışma aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Uygulanması planlanan paklitaksel dozlarını elde etmek için 100 nM konsantrasyondaki stoktan alınması gereken hacim aşağıdaki gibi belirlendi.

$$100 \text{ nM} \times A = 2,5 \text{ nM} \times 100 \mu\text{l} \rightarrow A = 2,5 \mu\text{l}$$

$$100 \text{ nM} \times A = 5 \text{ nM} \times 100 \mu\text{l} \rightarrow A = 5 \mu\text{l}$$

$$100 \text{ nM} \times A = 10 \text{ nM} \times 100 \mu\text{l} \rightarrow A = 10 \mu\text{l}$$

$$100 \text{ nM} \times A = 20 \text{ nM} \times 100 \mu\text{l} \rightarrow A = 20 \mu\text{l}$$

$$100 \text{ nM} \times A = 50 \text{ nM} \times 100 \mu\text{l} \rightarrow A = 50 \mu\text{l}$$

2. 96 kuyulu plakalarda transfeksiyonun 24. saatinde ortama eklenecek paklitaksel hacmi kadar besiyeri kuyulardan çekildi ve aynı hacimdeki paklitaksel kuyulara eklendi.
3. Blank olarak belirtilen kuyulara 100 μl siRNA içermeyen besiyeri eklendi.
4. İlaç uygulaması yapılan plakalar %5 CO₂'li 37 °C'deki etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon sonunda sitotoksisite tayini protokolü uygulandı.

4.2.12.7. Hücre Canlılık Tayini

Canlılık tayini için ROCHE marka "The Cell Proliferation Reagent WST-1" kullanılmıştır. İşlem sonrası plakalar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji ABD'da Prof. Dr. Hakan Gürdal kontrolünde plak okuyucuda okutularak analiz edilmiştir. Çizelge 4.22.'de 96 kuyulu plakada yapılan siRNA transfeksiyonunun proliferasyon üzerindeki etkisini

görmek için iki adet replika plakalardan birinde 24 saat diğesinde 48 saat sonunda canlılık tayini yapılmıştır. siRNA transfeksiyonu sonrası uygulanan paklitakselin etkisini incelemek amacıyla Çizelge 4.23.'de belirtilen üç adet 96 kuyulu plakadan oluşan deney setine paklitaksel muamelesinden 48 saat sonra canlılık tayini yapılmıştır. Her iki test için de ürünün kullanım kılavuzunda belirtilen aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

1. Çizelge 4.22. ve Çizelge 4.23.'de belirtilen çalışma plakaları uygun inkübasyon sonrası etüvden alındı.
2. Blank olarak belirlenen kuyulara ve hücre ekimi yapılan kuyulara 10 µl Cell Proliferation Reagent WST-1 eklendi.
3. Plakalar %5 CO₂'li 37 °C'deki etüvde dört saat inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon süresinin sonunda plakalar çalkalayıcıda bir dk çalkalandı.
5. Tüm plakalar 450 nm ve 600 nm olmak üzere iki dalgaboyunda okutuldu.

Okutulan tüm plakaların ham absorbans değerleri Ek 4'te bulunmaktadır.

4.2.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızın istatistiksel analizleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Erdem Karabulut tarafından SPSS yazılımının 23. versiyonu kullanılarak yapıldı. Hastaların TUBB3 ifadesi ile cinsiyet, sağ/sol kolon tutulumu, dMMR/pMMR, MMR genleri (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), adenomatöz polip/serrated adenom, metastaz gibi değişkenler arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı Pearson ki-kare testi ile analiz edildi. Ayrıca TUBB3 ifadesi ve sağkalım arasında ilişki olup olmadığı Kaplan Meier metoduna göre çizilen sağkalım eğrisi ile analiz edildi. Paklitaksel uygulaması sonrasında IC₅₀ dozlarının hesaplanması ve canlılık tayini sonunda elde edilen verilerin iki yönlü ANOVA ile analizi Prof. Dr. Hakan Gürdal tarafından Microsoft Office Excel 2003 ile yapıldı. Analizler sonucunda p<0,05 olan değişkenler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışma kapsamında yapılan deneylere ait sonuçlar analiz edilerek oluşturulan tablolar, grafikler ve araştırma sonuçları bu bölümde belirtilmektedir.

5.1. OLGULARIN ÖZELLİKLERİ

Çalışmaya dâhil edilen 202 KRK olgusunun yaş, cinsiyet, tümör boyutu, evre vb. klinikopatolojik özellikleri ile tümörlerin moleküler alt tipi, hastalık seyri ve sağkalımı gibi bilgileri derlenerek bir veritabanı oluşturulmuştur. Tamamı adenokarsinoma tanısı alan olguların %41,25'i erken evre (I-II) olgulardır. Örnekleme oluşturan olguların klinikopatolojik özellikleri Çizelge 5.1.'de görülmektedir.

Çizelge 5.1 Çalışma örneklemini oluşturan olguların klinikopatolojik özellikleri

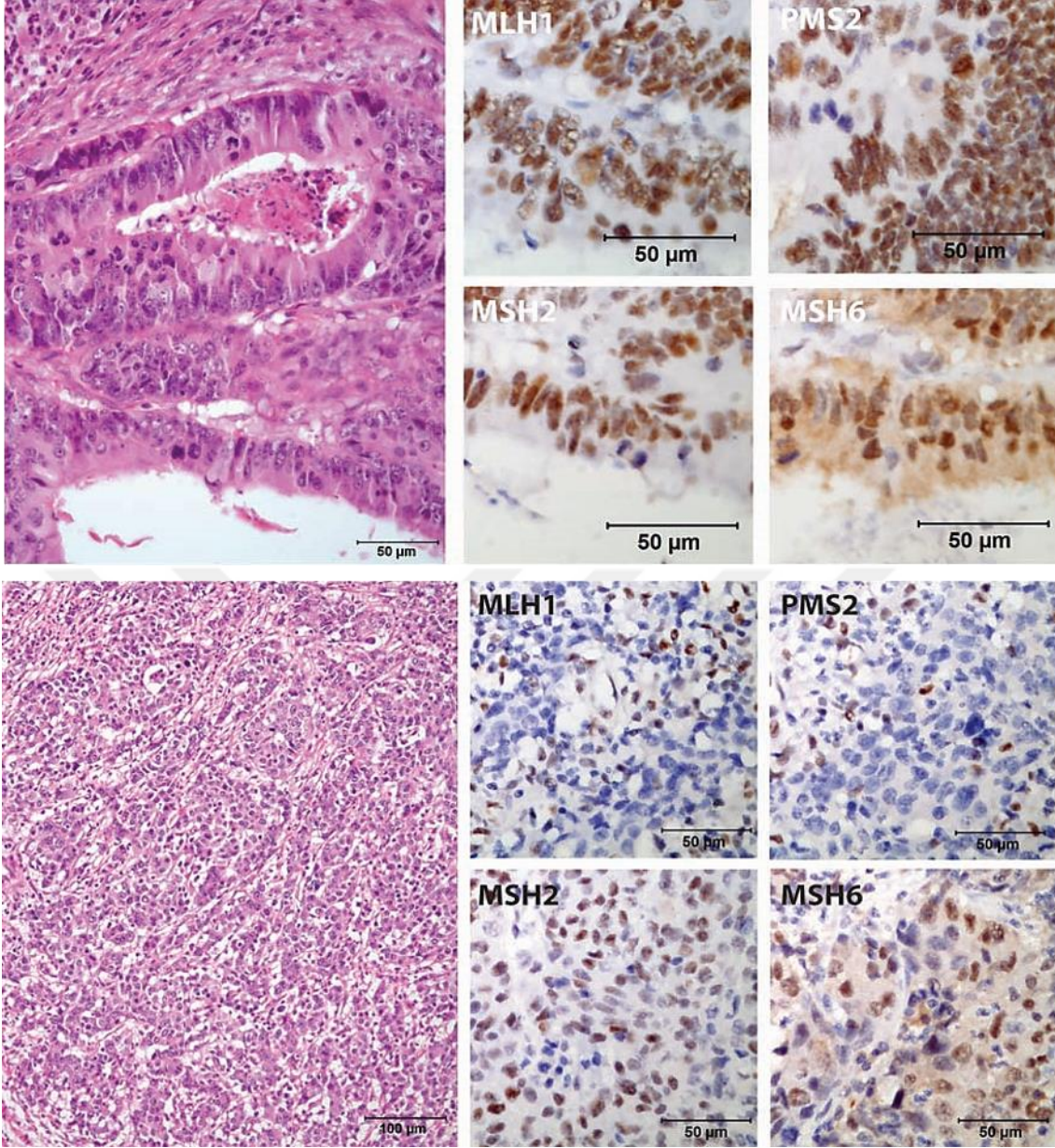
Karakteristik	n (%)
Yaş (yıl) [n=202], ortalama (dağılım)	62,2 (24-93)
Cinsiyet	
	Kadın 70 (34,65)
	Erkek 132 (65,34)
Tümör lokasyonu	
	Sağ kolon 75 (37,12)
	Sol kolon 127 (62,87)
Boyut* (cm), ortalama (dağılım)	5,52 (1,7-16)
*bilinen 187/202 olgu (%95,57)	
Evre**	
**bilinen 160/202 olgu (%79,20)	
	I 12 (7,50)
	II 54 (33,75)
	III 45 (28,13)
	IV 49 (30,62)
Durum ⁺	
⁺ bilinen 201/202 olgu (%99,50)	
	Sağ 147 (72,87)
	Ölen 54 (27,13)
Takip Süresi***(gün), ortalama (dağılım)	1201 (5-4978)
***bilinen 198/202 olgu (%98,01)	
Metastaz	
	Negatif 119 (58,91)
	Pozitif 56 (27,72)
	Bilinmeyen 22 (10,89)

5.2. KRK DOKU MİKRODİZİNLERİNDE MSI DÖRTLÜ PANEL BOYAMASI SONUÇLARI

Çalışmaya dâhil olan 202 KRK olgusunun MSI statülerini belirlemek amacıyla doku mikrodizinlerine (TMA-K1A, TMA-K2, TMA-K3, TMA-K4) MMR genlerini kapsayan dörtlü İHK paneli (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) uygulandı.

İHK sonuçlarında dökülme ve suboptimal fiksasyon veya takip teknik problem olarak değerlendirildi. 202 KRK olgusundan 9 tanesi dökülme kaynaklı teknik problem sebebiyle değerlendirmeye alınmadı. Kalan 193 olgusunun boyanma paterni üç kategoride değerlendirildi; boyanma düzeyi %5'den az olan olgular negatif (0), boyanma düzeyi %5-20 arasında olan olgular fokal pozitif (f), boyanma düzeyi %20'den fazla olan olgular ise pozitif (1) olarak skorlandı.

Neoplastik hücrelerde en az bir belirtecin nükleer boyanma kaybı gösterdiği olgular dMMR herhangi bir kayıp mevcut olmayan olgular pMMR olarak değerlendirildi. Bu kriterlere göre boyanma sonuçları incelenen 193 olgusunun %20,2'si (n=39) dMMR, %79,8'i (n=154) pMMR olarak sınıflandırıldı. Bunlardan dMMR olan 39 olgusunun; %56'sında (n=22) MLH1, %63'ünde (n=24) PMS2, %29'unda (n=11) MSH2 ve %42'sinde (n=16) MSH6 kaybı olduğu görüldü. Değerlendirilen olgulardan pMMR ve dMMR durumunu gösteren temsili birer olgu Şekil 5.1.'de görülmektedir.

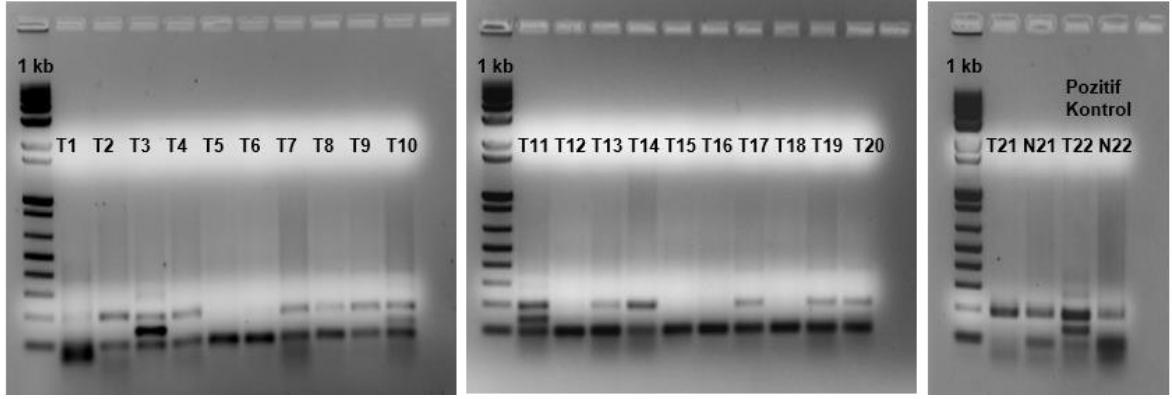


Şekil 5.1. MMR intakt ve MMR kayıp olan iki olgunun H&E boyaması ve dörtlü İHK paneli sonucu **A:** Dört geninde pozitif olduğu pMMR olgu, **B:** MLH1 ve PMS2 kaybı olan dMMR olgu.

5.3. MLH1 KAYBI OLAN OLGULARDA BRAF MUTASYON ANALİZİ SONUÇLARI

İHK analizi sonucunda dMMR olguların %56'sında (n=22) MLH1 kaybı tespit edildi. Bu olgulara ARMS PCR metodu ile BRAF mutasyon analizi yapıldı. Böylece sendromik form olma ihtimali olan olguların belirlenmesi amaçlandı. Olgulardan BRAF mutant olduğu

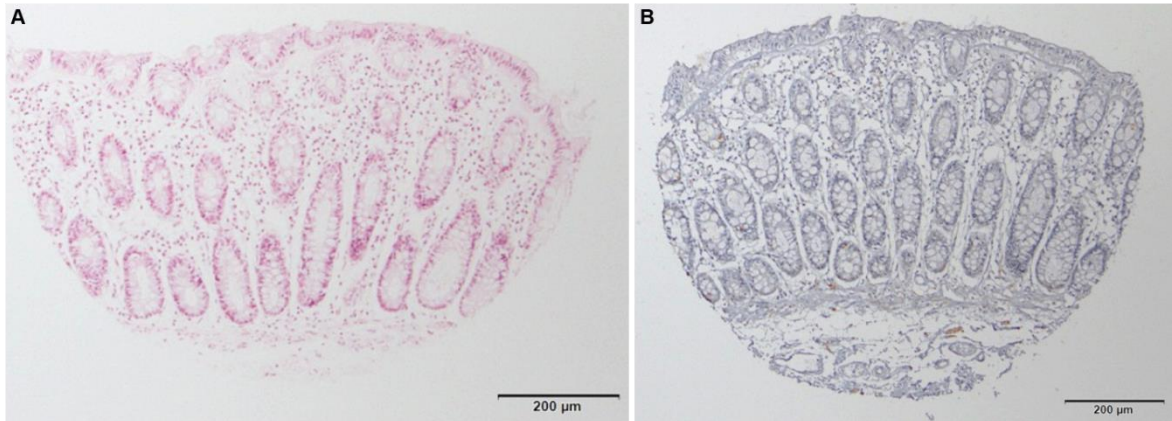
bilinen örnek pozitif kontrol olarak kullanıldı. Değerlendirilen 22 olgudan %18'inin (n=4) BRAF mutant, %82'sinin (n=18) BRAF yabanıl olduğu görüldü. (Şekil 5.2.)



Şekil 5.2. MLH1 kaybı olan 22 vakanın ARMS PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

5.4. NEOPLASTİK OLMAYAN KOLON MUKOZASINDA TUBB3 İHK ANALİZİ SONUÇLARI

TMA-K1'de yer alan neoplastik olmayan kolon mukozası örnekleri TUBB3 İHK boyaması açısından değerlendirildi. TUBB3, sitoplazmik filamentlerden biri olan mikrotübül yapısında yer aldığı için skorlamada sitoplazmik boyanma dikkate alındı. TUBB3 açısından pozitif olan periferik sinir dokusu boyamanın değerlendirilmesinde iç kontrol olarak kullanıldı. Olguların boyama paterni üç kategoride değerlendirildi; boyanma görülmeyenler negatif (0), boyanma düzeyi %1-20 arasında olanlar fokal pozitif (f), boyanma düzeyi %20 ve üzeri olan olgular ise pozitif (1) olarak skorlandı. Değerlendirmede neoplastik olmayan kolon mukozası örneklerinin %100'ünde (n=14) TUBB3 proteininin negatif olduğu görüldü.



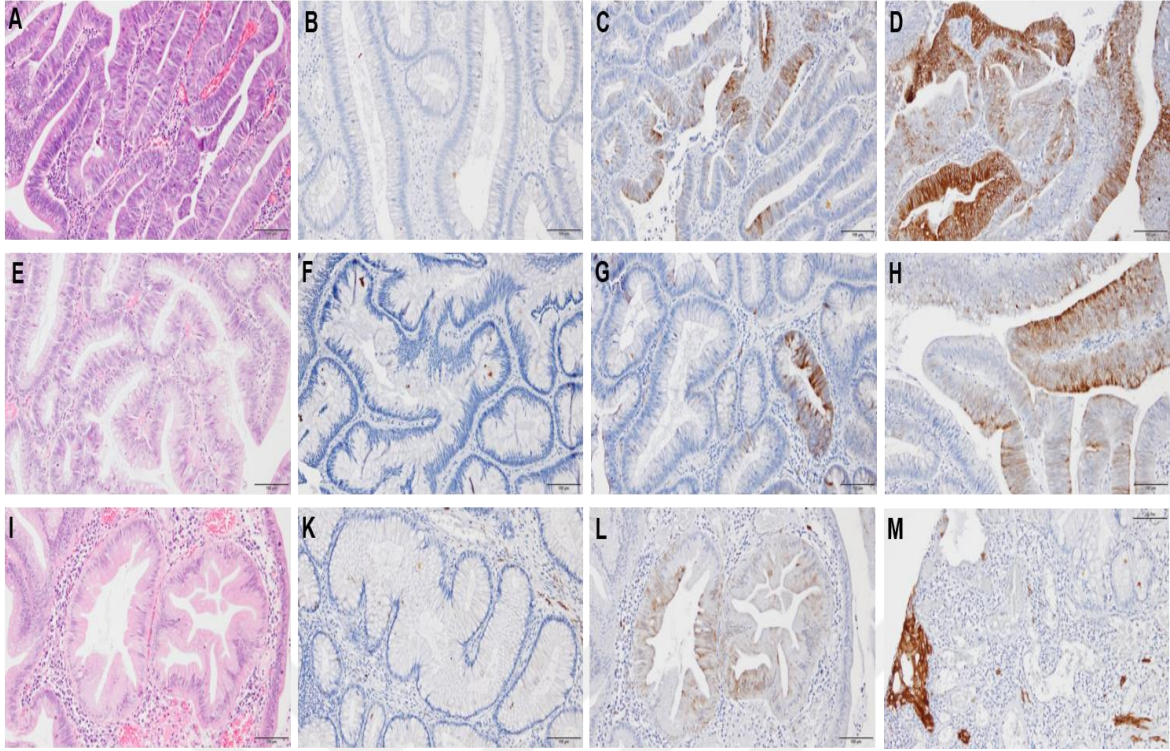
Şekil 5.3. Neoplastik olmayan kolon mukozasında temsili TUBB3 boyanma sonucu; **A:** H&E görüntüsü, **B:** TUBB3 İHK boyaması

5.5. KRK ÖNCÜL LEZYONLARINDA TUBB3 İHK ANALİZİ SONUÇLARI

TMA-K7 ve TMA-K8 doku mikrodizin bloklarında çalışmaya dâhil olan 78 KRK öncül lezyonu da TUBB3 İHK boyaması açısından değerlendirildi. Değerlendirme kriterleri yukarıda belirtildiği gibi dikkate alındı. Dokuz çeşit öncül lezyonun bulunduğu örnekleme olguların %24,4'ü (n=19) TUBB3 negatif, %62,8'i (n=49) TUBB3 fokal pozitif ve %12,8'i (n=10) TUBB3 pozitif olarak değerlendirildi. Adenom çeşitlerine odaklanıldığında TUBB3 protein pozitifliğinin her adenom tipi için farklı olduğu görülmektedir. İncelenen öncül lezyon örnekleminin %47,4'ünü (n=37) oluşturan TA'da TUBB3 boyanması; %16 negatif, %73 fokal pozitif ve %11 pozitif iken örneklemin %10'unu (n=8) oluşturan TVA'da TUBB3 boyanması; %12,5 negatif, %62,5 fokal pozitif, %25 pozitifdir. Örneklemin %27'sini oluşturan SA'da (n=21) TUBB3 boyanması; %28,6 negatif, %57 fokal pozitif ve %14,3 pozitif iken örneklemin %7,7'sini oluşturan HP'de (n=6) %67 negatif, %16,5 fokal pozitif ve %16,5 pozitif sonuç verdi. İFP TUBB3 negatif iken İP ise fokal pozitifdir. Öncül lezyonların TUBB3 İHK boyama sonuçlarına ait sınıflanmış veriler Çizelge 5.2.'de, temsili TUBB3 İHK boyama paternleri de Şekil 5.4.'de görülmektedir. Öncül lezyonlarda TUBB3 ifadesi ve adenomatöz polip/serrated adenom arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olup olmadığı Pearson ki-kare testi ile analiz edildi. TUBB3 pozitifliği istatistiksel olarak adenomatöz poliplerde anlamlı ($p<0,05$) iken diğerlerinde anlamsız ($p>0,05$) bulundu.

Çizelge 5.2. Öncül lezyonlarda TUBB3 İHK boyanma sıklığının sınıflandırılmış dağılımı

Adenom çeşitleri	TUBB3 (-)	TUBB3 (fokal +)	TUBB3 (+)	Toplam Olgu
Adenomatöz polip (TA, TVA)	%15,5 (n=7)	%71 (n=32)	%13,5 (n=6)	45
Serrated polip (TSA, SSA, SA, HP)	%37 (n=10)	%48 (n=13)	%15 (n=4)	27
Hamartomatöz polip	%25 (n=1)	%75 (n=3)	-	4
Diğer (İFP, İP)	%50 (n=1)	%50 (n=1)	-	2

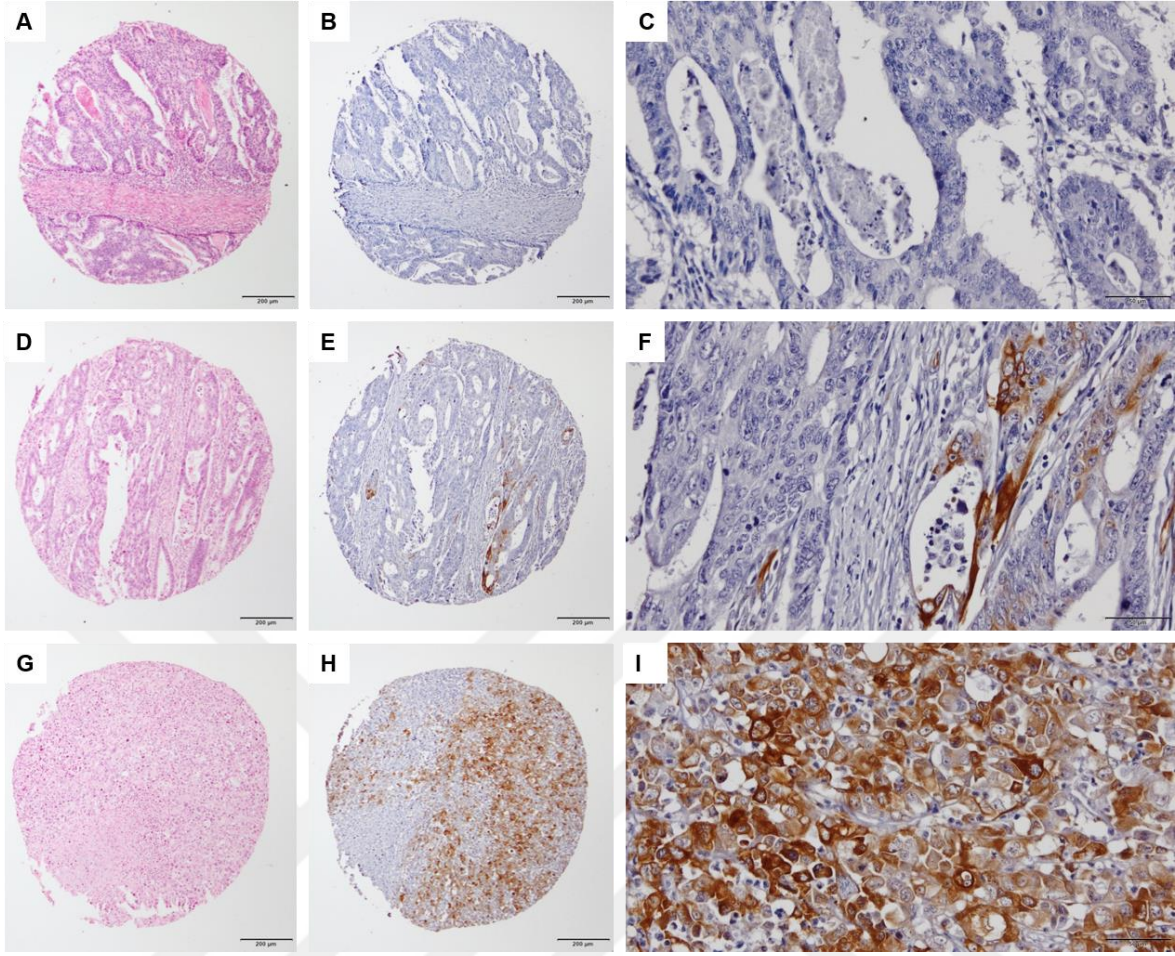


Şekil 5.4. KRK öncül lezyonlarında TUBB3 İHK boyaması sonuçları. Adenomatöz polipte; **A:** H&E boyaması, **B:** TUBB3 negatif boyanma (4X), **C:** TUBB3 fokal pozitif boyanma (20X) **D:** TUBB3 pozitif boyanma, Serrated polipte; **E:** H&E boyaması (4X), **F:** TUBB3 negatif boyanma (20X), **G:** TUBB3 fokal pozitif boyanma, **H:** TUBB3 pozitif boyanma (4X), Hiperplastik polipte; **I:** H&E boyaması, **K:** TUBB3 negatif boyanma (20X), **L:**TUBB3 fokal pozitif boyanma, **M:** TUBB3 pozitif boyanma

5.6. KRK OLGULARINDA TUBB3 İHK ANALİZİ SONUÇLARI

KRK olgularını içeren doku mikrodizin bloklarında (TMA-K1, TMA-K2, TMA-K3, TMA-K4) TUBB3 proteininin varlığı İHK boyama yöntemi ile araştırıldı. 202 KRK olgusundan 12 tanesi dökülme kaynaklı teknik problem sebebiyle değerlendirmeye alınmadı. Kalan 190 KRK olgusunun boyama paterni yukarıda belirtildiği gibi skorlandı.

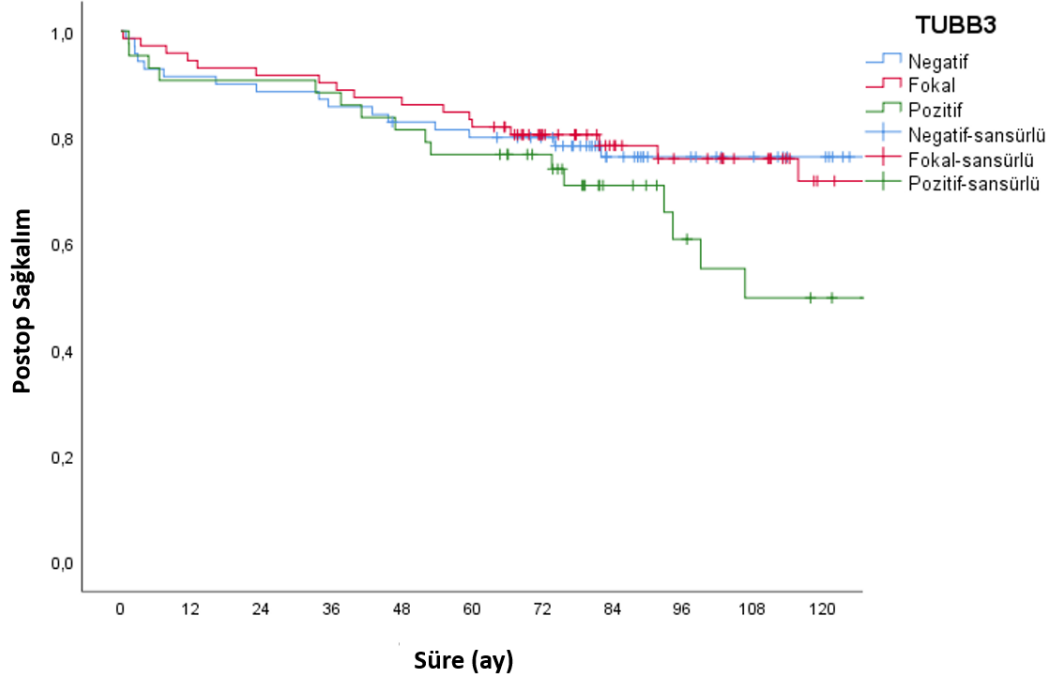
190 KRK olgusunun TUBB3 İHK boyamasının değerlendirilmesi sonucunda olguların %40,5'inin (n=77) negatif, %35,8'inin (n=68) fokal pozitif ve %23,7'sinin (n=45) pozitif olduğu görüldü.



Şekil 5.5. KRK olgularında TUBB3 İHK boyaması sonuçları; **A:** TUBB3 negatif olgunun H&E boyaması, **B:** TUBB3 negatif boyanma (4X), **C:** TUBB3 negatif boyanma (20X) **D:** TUBB3 fokal pozitif olgunun H&E boyaması, **E:** TUBB3 fokal pozitif boyanma (4X), **F:** TUBB3 fokal pozitif boyanma (20X), **G:** TUBB3 pozitif olgunun H&E boyaması, **H:** TUBB3 pozitif boyanma (4X), **I:** TUBB3 pozitif boyanma (20X)

KRK olgularında TUBB3 ifadesi ile yaş, cinsiyet, sağ/sol kolon tutulumu, dMMR/pMMR statüsü, MMR genleri (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) ve metastaz gibi klinikopatolojik değişkenler arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı Pearson ki-kare testi ile analiz edildi. Bu analizlere göre TUBB3 ifadesi ile yaş, cinsiyet, sağ/sol kolon tutulumu ve metastaz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edildi ($p>0,05$). Olgularımızda TUBB3 ifadesinin pMMR statüsü ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) dMMR statüsü ile anlamsız ($p>0,05$) olduğu görüldü. TUBB3 ifadesinin MMR genleri ile tek tek ilişkisi irdelendiğinde ise TUBB3 pozitifliğinin istatistiksel olarak MLH1, PMS2 ve MSH6 pozitifliği ile anlamlı ($p<0,05$), MSH2 pozitifliği ile anlamsız ($p>0,05$) olduğu bulundu. TUBB3 ifadesi ve sağkalım arasında ilişki olup olmadığı ise Kaplan Meier metoduna göre çizilen sağkalım eğrisi ile analiz edildi. (Şekil 5.6.) Bu analiz sonucunda incelenen KRK

olgularında (n=185) TUBB3 ifadesinin sağkalım ile ilişkili olmadığı ($p>0,05$) ancak TUBB3 ifadesi gösteren olguların daha kötü prognoz eğiliminde olduğu görüldü.



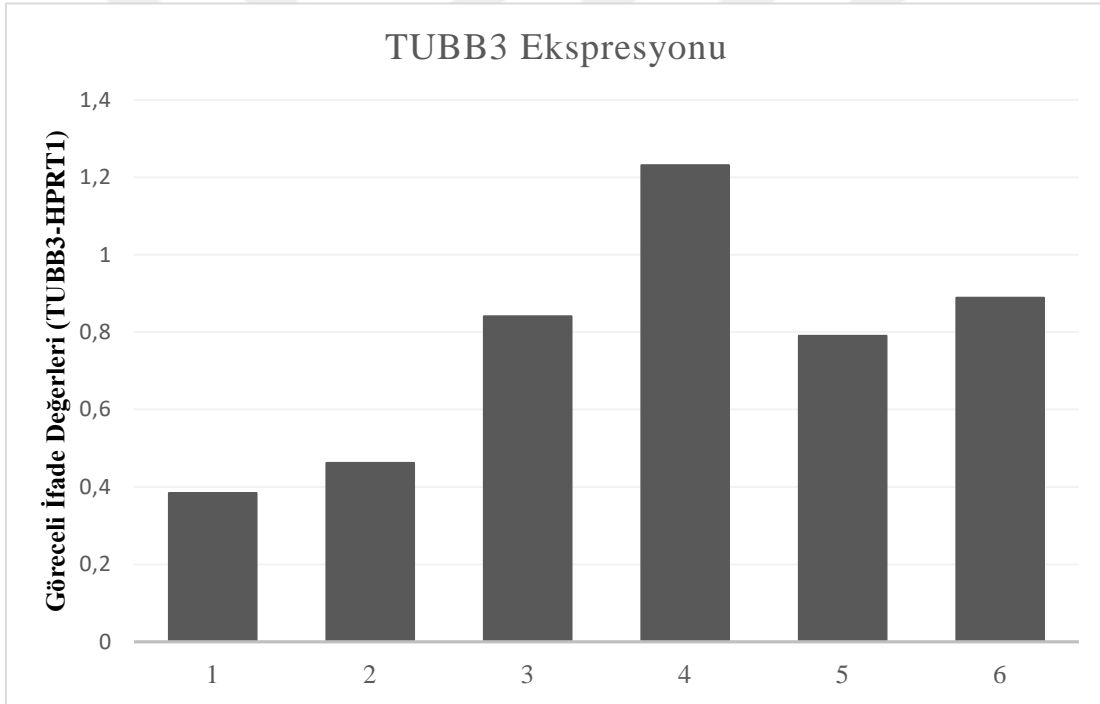
Şekil 5.6. KRC olgularında TUBB3 ifadesine göre postop sağkalım eğrisi

5.7. KRC DOKU MİKRODİZİNLERİNE AİT TUBB3 İHK ANALİZİ VALİDASYON SONUÇLARI

Bir mm'lik KRC doku mikrodizinlerine ait boyama sonuçlarında pozitif ve negatif olarak değerlendirilen olguların valide edilmesi amacıyla rastgele belirlenen 15'er adet pozitif ve negatif doku ile beş mm'lik validasyon doku mikrodizinleri (TMA-K5, TMA-K6) yapıldı. Validasyon doku mikrodizinleri ile yapılan TUBB3 İHK sonuçlarına göre pozitif olan on beş olgudan sadece bir olgunun fokal pozitif diğerlerinin ise pozitif olduğu, negatif olan on beş olgudan beş olgunun ise fokal pozitif, kalan on olgunun negatif olduğu tespit edildi. Validasyon sonucu güncellenen veriler ile 190 KRC olgusunun %38'inin (n=72) TUBB3 negatif, %39'unun (n=74) TUBB3 fokal pozitif ve %23'ünün (n=44) TUBB3 pozitif olduğu belirlendi.

5.8. KRK TAZE DOKULARINDA TUBB3 QRT-PCR ANALİZİ SONUÇLARI

Altı KRK taze dokusunda TUBB3 ekspresyon düzeyini belirlemek için iki teknik tekrarlı qRT-PCR kuruldu. TUBB3 geninin normalizasyonu HPRT1 geni ile yapıldı. Çizelge 5.3.'de görülebilen ham verilerin analizi $2^{-\Delta C_t}$ metodu kullanılarak relatif kantitasyon ile yapıldı ve TUBB3 ifade değerleri grafiğe dönüştürüldü (Şekil 5.7.). İncelenen altı olgu İHK'da TUBB3 ifadesi açısından; 1,2 (negatif), 3, 4, 5 (fokal pozitif), 6 (pozitif) olarak skorlandı. qRT-PCR analizinde TUBB3 ifade düzeyleri HPRT-1 genine göre negatif olgularda 0,3 kat (1) ve 0,5 kat (2) şeklinde iken fokal pozitif olgularda; 0,8 kat (3), 1,2 kat (4) ve 0,7 kat (5), pozitif olguda ise 0,9 kat (6) olarak saptandı. qRT-PCR bulguları İHK analizi ile benzer bir patern göstermektedir. Fokal pozitif ve pozitif olarak skorlanan olguların hücrede yaklaşık olarak HPRT-1 kadar ifade edildiği görülmektedir.

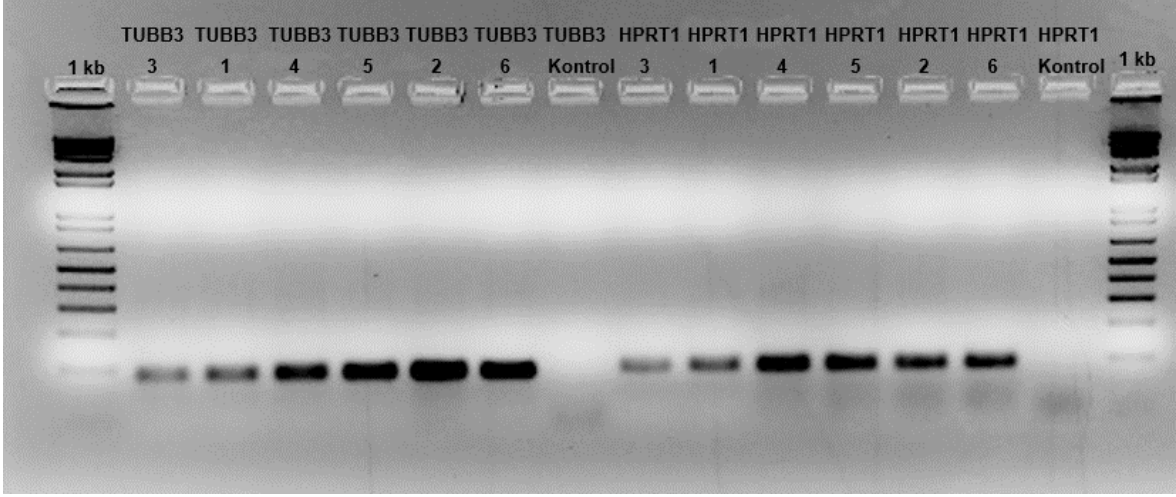


Şekil 5.7. KRK taze dokularında qRT-PCR analizi sonucuna göre TUBB3 ifade düzeyi

Çizelge 5.3. 6 KRK taze dokusunun qRT-PCR ürününe ait ortalama Cp değerleri ve $2^{-\Delta Ct}$ yöntemi ile analiz sonuçları

Örnek Adı – Primer	Ortalama Ct	ΔCt (Ct örnek-Ct referans)	$2^{-\Delta Ct}$
1-TUBB3	25,165	1,38	0,3842
2-TUBB3	23,495	1,11	0,4616
3-TUBB3	24,45	0,25	0,8408
4-TUBB3	22,045	-0,3	1,2311
5-TUBB3	23,605	0,34	0,7900
6-TUBB3	22,37	0,17	0,8888
1-HPRT1	23,785	-	-
2-HPRT1	22,38	-	-
3-HPRT1	24,2	-	-
4-HPRT1	22,345	-	-
5-HPRT1	23,265	-	-
6-HPRT1	22,2	-	-

Reaksiyondan alınan Crossing Point (Cp, Ct) değerlerinin ilgili gene ait olduğunu göstermek için reaksiyonun sonuna erime sıcaklığı (Tm) programı da eklendi ve tüm sonuçlarımızı temsilen bir reaksiyon için cihazdan elde edilen erime eğrisi ve amplifikasyon eğrisi Ek 3'te sunuldu. qRT-PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Beklenen PCR ürünü boyu TUBB3 için 85 bp iken HPRT1 için 106 bp uzunluğundadır. Şekil 5.8.'deki jel görüntüsü ürünlerin beklenen boyda olduğunu ve negatif kontrollerin temiz olduğunu göstermektedir.



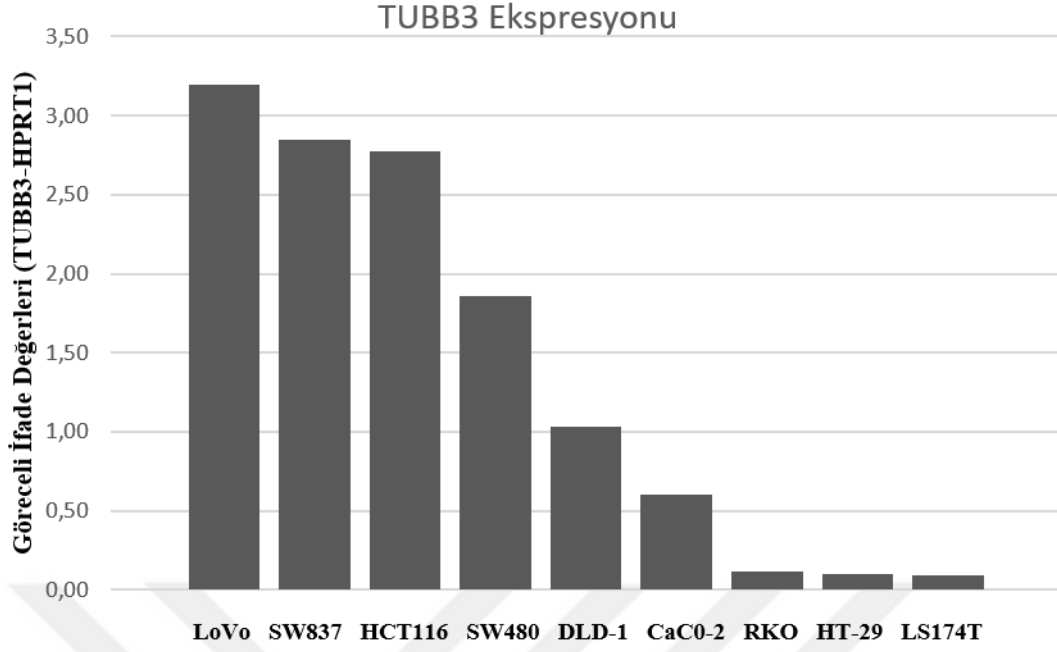
Şekil 5.8. 6 KRK taze dokusuna ait qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

5.9. KRK HÜCRE HATLARINDA TUBB3 QRT-PCR ANALİZİ SONUÇLARI

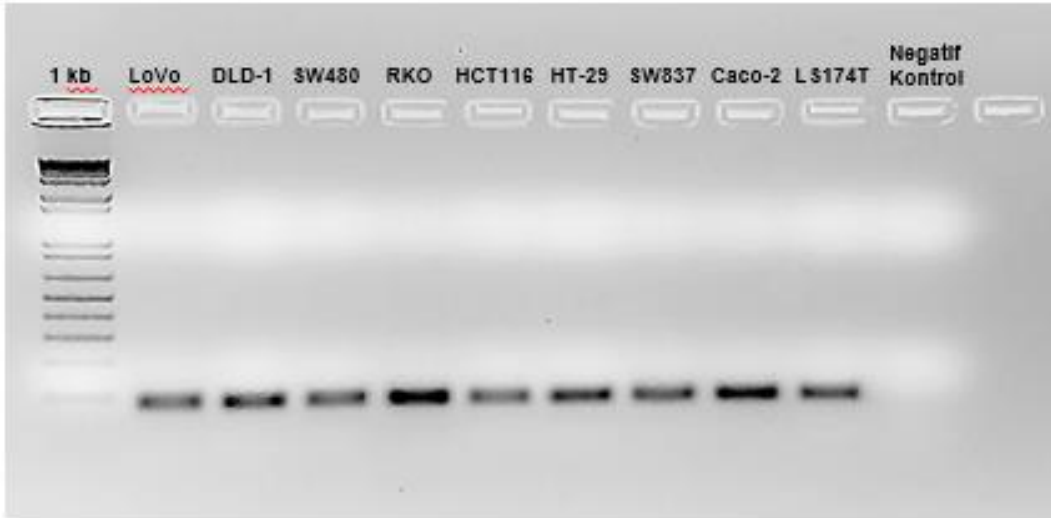
Hücre kültürü çalışmalarının yürütüleceği KRK hücre hattını TUBB3 seviyesi yüksek olan hücre hatları arasından seçilmesi planlandı. Bu nedenle laboratuvar arşivimizdeki dokuz adet KRK hücre hattında TUBB3 ekspresyon düzeyleri qRT-PCR analizi ile incelendi. Çalışma iki teknik tekrarlı olarak kuruldu ve TUBB3 geninin normalizasyonu HPRT1 geni ile yapıldı. Bu örneklerin analizi de Çizelge 5.4.'de görülebilen $2^{-\Delta Ct}$ metodu kullanılarak relatif kantitasyon ile yapıldı ve TUBB3 ifade değerleri grafiğe dönüştürüldü (Şekil 5.9.). Hücre hatları arasında HPRT-1'e göre TUBB3 ifadesi en yüksek olan hatlar; LoVo (3,2 kat), SW837 (2,9 kat) ve HCT116 (2,8 kat), SW480 (1,86 kat) iken ifadesi en düşük hatlar Caco-2 (0,6 kat), RKO ve HT-29 (0,1 kat) olarak belirlendi. DLD-1 hücre hattı HPRT-1 ile aynı oranda (1,0) TUBB3 ifadesi gösterirken, LS174T hücre hattında ise TUBB3 ifadesinin zayıf olduğu görülmüştür. Erime sıcaklığı eğrisi bu reaksiyonda da kontrol edildi ve ürünlerin aynı noktada T_m verdiği görüldü. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde kontrol edildi. Beklendiği gibi TUBB3 ürünlerinin 85 bç HPRT1 ürünlerinin 106 bç hizasında bulunduğu ve negatif kontrollerde herhangi bir kontaminasyon olmadığı görüldü (Şekil 5.10. ve Şekil 5.11.). Ekspresyon düzeyleri dikkate alınarak hücre kültürü aşamasında HCT116 hücre hattı ile çalışılmasına karar verildi.

Çizelge 5.4. 9 KRK hücre hattında TUBB3 qRT-PCR ürününe ait ortalama Ct değerleri ve $2^{-\Delta Ct}$ yöntemi ile analiz sonuçları

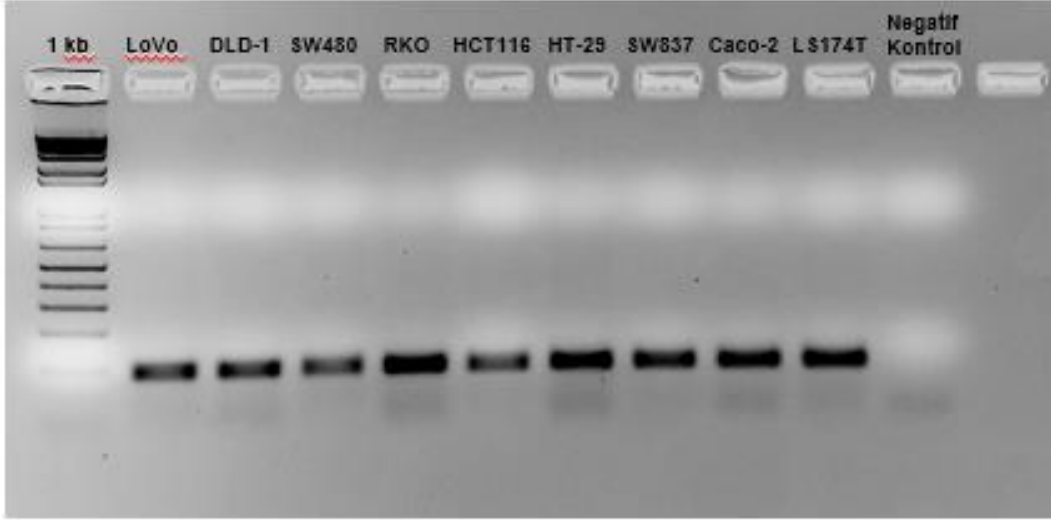
Örnek Adı – Primer	Ortalama Ct	ΔCt (Ct örnek-Ct referans)	$2^{-\Delta Ct}$
Caco-2 - TUBB3	24,96	0,74	0,60
DLD-1 - TUBB3	23,19	-0,05	1,03
HCT116 - TUBB3	23,15	-1,47	2,77
HT-29 - TUBB3	25,60	3,35	0,10
LoVo - TUBB3	22,48	-1,68	3,19
LS 174T - TUBB3	26,60	3,42	0,09
SW480 - TUBB3	22,22	-0,90	1,86
SW837 - TUBB3	22,60	-1,51	2,85
RKO - TUBB3	25,28	3,15	0,11
Caco-2 - HPRT1	24,23	-	
DLD-1 - HPRT1	23,23	-	
HCT116 - HPRT1	24,62	-	
HT-29 - HPRT1	22,25	-	
LoVo - HPRT1	24,16	-	
LS 174T - HPRT1	23,18	-	
SW480 - HPRT1	23,12	-	
SW837 - HPRT1	24,11	-	
RKO - HPRT1	22,13	-	



Şekil 5.9. 9 KRK hücre hattında TUBB3 ifade düzeyini gösteren qRT-PCR analizi sonucu



Şekil 5.10. Dokuz KRK hücre hattına ait TUBB3 qRT-PCR ürünü agaroz jel görüntüsü



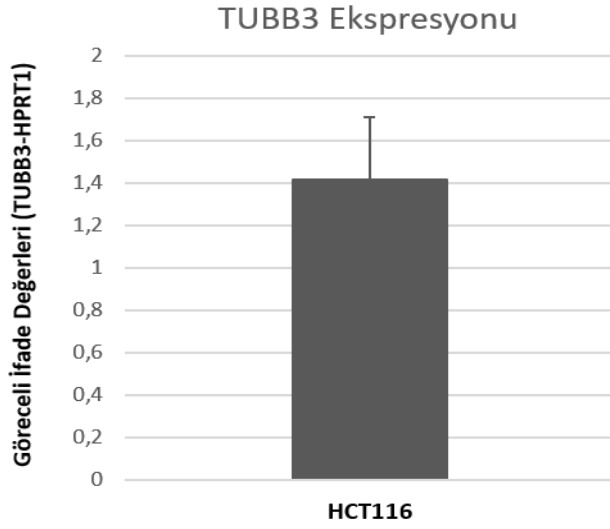
Şekil 5.11. Dokuz KRC hücre hattına ait HPRT1 qRT-PCR ürünü agaroz jel görüntüsü

5.10. SİRNA TRANSFEKSİYONU ÖNCESİ HCT116 HÜCRE HATTINDA TUBB3 QRT-PCR ANALİZİ SONUCU

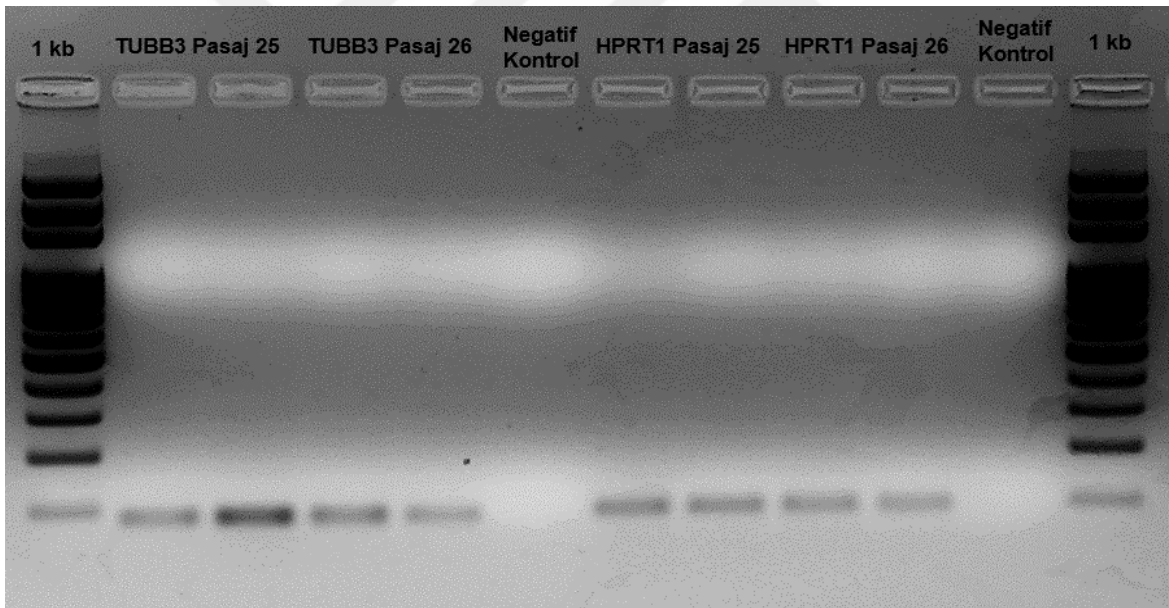
HCT116 hücre hattında siRNA transfeksiyonu öncesi TUBB3 ekspresyon düzeyini belirlemek için iki biyolojik ve iki teknik tekrarlı qRT-PCR kuruldu. TUBB3 geninin normalizasyonu HPRT1 geni ile yapıldı. Çizelge 5.5.'de görülen ham verilerin analizi $2^{-\Delta Ct}$ metodu kullanılarak relatif kantitasyon ile yapıldı ve TUBB3 ifade değerleri grafiğe dönüştürüldü. HCT116 hücre hattında HPRT1'e göre TUBB3 ifadesinin 1,4 kat olduğu görüldü (Şekil 5.12.). PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde kontrol edildi. Beklendiği gibi TUBB3 ürünlerinin 85 bp HPRT1 ürünlerinin 106 bp hizasında bulunduğu ve negatif kontrollerde herhangi bir kontaminasyon olmadığı görüldü (Şekil 5.13.).

Çizelge 5.5. HCT116 hücre hattında siRNA transfeksiyonu öncesi TUBB3 qRT-PCR ürününe ait ortalama Ct değerleri ve $2^{-\Delta Ct}$ yöntemi ile analiz sonucu

Örnek Adı - Primer	Ortalama Ct	ΔCt (Ct örnek-Ct referans)	$2^{-\Delta Ct}$	Ortalama $2^{-\Delta Ct}$
Pasaj 25 - TUBB3	22,06	-0,7	1,624	1,41
Pasaj 26 - TUBB3	24,41	-0,275	1,209	
Pasaj 25 - HPRT1	22,76	-1,47		
Pasaj 26 - HPRT1	24,69	3,35		



Şekil 5.12. siRNA transfeksiyonu öncesi HCT116 hücre hattında TUBB3 ifade düzeyini gösteren qRT-PCR analizi sonucu

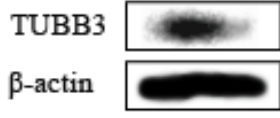


Şekil 5.13. siRNA transfeksiyonu öncesi HCT116 hücre hattına ait qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

5.11. SİRNA TRANSFEKSİYONU ÖNCESİ HCT116 HÜCRE HATTINDA TUBB3 WESTERN BLOT ve İHK ANALİZİ SONUCU

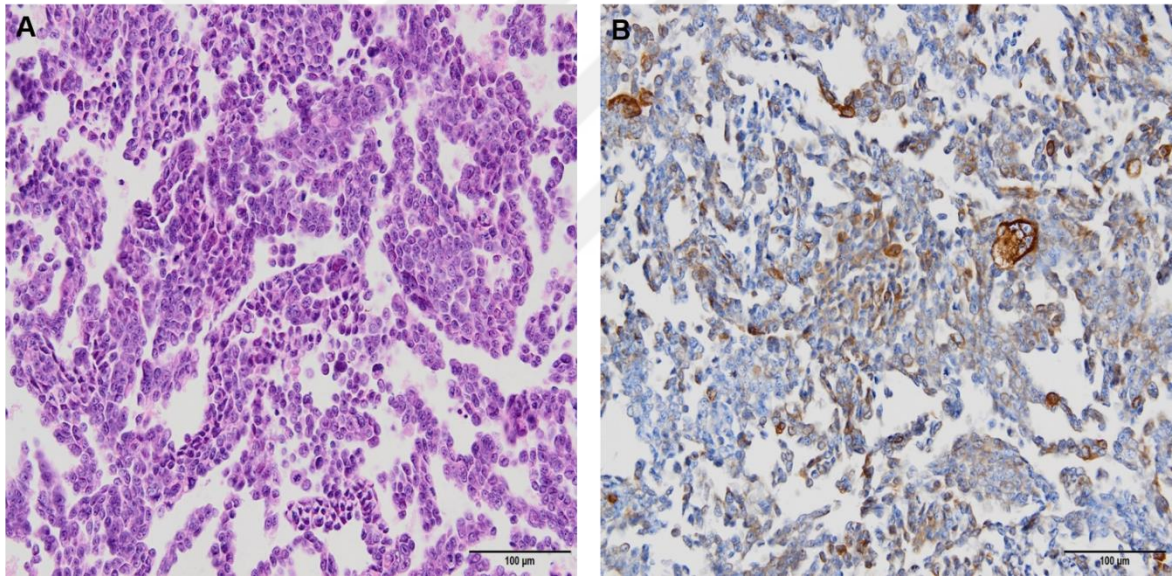
HCT116 hücre hattında siRNA transfeksiyonu öncesi TUBB3 protein düzeyi hem western blot hem de hücre bloğunda yapılan İHK boyaması ile gösterildi. Western blotta TUBB3 ve

β -actin antikoru kullanıldı. Beklendiği gibi TUBB3 antikoru 50 kDa'da, β -actin antikoru da 42 kDa'da bant verdiği görüldü (Şekil 5.14.).



Şekil 5.14. HCT116 hücre hattında siRNA transfeksiyonu öncesi TUBB3 ve β -actin'in western blot analizi sonucu

Kazıyıcı ile kaldırılan hücreler parafin bloğa gömüldükten sonra TUBB3 protein varlığı İHK ile incelendi. Boyamanın skorlanmasında daha önce yukarıda belirtilen değerlendirme kriterleri aynı şekilde dikkate alındı. Şekil 5.15.'te görüldüğü gibi HCT116 hücre hattında TUBB3 İHK boyaması pozitifdir.



Şekil 5.15. HCT116 hücre hattından yapılan hücre bloğunun boyama sonuçları; **A:** H&E görüntüsü, **B:** TUBB3 pozitif boyanma

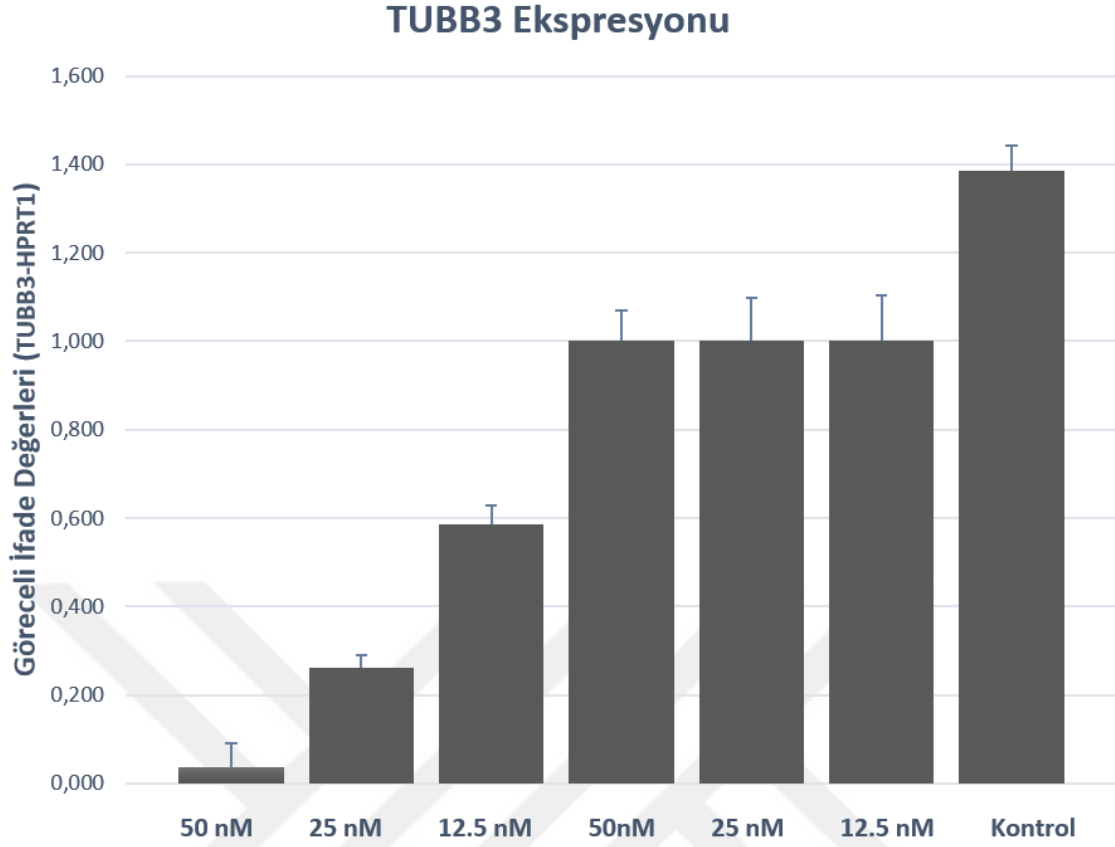
5.12. SİRNA TRANSFEKSİYONU SONRASI HCT116 HÜCRE HATTINDA TUBB3 QRT-PCR ve WESTERN BLOT ANALİZİ SONUÇLARI

HCT116 hücre hattında siRNA transfeksiyonu yapıldıktan sonra hangi dozun TUBB3 ifadesini en yüksek oranda susturduğu qRT-PCR analizi ile belirlendi. Üç farklı siRNA konsantrasyonu uygulanan örneklerde TUBB3 ekspresyon düzeyini belirlemek için iki teknik tekrarlı qRT-PCR kuruldu. TUBB3 geninin normalizasyonu HPRT1 geni ile yapıldı.

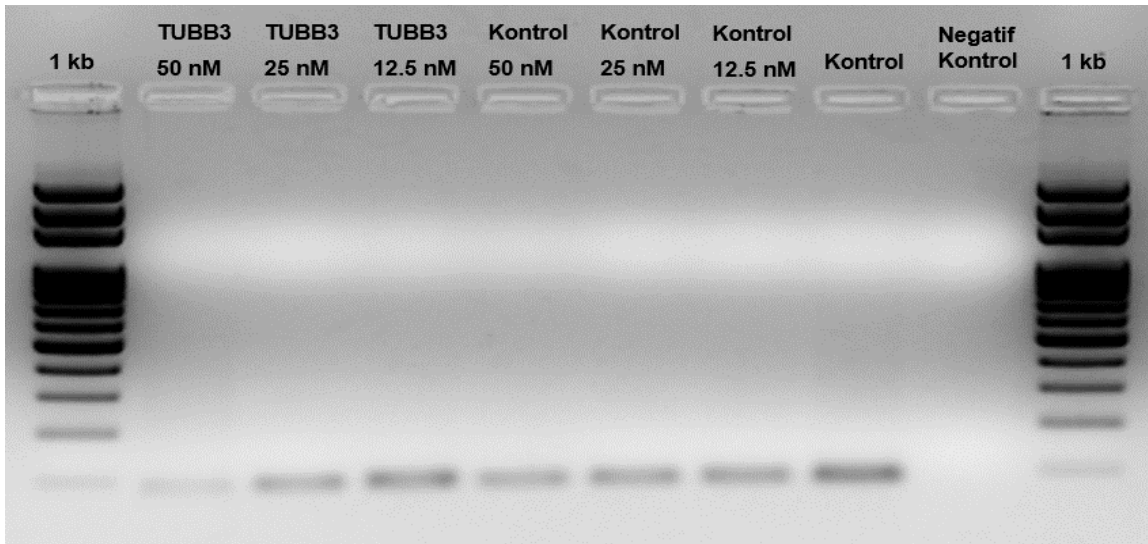
Çizelge 5.6.'da görülen ham verilerin analizi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak relatif kantitasyon ile yapıldı ve TUBB3 ifade değerleri grafiğe dönüştürüldü (Şekil 5.16.). TUBB3 ifadesi siRNA ile susturulan hücreler kontrol siRNA verilen hücreler ile normalize edilmiştir. Her konsantrasyonun kendi kontrol siRNA'sı ile normalize edildiği analizde 12,5 nM, 25 nM ve 50 nM siRNA uygulamasının TUBB3 ifadesini sırasıyla %41,40, %73,74 ve %96,25 oranında susturduğu tespit edildi. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Beklendiği gibi TUBB3 ürünlerinin 85 bç HPRT1 ürünlerinin 106 bç hizasında bulunduğu ve negatif kontrollerde herhangi bir kontaminasyon olmadığı görüldü. TUBB3 siRNA dozu düştükçe bant kalınlığının arttığı Şekil 5.17.'de görülmektedir.

Çizelge 5.6. siRNA transfeksiyonu sonrası TUBB3 qRT-PCR ürününe ait ortalama Ct değerleri ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile analiz sonuçları

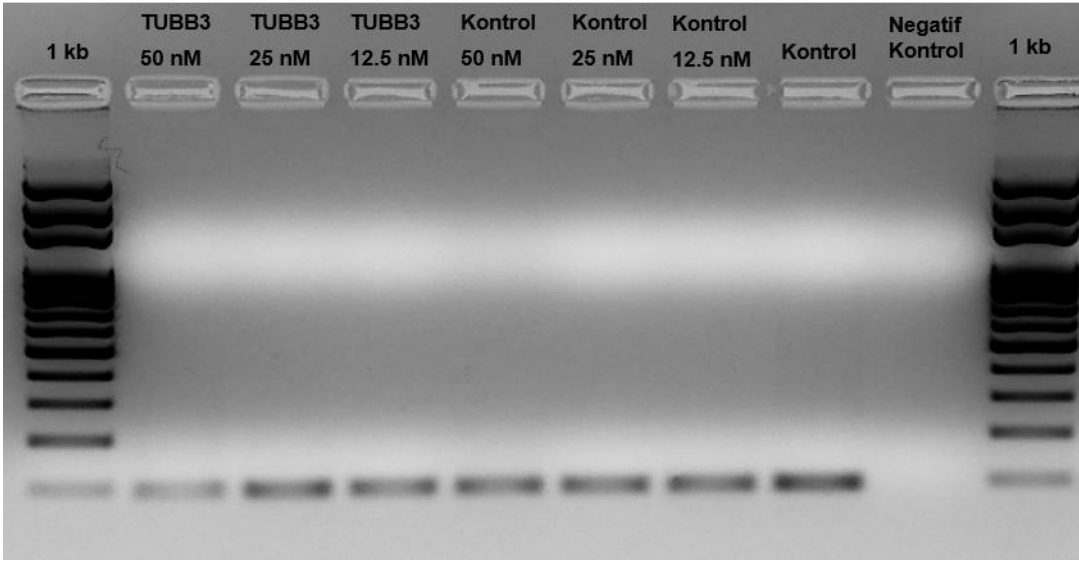
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Örnek	Doz	Ct HPRT1	Ct TUBB3	ΔCt	ΔCt	Ortalama ΔCt	ΔCt Std. Sapma	$\Delta\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$ Std. Sapma	% Susma Değeri
2					$(Ct_{TUBB3} - Ct_{HPRT1})$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$			Kontrol siRNA ile normalizasyon		$(1 - \Delta\Delta Ct) * 100$
3	TUBB3 siRNA	50 nM	27,47	31,11	3,64	0,080	0,040	0,056	0,037	0,052	96,255
4			25,02	35,48	10,46	0,001			G3/G9	H3/G9	
5		25 nM	22,16	23,38	1,22	0,429	0,399	0,043	0,263	0,028	73,744
6			22,1	23,54	1,44	0,369			G5/G11	H5/G11	
7		12,5 nM	23,37	24,17	0,8	0,574	0,546	0,040	0,586	0,043	41,434
8			23,31	24,26	0,95	0,518			G7/G13	H7/G13	
9	Kontrol siRNA	50 nM	23,97	23,93	-0,04	1,028	1,080	0,074	1,000	0,069	
10			24,18	24	-0,18	1,133			G9/G9	H9/G9	
11		25 nM	22,48	21,98	-0,5	1,414	1,519	0,149	1,000	0,098	
12			22,83	22,13	-0,7	1,625			G11/G11	H11/G11	
13		12,5 nM	21,27	21,48	0,21	0,865	0,932	0,096	1,000	0,103	
14		21,53	21,53	0	1,000			G13/G13	H13/G13		
15	Kontrol		21,86	21,45	-0,41	1,329	1,293	0,051	1,387	0,054	
16			21,96	21,63	-0,33	1,257			G15/G13	H15/G13	



Şekil 5.16. siRNA transfeksiyonu sonrası HCT116 hücre hattında TUBB3 ifade düzeyini gösteren qRT-PCR analizi sonucu

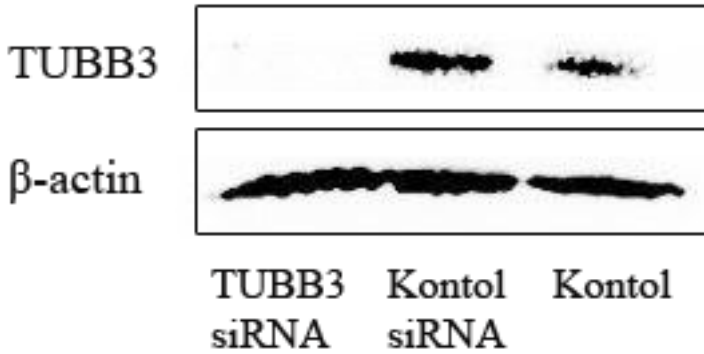


Şekil 5.17. siRNA transfeksiyonu sonrası HCT116 hücre hattına ait TUBB3 qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



Şekil 5.18. siRNA transfeksiyonu sonrası HCT116 hücre hattına ait HPRT1 qRT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

HCT116 hücre hattında çalışma konsantrasyonu olarak karar verilen 50 nM siRNA yapılan transfeksiyon sonrası TUBB3 protein düzeyi western blot ile analiz edildi. Western blotta TUBB3 ve β -actin antikorları kullanıldı. Birinci kuyuya yüklenen TUBB3 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerden izole edilmiş protein örneği; β -actin antikoruna bant verirken TUBB3 antikoruna bant vermediği, kontrol siRNA transfeksiyonu yapılan hücreler ve kontrol hücrelerinde ise her iki antikor ile de bant elde edildiği görüldü. Beklendiği gibi TUBB3 antikoruna 50 kDa'da, β -actin antikoruna da 42 kDa'da bant verdi. Şekil 5.19.'da TUBB3'ün 50 nM siRNA transfeksiyonu sonrası belirgin şekilde sustuğu protein düzeyinde görülmektedir.



Şekil 5.19. HCT116 hücre hattında siRNA transfeksiyonu sonrası TUBB3 ve β -actin'in western blot analizi sonucu

5.13. CANLILIK TAYİNİ SONUÇLARI

Çalışmada plak okuyucuda ölçülen absorbans değerlerine göre canlı hücre sayısı % sağkalım değeri olarak;

$$\frac{(\text{Absorbans}_{\text{Örnek}} - \text{Absorbans}_{\text{Blank}})}{(\text{Absorbans}_{\text{Kontrol}} - \text{Absorbans}_{\text{Blank}})} \times 100$$

formülü ile hesaplandı. Bu formülde Absorbans_{örnek} ile belirtilen değer ilgilenilen örnek kuyusunun 450 nm’de okunan değeri, bu değerden çıkartılan Absorbans_{Blank} ile belirtilen değer ise aynı örnek kuyusunun 600 nm’de okunan değeridir. Aynı hesaplama formülün paydasında belirtildiği gibi referans olarak kullanılacak kontrol için de yapıldı. Bu çalışmada referans olarak kullanılacak hücre grubu kontrol siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerdir. Ölçüm sonucu ham verilerde öncelikle bu işlem yapılarak her kuyunun gerçek absorbans değeri bulundu. Daha sonra örneğin gerçek absorbans değeri referans olarak kullanılacak kontrolün gerçek absorbans değerine bölündü. Elde edilen bu değer referansa göre örnek kuyusundaki canlı hücrelerin absorbans değeridir. Bu değer yüz ile çarpılmasıyla yüzde sağkalım oranı hesaplanmış olmaktadır. Referansa göre örnek kuyusundaki ölüm oranı ise;

$$(1 - \text{Sağkalım}) \times 100$$

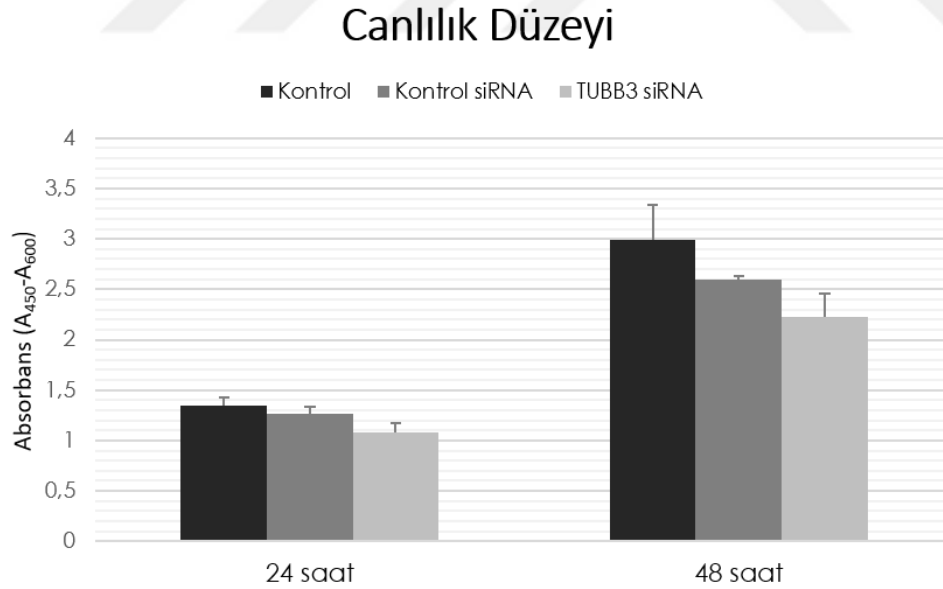
formülü ile hesaplandı. İlgilenilen örneğin ölüm oranı; elde edilen sağkalım absorbans değerinin birden çıkarılması ile bulundu. Bu değer yüz ile çarpılmasıyla ölüm oranının yüzde değeri hesaplanmış olmaktadır. Çalışmada üç biyolojik tekrar bulunmaktadır. Her biyolojik tekrarın üç teknik tekrarına ait absorbans ortalaması o biyolojik tekrarın gerçek absorbansını vermektedir. Her doz için üç biyolojik tekrarın gerçek absorbans ortalaması alınarak bir ortalama absorbans değeri elde edildi. İlgili dozda TUBB3 transfeksiyonu yapılan örneğin absorbans değeri kontrolün ortalama absorbans değerine bölündü ve çıkan değer yüz ile çarpıldı. Kontrol siRNA transfeksiyonu yapılan hücreler ile kontrol hücreleri istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği için sağkalım hesaplamasında hem TUBB3 siRNA hem paklitakselin etkisini görmek amacıyla kontrol hücreleri referans alındı. Hesaplamaları gösteren çizelgeler aşağıda görülmektedir.

HCT116 hücrelerinde TUBB3 geni susturulduğunda canlılık düzeyinin nasıl etkilendiğini incelemek amacıyla canlılık tayini yapıldı. Bunun için Çizelge 4.21.’de belirtilen iki replika olarak hazırlanan plakaların birine transfeksiyonun 24. saatinde diğerine ise 48. saatinde

canlılık tayini yapılarak sağkalım ve ölüm oranları hesaplandı. TUBB3 transfeksiyonu yapılan hücrelerde 24 saat sonra sağkalım oranı %79,6 ölüm oranı %20,4 olarak tespit edildi. Replika plakada 48 saat sonra yapılan canlılık tayininde sağkalım oranı %74,8 ölüm oranı %25,2 olarak tespit edildi. HCT116 hücrelerinde TUBB3 siRNA transfeksiyonu yapıldıktan sonra hücrelerdeki ölüm oranının 48. saatte daha yüksek olduğu görüldü ve hücre canlılığındaki bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). siRNA transfeksiyonu sonrası 24. ve 48. saatte yapılan canlılık tayininde ölçülen absorban değerleri Çizelge 5.7.'de belirtilerek canlılık düzeyi Şekil 5.20.'deki gibi grafiklendirildi.

Çizelge 5.7. siRNA transfeksiyonu sonrası yapılan canlılık tayini analiz sonucu

	Örnek	Ortalama Absorbans	Standart Sapma	% sağkalım
24 saat	Kontrol	1,35	0,08	
	Kontrol siRNA	1,26	0,08	
	TUBB3 siRNA	1,08	0,09	79,62
48 saat	Kontrol	2,98	0,35	
	Kontrol siRNA	2,60	0,04	
	TUBB3 siRNA	2,23	0,22	74,85



Şekil 5.20. siRNA transfeksiyonu sonrası 24. ve 48. saatte canlılık düzeyi

HCT116 hücre hattına TUBB3 transfeksiyonu yapıldıktan sonra ortama eklenen paklitakselin canlılık üzerindeki etkisini incelemek amacıyla tekrar canlılık tayini yapıldı.

Beş farklı dozun Çizelge 4.23.'de belirtildiği gibi uygulandığı üç plakadan oluşan deney düzeninde canlılık tayini sonucunda sağkalım ve ölüm oranları hesaplandı.

48 saat paklitaksel inkübasyonu sonrası elde edilen absorbans değerleri ve analiz sonuçları Çizelge 5.8.'de gösterilmektedir. İlaç dozu ve absorbans düzeylerindeki değişim Şekil 5.21.'deki gibi grafiklendirildi. İki yönlü ANOVA analizine göre TUBB3 ifadesi susturulan hücrelerde 2,5 nM ve 10 nM paklitaksel muamelesinin canlılık düzeyini anlamlı şekilde düşürdüğü tespit edildi ($p < 0,05$). 2,5 nM paklitaksel muamelesinin canlılık düzeyini %61'e, 10 nM paklitaksel muamelesinin ise %46'ya düşürdüğü görülmektedir. 20 nM paklitaksel muamelesinde TUBB3 siRNA etkisinin kaybolduğu, 50 nM paklitaksel muamelesinde de bu durumun devam ettiği ve her iki konsantrasyonda da hücre gruplarının ilaçtan benzer derecede etkilendiği görülmektedir.

Paklitaksel için IC_{50} dozları; herhangi bir transfeksiyon işlemi yapılmayan kontrol hücre grubunda $18,43 \pm 0,6$ nM, kontrol siRNA transfeksiyonu yapılan hücre grubunda $17,11 \pm 0,6$ nM buna karşın TUBB3 siRNA transfeksiyonu yapılan hücre grubunda ise $10,47 \pm 1,5$ nM olarak hesaplandı. Bu sonuç TUBB3 ifadesi susan hücrelerde IC_{50} dozunun kontrol hücrelerine göre 1,76 kat, kontrol siRNA verilen hücrelere göre ise 1,63 kat düştüğünü göstermektedir. Her üç grup için de hesaplanan IC_{50} dozları ve standart sapmaları Çizelge 5.9.'da ve her üç hücre grubunda doz ve yüzde sağkalım oranları dikkate alınarak çizilen grafik ise Şekil 5.22.'de görülmektedir.

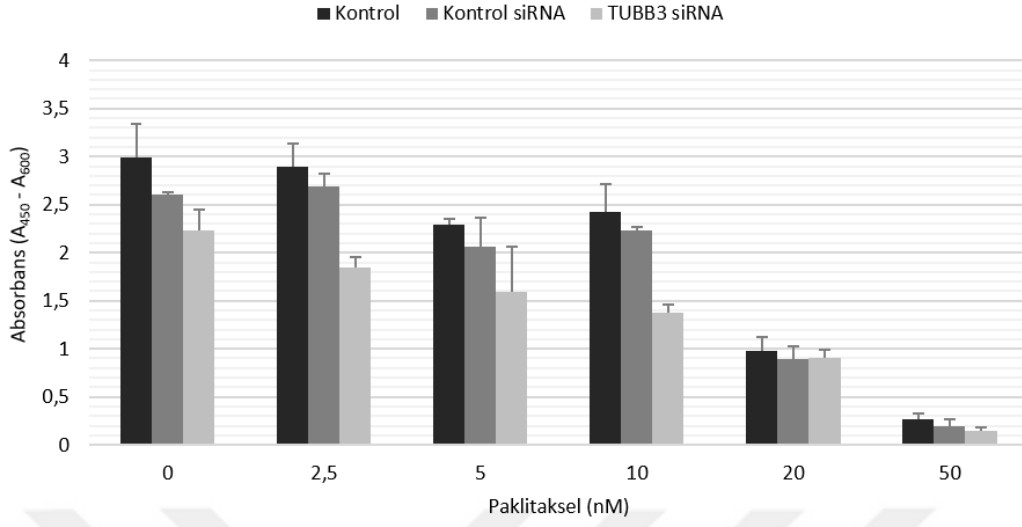
Çizelge 5.8. siRNA transfeksiyonu sonrası 48 saat paklitaksel muamelesi uygulanan hücrelerde canlılık tayini analiz sonucu

	Örnek	PTX Dozu	Ortalama Absorbans	Standart Sapma	% sağkalım
plaka 1	Kontrol	0	2,98	0,35	
	Kontrol siRNA	0	2,60	0,04	
	TUBB3 siRNA	0	2,23	0,22	74,70
plaka 2	Kontrol	2.5 nM	2,91	0,23	
	Kontrol siRNA	2.5 nM	2,70	0,14	
	TUBB3 siRNA	2.5 nM	1,85	0,11	61,81
	Kontrol	5 nM	2,30	0,06	
	Kontrol siRNA	5 nM	2,06	0,30	
	TUBB3 siRNA	5 nM	1,60	0,47	53.5
plaka 3	Kontrol	10 nM	2,43	0,28	
	Kontrol siRNA	10 nM	2,24	0,04	
	TUBB3 siRNA	10 nM	1,37	0,09	46,00
	Kontrol	20 nM	0,99	0,14	
	Kontrol siRNA	20 nM	0,90	0,13	
	TUBB3 siRNA	20 nM	0,90	0,09	30,00
plaka 4	Kontrol	50 nM	0,28	0,06	
	Kontrol siRNA	50 nM	0,20	0,07	
	TUBB3 siRNA	50 nM	0,15	0,03	5,90

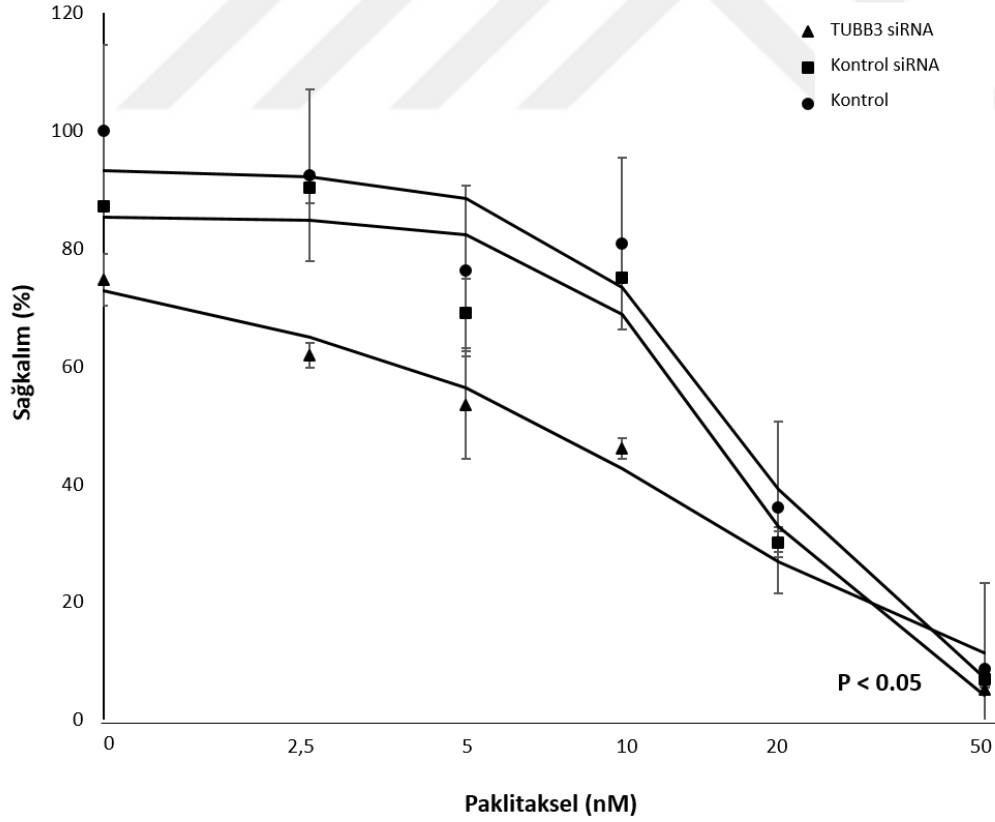
Çizelge 5.9. HCT116 hücrelerinde 48 saat paklitaksel muamelesine ait IC₅₀ dozları

	TUBB3 siRNA	Kontrol siRNA	Kontrol
Birinci Biyolojik Tekrar	9,706	17,555	16,971
İkinci Biyolojik Tekrar	15,498	18,309	18,974
Üçüncü Biyolojik Tekrar	13,674	15,468	19,363
IC₅₀ (nM)	10,47	17,110	18,436
Standart Sapma	1,570	0,693	0,605

Canlılık Düzeyi



Şekil 5.21. HCT116 hücrelerinin 48 saatlik paklitaksel muamelesinde doz ve absorbans düzeyi değişimi



Şekil 5.22. HCT116 hücrelerinin 48 saatlik paklitaksel muamelesinde doz ve sağkalım (%) düzeyi değişimi

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

KRK dünyada kadınlar arasında ikinci erkekler arasında üçüncü en sık görülen kanserdir. Ülkemizde ise her iki cinsiyette de insidansı en yüksek olan üçüncü kanser tipidir. Araştırmalarda KRK gelişiminde rol oynadığı tespit edilen kritik mutasyonlar genellikle iki temel KRK gelişim yolağının varlığını göstermektedir (6-8). Alternatif yolak ve klasik yolak olarak adlandırılan bu mekanizmalarda çok basamaklı tümör gelişimi söz konusudur.

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında 202 KRK olgusunun dMMR/pMMR statüsünü belirlemek amacıyla dörtlü İHK paneli yapılmıştır. Dökülme sebebiyle değerlendirme dışı bırakılan dokular haricindeki 193 olgunun %20,2'sinin dMMR aktivitesine %79,8'inin pMMR aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuç KRK'lerin %15 oranında MSI yolağı üzerinden geliştiğini belirten literatür ile benzerlik göstermektedir (7, 36).

Literatürde daha önce ARMS PCR ile JAK2 ve V617F mutasyonlarının tespit edilebildiği gösterilmiştir (97, 98). Farklı bir araştırma grubu da ARMS-PCR metodunu BRAF V600E mutasyon tespiti için kullanmıştır (99). Dört primerin aynı anda çalıştığı bu PCR yönteminde; internal kontrol olarak mutasyon bölgesini de içine alan 200 bç uzunluğunda bir fragment, yabancı sekansı gösteren 97 bç uzunluğunda ikinci bir fragment ve mutant sekansı gösteren 144 bç uzunluğunda üçüncü bir fragment oluşmaktadır. Her üç fragmentin de birlikte görüldüğü olgular BRAF V600E mutant olarak değerlendirilirken 200 bç ve 97 bç uzunluğundaki iki fragmenti içeren olgular BRAF V600E açısından yabancı olarak değerlendirilmektedir. Çalışmamızda MLH1 mutasyonuna sahip olgularda BRAF V600E mutasyonunun tespiti ARMS PCR ile yapılmıştır.

Elde ettiğimiz dörtlü İHK paneli sonucuna göre dMMR profili gösteren olguların %56'sında (n=22) MLH1 kaybı bulunmaktadır. Bunlardan sporadik dMMR KRK olan olguların belirlenebilmesi amacıyla ARMS PCR metodu ile BRAF V600E mutasyon tespiti yapılmıştır. Analiz sonucunda, MLH1 kayıp olguların %82'sinin (n=18) BRAF yabancı olduğu, %18'inin (n=4) BRAF mutant olduğu görülmektedir. BRAF mutant olan olgular (n=4) sporadik dMMR KRK gelişimine işaret ederken, MLH1 kaybı gösteren ve BRAF

yabanıl olan 18 olgu ile MLH1 dışındaki genlerde (PMS2, MSH2, MSH6) kayıp gösteren 17 olgu olmak üzere toplamda 35 olgunun Lynch Sendromu tanısı açısından genetik test (DNA sekansı) ile değerlendirilmesi gerekmektedir. pMMR ve dMMR olgulardan oluşan örneklerde BRAF mutasyon oranı sırasıyla %14 (n=26) ve %15,2 (n=30) olarak belirtilmiştir (39). Çalışmamızda dMMR olan olgulardan elde ettiğimiz % 18 BRAF mutasyon oranı literatürde belirtilen %15,2 oranına oldukça yakın bir sonuçtur. Yine ARMS PCR sonucuna göre; BRAF mutant olan dört vakanın %75'i (n=3) sağ kolon, %25'i (n=1) sol kolon tutulumu göstermektedir. dMMR olgularının çoğunlukla sağ kolon tutulumu sergilediği daha önce literatürde bildirilmiştir (36). Bu analiz sonuçları mutasyon oranı açısından literatür ile benzerlik göstermektedir.

Teknolojik gelişmeler sonucunda hastalıkların daha iyi anlaşılmasına başlanmasıyla birlikte hastalık seyri, tedavisi ve erken tanısı ile ilgili yeni biyobelirteçlerin araştırılması hız kazanmıştır. Böylece hastalığın altgruplara ayrılması ve hastayı uygun tedaviye yönlendirebilecek yeni biyobelirteçlerin tanımlanması da ön plana çıkmıştır. Tez çalışmamızın ikinci aşamasında biyobelirteç adayları olarak çalışmaya karar verdiğimiz TUBB3, neoplastik olmayan kolon mukozası örneklerinde, KRK öncül lezyonlarında, KRK olgularında ve KRK hücre hattı HCT116'da detaylı olarak çalışılmıştır.

Literatürde meme (100, 101), akciğer (83), mide (96, 102), prostat (103), melanoma (104) gibi farklı kanser tiplerinde TUBB3 ekspresyon düzeyi ve etkileri hakkında kapsamlı veri olmasına rağmen kolorektal kanserde bu veriler daha kısıtlıdır. TUBB3'ün çeşitli adenom tiplerini içeren KRK öncül lezyonlarındaki durumu hakkında detaylı bir inceleme ise bildirilmemiştir. TUBB3 ve öncül lezyonlar ile ilgili kısıtlı bilgi rektal kanserde yapılan bir çalışmada displazi alanlarında yapılan incelemeyle sınırlıdır (105). Ayrıca literatürde KRK ile yapılan çalışmalarda dMMR ve pMMR KRK ile TUBB3 arasında bir ilişki olup olmadığına ilişkin detaylı veri de mevcut değildir.

Melling ve arkadaşları 1800 KRK olgusunda yaptığı çalışmada TUBB3 İHK sonuçlarını; hiç boyama görülmeyen olguları negatif, boyanma alanı %20'ye kadar olan olguları (3), %50'ye kadar olan olguları (2), %50'den fazla olan olguları (1) olarak skorlamıştır (106). Bu skorlamada (3); zayıf pozitif, (2) orta pozitif ve (1) kuvvetli pozitif olarak tanımlanmış ve üç grup birlikte TUBB3 ekspresyonu açısından pozitif olarak kabul edilmiştir. Bu

skorlamaya göre değerlendirilen 1619 olgunun TUBB3 açısından %79,2 oranında pozitif, %20,8 oranında negatif olduğu belirtilmiş olup pozitif olguların %41,7'sinin zayıf pozitiflik ve %37,5'inin kuvvetli pozitiflik gösterdiği bildirilmiştir (106). Tóth ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada KRK olgularının karaciğer metastazı örneğinde TUBB3 ifadesi dağılımı İHK yöntemi ile incelenmiştir (107). Çalışmada TUBB3 İHK sonuçları; hiç boyama görülmeyen veya boyanma alanı %10'dan az ve soluk boyanan olgular negatif (0), tümör merkezinde zayıf veya soluk ancak invaziv uç ile tomurcuklanma (budding) bölgesinde yaygın güçlü boyanma olan olgular (1), tüm tümör alanındaki güçlü boyanma olan olgular ise (2) olarak skorlanmıştır (107). Bu skorlamaya göre değerlendirilen olguların (n=100) TUBB3 ifadesi açısından %35 oranında negatif, %52 oranında invaziv uçlarda pozitif ve %13 oranında ise tümörün tamamında pozitif olduğu bildirilmiştir (107). Portyanko ve arkadaşlarının çalışmasında kantitatif İHK değerlendirmesi “The Positive Pixel Count Algorithm, v.9” programı ile yapılmış olup TUBB3 boyanması; zayıf, orta ve güçlü olarak üç grupta skorlanmıştır (108). Bu üç grubun birlikte TUBB3 ifadesi açısından pozitif olarak kabul edildiği çalışmada normal kolonik epitelyumun TUBB3 ifadesi açısından negatif buna karşın KRK olgularının %100'ünün (n=32) pozitif olduğu bildirilmiştir (108). Çalışmada örneklemin özellikle invaziv uçlara sahip tümörlerden seçildiği belirtilmiştir. Zhao ve arkadaşlarının 111 olgudan 72 tanesinin invaziv uca sahip olduğu KRK örneklemi ile yaptığı çalışmada TUBB3 İHK sonuçları; boyanma yoğunluğuna göre zayıf, orta ve güçlü şeklinde skorlanırken boyanma görülmeyen olgular negatif olarak değerlendirmiştir (109). Bu skorlamaya göre TUBB3 açısından olguların; %5,4'ü (n=6) negatif, %9'u (n=10) zayıf pozitif, %58,5'i (n=65) orta pozitif ve %27'si (n=30) güçlü pozitif olarak skorlanmıştır (109).

Bu tez çalışmasında İHK boyamalarının değerlendirilmesi iki bağımsız patolog (Doç. Dr. Aytekin AKYOL ve Dr. Güneş GÜNER TAŞ) tarafından yapılmıştır. Neoplastik olmayan kolon mukozası örneklerinde yapılan İHK sonucunda; olguların %100'ünün (n=14) TUBB3 ifadesi açısından negatif olduğu görülmüştür. Neoplastik olmayan kolonik epitelyumun TUBB3 ifadesi açısından negatif olduğu literatürde bildirilmiştir (108). Çalışmamızda KRK olgularında TUBB3 ifadesi %38 (n=72) negatif, %39 (n=74) fokal pozitif ve %23 (n=44) pozitif olarak tespit edilmiştir. Boyanma açısından negatif olarak değerlendirilen olgular, literatürle benzer şekilde hiç boyanma göstermeyen olguları kapsamaktadır. Tez çalışmamızda TUBB3 boyama sonucu fokal pozitif ve pozitif olan olgular birlikte

değerlendirildiğinde olgularımızın %62 oranında pozitif olduğu, Melling ve arkadaşlarının çalışmasında belirtilen orana yakın bir sonuç elde edildiği görülmektedir. Tóth ve arkadaşlarının sonuçları ise TUBB3 ifadesi açısından çalışmamızdan elde edilen %38 negatif ve %62 pozitiflik oranları ile oldukça benzerdir. Örneklem büyüklüğü açısından Melling ve arkadaşlarının çalışması ile benzer sonuçların elde edilmesi KRK'de TUBB3 ifadesinin yüksek olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda incelenen örneklemde sadece bir olguda tümörün invaziv ucundaki hücrelerde TUBB3'ün pozitif olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda TUBB3 ifadesinin dMMR ve pMMR KRK'le ilişkisi de incelenmiştir. dMMR aktivitesi gösteren olguların %33,3'ü (n=13), pMMR aktivitesi gösteren olguların %67,5'i (n=104) TUBB3'ü ifade etmektedir. pMMR aktivitesi gösteren olguların TUBB3 pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuç pMMR KRK'ler ile TUBB3 pozitifliği arasında bir ilişki olabileceğini düşündürürken, pMMR KRK olgularında TUBB3'ün ifade düzeyini arttıracak bir mekanizmanın varlığını da düşündürmektedir. pMMR KRK'de TUBB3 ifadesinin anlamlı çıkması olası bir mekanizmasının araştırılması açısından önemli bir sonuçtur. Çalışmamızda %80 pMMR ve %20 dMMR dağılımı gösteren KRK örnekleminde TUBB3 ifadesinin %62 olduğu dikkate alınca; pMMR ve TUBB3 ifadesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunması beklenmedik bir sonuç değildir. TUBB3 ifadesi ve dMMR aktivitesi arasında istatistiksel olarak bir önem bulunamamış olmasına rağmen dMMR olguların %33 oranında TUBB3 ifadesi göstermesi dikkat çekicidir. Bu sonuçlar TUBB3'ün; KRK'in pMMR ve dMMR alttiplerinden bağımsız bir şekilde ifade yeteneği kazandığını göstermektedir. Literatürde bu yönde bir veriye rastlanılmadığı için bulgularımız herhangi bir karşılaştırmaya tabii tutulmamıştır.

Tóth ve arkadaşları TUBB3 ifadesi ile MLH1 ve MSH2 ifadesi arasında pozitif korelasyon olduğunu belirtmiştir (107). Melling ve arkadaşları TUBB3'ün intakt MMR sistemi ile tümörlerde DNA tamirine katkıda bulunabileceği yorumunu yapmıştır (106). Çalışmamızda TUBB3 ve MMR proteinlerinin pozitifliği birlikte değerlendirildiğinde istatistiksel olarak TUBB3; MLH1, PMS2 ve MSH6 ile anlamlı ($p<0,05$), MSH2 ile anlamsız ($p>0,05$) sonuç vermiştir. Bu veri çalışmamızda belirttiğimiz pMMR aktivitesi ve TUBB3 pozitifliğinin ilişkili olduğu sonucunu desteklemektedir. Çalışmamızdan elde edilen bu veriler TUBB3 ifadesi ile MLH1, PMS2 ve MSH6 ifadesi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermektedir.

KRK'de TUBB3 ifadesi ile yaş, cinsiyet, sağ/sol kolon tutulumu gibi klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki de farklı çalışmalarda incelenmiştir. Melling ve arkadaşları artmış TUBB3 ekspresyon düzeyi ve sol kolon tutulumu gösteren KRK'ler arasında bir bağlantı olabileceğini vurgulamıştır (106). Tóth ve arkadaşları TUBB3 ifadesi ve yaş arasında negatif bir korelasyon olduğunu bildirmiştir (107). Çalışmamızda TUBB3 pozitif (fokal pozitif ve pozitif) olguların %65'inin sol kolon tutulumu sergilediği görülmüş ancak bu veri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu açıdan bulgularımız sol kolon tutulumu ve TUBB3 ifadesinin ilişkili olduğu yönündeki verileri destekler nitelikte değildir. Olgularımızın TUBB3 pozitifliği cinsiyet ve yaş dağılımı açısından da incelenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$). Bu sonuca göre TUBB3 pozitifliğinin yaş ve cinsiyet ile ilişkili olmadığı ifade edilebilir. Çalışmamızda KRK olgularında TUBB3 ifadesinin sağkalım ile ilişkili olmadığı ($p>0,05$) ancak bu olguların kötü prognoz eğiliminde olduğu gösterilmiştir.

KRK öncül lezyonları TUBB3 ifadesi açısından %24,4 (n=19) negatif, %75,6 pozitif olarak saptanmıştır. Pozitif olarak değerlendirilen olguların %62,8'i (n=49) fokal pozitif, %12,8'i (n=10) pozitifdir. Klasik yolak gelişiminde etkin olan adenomatöz lezyonlar TUBB3 ifadesi açısından tek başına değerlendirildiğinde; olguların %15,5'inin negatif, %84,5'inin pozitif olduğu görülmüştür. Alternatif yolak ile ilişkili serrated adenomlar tek başına değerlendirildiğinde ise olguların %37 negatif, %63 pozitif olduğu görülmüştür. Neoplastik karakterli KRK öncül lezyonu olan bu iki gruptan sadece adenomatöz lezyonlarda TUBB3 pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuç adenomatöz lezyonlar ve TUBB3 pozitifliği arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Yine bu sonuç; adenomatöz lezyonların adenom-karsinom yolağı üzerinden geliştirdiği pMMR KRK'ler ile TUBB3 pozitifliği arasında ilişki olabileceği yönündeki bulgumuzu destekler niteliktedir. Bu iki sonuç birlikte düşünüldüğünde adenom-karsinom yolağıyla oluşan KRK olgularında TUBB3'ün daha fazla ifade edilebilmesine olanak sağlayan bir mekanizmanın olabileceği düşüncesi güç kazanmaktadır. Literatürde neoplastik olan ve olmayan KRK öncül lezyonlarında TUBB3 ifadesi ile ilişkili veriye rastlanmadığından bulgularımız için herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Portyanko ve arkadaşları KRK olgularında TUBB3 ifadesinin invaziv uçlarda olmasını hücrenin invazyon ve metastaz yeteneği ile ilişkilendirmiştir (108). Aynı şekilde Zhao ve

arkadaşları da KRK olgularında TUBB3 ifadesinin lenfatik metastaz ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (109). Tóth ve arkadaşlarının özellikle KRK karaciğer metastazı örneklerini seçerek TUBB3 ve metastaz arasındaki ilişkiyi irdelediği çalışmasında, KRK karaciğer metastazı örneklerinin TUBB3 açısından %35 negatif ve %65 pozitif olduğunu bildirmiştir (107). Bahsedilen bu çalışmalarda sadece KRK olguları ve KRK karaciğer metastaz dokuları değerlendirilerek TUBB3 ifadesinin metastaz ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (107-109). Bu stratejilerden farklı olarak çalışmamızda hem primer KRK olguları hem de KRK öncül lezyonları TUBB3 ifadesi açısından incelenmiştir. TUBB3 ifadesi açısından primer KRK olguları %38 negatif ve %62 pozitif iken KRK öncül lezyonları %24,4 negatif ve %75,6 pozitif sonuç vermiştir. Olgularımızın TUBB3 ifadesi ile metastaz statüsü incelendiğinde bu iki değişken arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p < 0,05$). Primer KRK olgularının KRK metastaz örnekleri ile neredeyse aynı oranda TUBB3 ifadesine sahip olması, metastaz yeteneği bulunmayan öncül lezyonlarda TUBB3 ifadesinin görülmesi ve KRK olgularında TUBB3 ve metastaz statüsü arasında anlamlı bir ilişki bulunamaması, KRK'de TUBB3 ifadesi ile metastaz arasında direkt bir ilişki olmayabileceğini düşündürmektedir. Yine bu durum TUBB3 pozitif lezyonların tümör heterojenitesine neden olarak invaziv bir tümör fraksiyonu oluşumunda rol oynayabileceğini ve bu fraksiyonun epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) uyarabileceğini düşündürmektedir.

Retrospektif olarak değerlendirilen KRK olgularının altı tanesine ait taze tümör dokusu da çalışmaya dâhil edilmiştir. TUBB3 protein düzeyi İHK ile analiz edilen olgulardan elde edilen sonuçlar; olgulara ait taze dokular ile mRNA düzeyinde yapılan analizle teyit edilmiştir. Aynı olguların İHK skorlamalarına göre mRNA düzeylerindeki görece küçük farklılıkların çalışılan biyomoleküllerden birinin mRNA diğerinin protein olması ve tümör örneklerinin FFPE doku/taze doku gibi iki farklı şekilde muhafaza edilmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca İHK'nın taze dokudan elde edilen sonuçlarla benzer paternde sonuç vermesi retrospektif çalışmalarda gen ifadesinin belirlenmesi için İHK'nın tutarlı bir yöntem olduğunu da göstermektedir.

Çalışmanın son aşaması HCT116 hücre hattı ile yürütülmüştür. HCT116 hücre hattında siRNA transfeksiyonu öncesi TUBB3 ifadesi qRT-PCR, western blot ve İHK ile analiz edilmiştir. Çalışılan üç teknikte de HCT116 hücre hattında TUBB3 ifadesinin varlığı teyit edilmiştir. TUBB3 ifadesini yüksek oranda susturabilecek siRNA konsantrasyonunu

belirlemek için üç farklı siRNA dozu transfekte edilen hücrelerde, qRT-PCR sonucuna göre 50 nM siRNA transfeksiyonu, gen ifadesini %96 oranında susturmuştur. Bu sonuç western blot yöntemi ile protein düzeyinde de teyit edilmiştir. TUBB3'ün değişen siRNA konsantrasyonları ile transfekte edildiği ve gen ifadesinin yüksek oranda sustuğu farklı çalışmalar mevcuttur (103, 104).

Taksan grubu kemoterapi ajanları ile yapılan denemelerde KRK olgularında antimikrotübül ajanların çok az veya hiç etki göstermediği bildirilmiş ve çalışmalar faz ikiden öteye gidememiştir (61-66). Son yıllarda birçok solid tümör çeşidinde paklitaksel, dosetaksel gibi taksan grubu antimikrotübül kemoterapi ajanlarına duyarsızlığın yüksek TUBB3 ifadesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (94, 96, 100-104, 110, 111).

Ploussard ve arkadaşları prostat kanseri hücre hatlarında TUBB3 geninde susturma ve ifade arttırımı manipülasyonlarının dosetaksel duyarlılığına etkisini incelemiştir (103). TUBB3 ifadesi LNCaP ve DU145 hücre hatlarında vektör yardımıyla arttırılırken 22Rv1 hücre hattında siRNA ile susturulmuştur (103). LNCap hücre hattı ve DU145 hücre hattından iki klon 2 nM-50 nM arasında değişen dozlarda dosetaksel ile 72 saat inkübe edilmiştir (103). Kontrol hücrelerine göre TUBB3 ifadesi arttırılan LNCap hücrelerinde IC₅₀ dozunun 6,6 kat arttığı ve hücrelerin dosetaksel duyarlılığının istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gösterdiği tespit edilmiştir (103). DU145 hücre hattında birisi yüksek diğeri orta derecede TUBB3 ifade eden iki klonda ise yüksek oranda TUBB3 ifade eden klonun diğeri klon ve kontrol grubuna göre IC₅₀ dozunun 2 kat arttığı ve istatistiksel olarak anlamlı derecede dosetaksel duyarlılığının düştüğü görülmüştür (103). 22Rv1 hücreleri siRNA transfeksiyonu sonrası 2,5 nM-20 nM arasında değişen dozlarda dosetaksel ile 72 saat inkübe edilmiş ve kontrol hücrelerine göre TUBB3 siRNA verilen hücrelerin dosetaksele iki kat daha duyarlı hale geldiği belirtilmiştir (103). Ploussard ve arkadaşları bu verilere dayanarak TUBB3 ekspresyonunun prostat kanserinde taksan tabanlı kemoterapi ajanlarından fayda görebilecek olguları belirlemek için moleküler belirteç olabileceğini öne sürmektedir (103).

Akasaka ve arkadaşları yedi malignant melanoma ve iki neonatal epidermal melanosit (NHEM) hücre hattı kullanılarak TUBB3'ün primer malignant melanomada taksan türevlerinden cevap alabilecek olguları belirleyebilen bir biyobelirteç olup olamayacağını irdlemiştir (104). TUBB3 ifadesi kuvvetli olan NHEM ve altı melanosit hücre hattı ile

TUBB3 ifadesi negatif olan bir melanosit hücre hattına 72 saat paklitaksel muamelesi sonucunda yoğun TUBB3 ifadesine sahip hücre hatlarının istatistiksel olarak paklitaksele düşük duyarlılıkta olduğu ve TUBB3 protein düzeyinin paklitaksel duyarlılığı ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (104). Apoptotik analizler ise TUBB3 pozitif HMV-II ve NHEM-D hücre hatlarına kıyasla TUBB3 negatif HMV-I hücre hattında yüksek düzeyde paklitaksel ile uyarılmış apoptotik hücrelerin varlığı göstermiştir (104). TUBB3 ifadesi yüksek olan HMV-II hücre hattı TUBB3 ifadesi siRNA aracılığıyla %10'un altına düşürüldükten sonra 20–80 nM paklitaksel ile 72 saat muamele edilmiş ve hücre hattında paklitaksel duyarlılığının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (104). Bu sonuçlara dayanarak Akasaka ve arkadaşları TUBB3'ün malignant melanomada taksan türevi kemoterapi alabilecek olguların seçilmesinde iyi bir biyobelirteç olabileceğini bildirerek TUBB3 İHK incelemesi ve kemo-duyarlılık testinin bireyselleştirilmiş kemoterapi için faydalı bilgiler sağlayabileceğini ifade etmiştir (104).

Yang ve arkadaşları NSCLC'de taksan/vinorebine tabanlı kemoterapi verilecek olgularda TUBB3'ün prognostik rolü üzerine 28 bağımsız çalışmayı ve 2401 NSCLC olgusunu içeren bir meta analiz çalışması yapmıştır (112). Çalışmada taksan/vinorebine tabanlı kemoterapi alan olgularda TUBB3 ifadesi ile genel sağkalım (OS), hedeflenen cevap oranı (ORR), olaysız sağkalım (EFS) gibi klinik kemoterapi çıktıkları arasındaki ilişki irdelenmiştir (112). Çalışmada NSCLC olgularında düşük TUBB3 ifadesine kıyasla yüksek TUBB3 ifadesinin; düşük ORR, kısa OS ve kötü EFS ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve TUBB3'ün NSCLC olgularında taksan/vinorebine tabanlı kemoterapi duyarlılığı için bir biyobelirteç olduğu bildirilmiştir (112). Yang ve arkadaşları bu verilere dayanarak NSCLC olgularında TUBB3 ifade düzeyinin gelecekte kişiselleştirilmiş kemoterapi tedavisinde faydalı bir biyobelirteç olabileceğini ifade etmiştir (112).

Hwang ve arkadaşları tekrarlayan ve metastatik mide kanserinde taksan+cisplatin kemoterapisi alan 146 olguda TUBB3'ün prognostik ve prediktif rolünü irdelemiştir (102). Çalışmada; tekrarlayan veya metastatik gastrik kanserde taksan tabanlı kemoterapi alan olgularda yüksek TUBB3 ifadesinin kısa ilerlemesiz sağkalım süresi ve düşük kemoterapi cevabına eğilim ile ilişkili olduğu ancak genel sağkalım ile ilişkili olmadığını ve TUBB3'ün bu olgular için prediktif önemi olduğunu bildirilmiştir (102). Yine Lu ve arkadaşları ile

Urano ve arkadaşları da TUBB3'ün gastrik kanserde taksan tabanlı kemoterapi alacak olgular için prediktif biyobelirteç olarak önemli olduğunu bildirmiştir (96, 111).

Tommasi ve arkadaşları meme kanserinde TUBB3'ün paklitaksel tedavisine duyarlılıkta rol oynayan etkenlerden biri olduğunu ve TUBB3 ifadesinin paklitaksel kemoterapisiyle ilerleme gösterebilecek olguları bireyselleştirebileceğini ifade etmiştir (100). Yuan ve arkadaşları da metastatik meme kanseri olgularında TUBB3'ün survivin geni ile birlikte dosetaksel tedavisi için prediktif bir indeks olduğunu bildirmiştir (101).

Çalışmamızda KRK'de TUBB3 ifadesinin paklitaksel duyarlılığı ile ilişkisini incelemek amacıyla TUBB3 ifadesi HCT116 hücre hattında siRNA aracılığıyla susturulmuştur. Bu hücrelere farklı dozlarda paklitaksel muamelesi uygulanmış ve proliferasyonun değişim paterni incelenmiştir. HCT116 hücrelerinde TUBB3 siRNA transfeksiyonundan 48 saat sonra proliferasyonun yaklaşık %25 oranında anlamlı şekilde düştüğü görülmüştür. Shibazaki ve arkadaşları HEK291 ve HELA hücrelerinde TUBB3'ün %80-90 oranında susturulmasının hücre büyüme hızını düşürdüğünü ve normal hücre büyümesi için TUBB3 ifadesinin gerekli olduğunu öne sürmüştür (87). Bu bulgu dikkate alınır HCT116 hücrelerinde proliferasyondaki %25'lik düşüşün hücre büyüme hızının azalması neticesinde ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir.

TUBB3 ifadesi neredeyse tamamen susan HCT116 hücreleri 2,5 nM ve 50 nM arasında değişen beş farklı paklitaksel konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilmiştir. İnkübasyon sonucunda 2,5 nM paklitaksel uygulanan hücrelerde proliferasyonun kontrol hücrelere göre %38,2 oranında, 10 nM paklitaksel uygulanan hücrelerde ise %54 oranında anlamlı şekilde düştüğü belirlenmiştir. 20 nM paklitakselin ise her üç hücre grubunu da neredeyse aynı derecede etkilediği bu etkinin 50 nM paklitakselde de devam ettiği ve canlı hücre oranının %5,9'a düştüğü görülmüştür. Bu durum paklitakselin 20 nM konsantrasyonda hücrede sitotoksik etki yaptığını ve TUBB3 siRNA'sının etkisini kaybettiğini göstermektedir. 50 nM paklitaksel uygulamasında ise hücre gruplarının sağkalım düzeyi sifira yaklaşmıştır. Paklitaksel inkübasyonundan elde edilen bu verilere göre TUBB3 siRNA ile 5 nM paklitaksel kombinasyonu etkisiz doz, 2,5 nM ve 10 nM paklitaksel kombinasyonu terapötik doz, 20 nM paklitaksel kombinasyonu sitotoksik doz ve 50 nM paklitaksel kombinasyonu letal doz olarak nitelendirilebilir.

Kontrol hücrelerine göre TUBB3 ifadesinin susturulduğu hücrelerde paklitaksel IC₅₀ dozu 1,76 kat düşmüştür. Bu veriler TUBB3 ifadesi olmayan hücrelerin düşük konsantrasyondaki paklitaksele karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. HCT116 hücrelerinde TUBB3 ifadesi ile paklitaksel duyarlılığı ilişkilidir. Bu bağlamda TUBB3 ifadesi olmayan KRK olgularında paklitakselin düşük dozlarda etkili olabileceği ve tümör proliferasyonunu düşürebileceği öngörülmektedir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar; TUBB3 ifadesinin diğer kanserlerde olduğu gibi KRK'de de taksan türevi kemoterapi ajanlarına duyarlılık ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Solid tümör çeşitlerinden elde edilen bu sonuçlara göre; TUBB3 taksan türevi kemoterapilerden fayda görebilecek olguların belirlenmesini ve tümör heterojenliğinden dolayı giderek önem kazanan bireyselleştirilmiş tıp tedavilerinin yönlendirilmesini sağlayan bir biyobelirteç olarak kullanılabilir.

KRK odağında yürütülen bu çalışmada hastaların %38'inde TUBB3 ifadesinin negatif olduğu görülmüştür. Bu oran KRK'de taksan türevi kemoterapi ajanlarının uygulanabileceği hedef kitleyi ifade etmektedir. TUBB3 ifadesi göstermeyen KRK olguları immünohistokimyasal boyama gibi rutinde kullanılan ucuz ve kolay bir yöntem ile belirlenebilir. TUBB3 negatif bu olguların tedavisinde düşük dozlarda taksan türevi kemoterapötik ajanların kullanımını daha ileri çalışmalar ile değerlendirilebilir.

6.2. SONUÇ

Neoplastik olmayan kolon mukozasında TUBB3 ifadesi negatiftir. Neoplastik karakterli KRK öncül lezyonlarının ve kolorektal tümörlerin büyük bir kısmında ise TUBB3 ifadesi görülmektedir. Bu sonuçlar kolorektal tümörlerin karsinogenez sürecinin başından itibaren TUBB3'ü ifade edebildiğini göstermektedir.

KRK öncül lezyonlarının büyük bir kısmında TUBB3 ifadesinin görülmesi ve KRK olgularında metastaz ile TUBB3 arasında anlamlı bir ilişki bulunamaması, TUBB3 ifadesi ile metastaz arasında direkt bir ilişki olmayabileceğini düşündürmektedir.

Adenomatöz lezyonlarda ve pMMR kolorektal kanserlerde TUBB3 ifadesinin anlamlı olması adenom karsinom yolağında TUBB3'ün yer aldığı bir mekanizmanın olabileceğini işaret etmektedir.

Çalışmamızda incelenen KRK örnekleminin bir kısmında TUBB3 ifadesi pozitif iken bir kısmında negatiftir. TUBB3 ifadesi dikkate alındığında KRK evreninde olguları klinik açıdan TUBB3 pozitif ve TUBB3 negatif olarak iki ana gruba ayırmanın mümkün olabileceği düşünülmektedir.

TUBB3 ifadesi susturulan HCT116 hücrelerinde, paklitaksel sitotoksik olmayan dozda uygulandığında kontrol hücrelerine göre sağkalım anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bu durum TUBB3 ifadesinin HCT116 hücre hattında paklitaksel duyarlılığını direkt olarak etkilediğini göstermektedir. Çalışmamızdan elde edilen verilere göre TUBB3 negatif KRK olguları taksan grubu kemoterapi ajanlarına duyarlı olabileceğinden düşük dozlarda tedavi bu olgularda değerlendirilebilir.

Bu sonuçlar dikkate alındığında gelecekte KRK hücre hatlarında ve/veya primer doku kültürlerinde TUBB3 ifadesinin artırılması ve susturulmasını içeren gen manüplasyonu çalışmalarının, zenograft model çalışmalarının ve KRK olgularında paklitaksel faz III çalışmalarının yapılması TUBB3'ün invazyon ve bireyselleştirilmiş tedavide alabileceği roller hakkında daha net bilgiler elde etmede faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. Epub 2018/09/13. doi: 10.3322/caac.21492. PubMed PMID: 30207593.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108. Epub 2015/02/06. doi: 10.3322/caac.21262. PubMed PMID: 25651787.
3. 2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu: 2014.
4. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009;22(4):191-7. Epub 2010/11/03. doi: 10.1055/s-0029-1242458. PubMed PMID: 21037809; PubMed Central PMCID: PMCPMC2796096.
5. Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med.* 2015;372(9):793-5. Epub 2015/01/31. doi: 10.1056/NEJMp1500523. PubMed PMID: 25635347; PubMed Central PMCID: PMCPMC5101938.
6. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-87 e3. Epub 2010/04/28. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064. PubMed PMID: 20420947; PubMed Central PMCID: PMCPMC3037515.
7. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:479-507. Epub 2010/11/26. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130235. PubMed PMID: 21090969.
8. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67. Epub 1990/06/01. PubMed PMID: 2188735.
9. Shinya H, Wolff WI. Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. *Ann Surg.* 1979;190(6):679-83. Epub 1979/12/01. PubMed PMID: 518167; PubMed Central PMCID: PMCPMC1345622.
10. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007;50(1):113-30. Epub 2007/01/06. doi: 10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x. PubMed PMID: 17204026.
11. Colucci PM, Yale SH, Rall CJ. Colorectal polyps. *Clin Med Res.* 2003;1(3):261-2. Epub 2005/06/03. PubMed PMID: 15931318; PubMed Central PMCID: PMCPMC1069054.
12. Williams AR, Balasooriya BA, Day DW. Polyps and cancer of the large bowel: a necropsy study in Liverpool. *Gut.* 1982;23(10):835-42. Epub 1982/10/01. PubMed PMID: 7117903; PubMed Central PMCID: PMCPMC1419830.

13. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Paul Kleihues LHS, editor. Lyon, France: IARC Press; 2000.
14. Shussman N, Wexner SD. Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2014;2(1):1-15. Epub 2014/04/25. doi: 10.1093/gastro/got041. PubMed PMID: 24760231; PubMed Central PMCID: PMCPMC3920990.
15. Summers RM. Polyp size measurement at CT colonography: what do we know and what do we need to know? *Radiology*. 2010;255(3):707-20. Epub 2010/05/27. doi: 10.1148/radiol.10090877. PubMed PMID: 20501711; PubMed Central PMCID: PMCPMC2875919.
16. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32. Epub 1988/09/01. doi: 10.1056/NEJM198809013190901. PubMed PMID: 2841597.
17. Langner C. Serrated and non-serrated precursor lesions of colorectal cancer. *Dig Dis*. 2015;33(1):28-37. Epub 2014/12/23. doi: 10.1159/000366032. PubMed PMID: 25531494.
18. Snover DC AD, Burt RW, Odze RD. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al, editors. WHO classification of tumours of the digestive system. Lyon, France: IARC; 2010.
19. Rosty C, Hewett DG, Brown IS, Leggett BA, Whitehall VL. Serrated polyps of the large intestine: current understanding of diagnosis, pathogenesis, and clinical management. *J Gastroenterol*. 2013;48(3):287-302. Epub 2012/12/05. doi: 10.1007/s00535-012-0720-y. PubMed PMID: 23208018; PubMed Central PMCID: PMCPMC3698429.
20. Strum WB. Colorectal Adenomas. *N Engl J Med*. 2016;374(11):1065-75. Epub 2016/03/18. doi: 10.1056/NEJMra1513581. PubMed PMID: 26981936.
21. Jass JR. Serrated adenoma and colorectal cancer. *J Pathol*. 1999;187(5):499-502. Epub 1999/07/09. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199904)187:5<499::AID-PATH309>3.0.CO;2-B. PubMed PMID: 10398112.
22. Hyman NH, Anderson P, Blasyk H. Hyperplastic polyposis and the risk of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2004;47(12):2101-4. Epub 2005/01/20. doi: 10.1007/s10350-004-0709-6. PubMed PMID: 15657661.
23. Jass JR. Hyperplastic polyps of the colorectum-innocent or guilty? *Dis Colon Rectum*. 2001;44(2):163-6. Epub 2001/03/03. PubMed PMID: 11227930.
24. Campos FG, Figueiredo MN, Martinez CA. Colorectal cancer risk in hamartomatous polyposis syndromes. *World J Gastrointest Surg*. 2015;7(3):25-32. Epub 2015/04/08. doi: 10.4240/wjgs.v7.i3.25. PubMed PMID: 25848489; PubMed Central PMCID: PMCPMC4381153.
25. Samadder NJ, Jasperson K, Burt RW. Hereditary and common familial colorectal cancer: evidence for colorectal screening. *Dig Dis Sci*. 2015;60(3):734-47. Epub 2014/12/17. doi: 10.1007/s10620-014-3465-z. PubMed PMID: 25501924.

26. Lynch HT, Lynch JF, Attard TA. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. *CMAJ*. 2009;181(5):273-80. Epub 2009/08/06. doi: 10.1503/cmaj.071574. PubMed PMID: 19654196; PubMed Central PMCID: PMCPMC2734205.
27. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):177-93. Epub 2017/03/02. doi: 10.3322/caac.21395. PubMed PMID: 28248415.
28. Zisman AL, Nickolov A, Brand RE, Gorchow A, Roy HK. Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Arch Intern Med*. 2006;166(6):629-34. Epub 2006/03/29. doi: 10.1001/archinte.166.6.629. PubMed PMID: 16567601.
29. Poschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol*. 2004;39(3):155-65. Epub 2004/04/15. PubMed PMID: 15082451.
30. Tsong WH, Koh WP, Yuan JM, Wang R, Sun CL, Yu MC. Cigarettes and alcohol in relation to colorectal cancer: the Singapore Chinese Health Study. *Br J Cancer*. 2007;96(5):821-7. Epub 2007/02/22. doi: 10.1038/sj.bjc.6603623. PubMed PMID: 17311023; PubMed Central PMCID: PMCPMC2360085.
31. Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M. Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut*. 2006;55(2):285-91. Epub 2005/10/22. doi: 10.1136/gut.2005.073163. PubMed PMID: 16239255; PubMed Central PMCID: PMCPMC1856517.
32. Larsson SC, Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(3):556-65. Epub 2007/09/08. PubMed PMID: 17823417.
33. Bardou M, Barkun AN, Martel M. Obesity and colorectal cancer. *Gut*. 2013;62(6):933-47. Epub 2013/03/14. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304701. PubMed PMID: 23481261.
34. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(10):919-32. Epub 2003/03/07. doi: 10.1056/NEJMra012242. PubMed PMID: 12621137.
35. Kanser Daire Başkanlığı, Kanser Taramaları Kısa Raporu 2014: Kanser Daire Başkanlığı. Available from: <http://kanser.gov.tr/index.php/kanser/kanser-taramalari/1444-kanser-taramalar1-kisa-rapor-2014>.
36. de la Chapelle A. Microsatellite instability. *N Engl J Med*. 2003;349(3):209-10. Epub 2003/07/18. doi: 10.1056/NEJMp038099. PubMed PMID: 12867603.
37. Lynch HT, Smyrk T, Watson P, Lanspa SJ, Boman BM, Lynch PM, et al. Hereditary colorectal cancer. *Semin Oncol*. 1991;18(4):337-66. Epub 1991/08/01. PubMed PMID: 1677781.

38. Ogino S, Noshio K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*. 2009;58(1):90-6. Epub 2008/10/04. doi: 10.1136/gut.2008.155473. PubMed PMID: 18832519; PubMed Central PMCID: PMCPMC2679586.
39. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006;38(7):787-93. Epub 2006/06/29. doi: 10.1038/ng1834. PubMed PMID: 16804544.
40. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(1 Pt 1):191-5. Epub 2004/01/22. PubMed PMID: 14734469.
41. Kawakami H, Zaanani A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2015;16(7):30. Epub 2015/06/03. doi: 10.1007/s11864-015-0348-2. PubMed PMID: 26031544; PubMed Central PMCID: PMCPMC4594190.
42. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):261-8. Epub 2004/02/19. PubMed PMID: 14970275; PubMed Central PMCID: PMCPMC2933058.
43. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med*. 2005;352(18):1851-60. Epub 2005/05/06. doi: 10.1056/NEJMoa043146. PubMed PMID: 15872200.
44. Almendro V, Marusyk A, Polyak K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2013;8:277-302. Epub 2012/10/25. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-163923. PubMed PMID: 23092187.
45. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008;112(13):4793-807. Epub 2008/12/10. doi: 10.1182/blood-2008-08-077941. PubMed PMID: 19064739.
46. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7. Epub 2012/07/20. doi: 10.1038/nature11252. PubMed PMID: 22810696; PubMed Central PMCID: PMCPMC3401966.
47. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58. Epub 2013/03/30. doi: 10.1126/science.1235122. PubMed PMID: 23539594; PubMed Central PMCID: PMCPMC3749880.
48. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*.

1994;367(6464):645-8. Epub 1994/02/17. doi: 10.1038/367645a0. PubMed PMID: 7509044.

49. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11. Epub 2001/11/02. doi: 10.1038/35102167. PubMed PMID: 11689955.

50. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PubMed PMID: 21376230.

51. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(12):988-93. Epub 2004/12/02. doi: 10.1038/nrc1507. PubMed PMID: 15573120.

52. Young J, Barker MA, Simms LA, Walsh MD, Biden KG, Buchanan D, et al. Evidence for BRAF mutation and variable levels of microsatellite instability in a syndrome of familial colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(3):254-63. Epub 2005/03/15. PubMed PMID: 15765445.

53. Haddock MG. Intraoperative radiation therapy for colon and rectal cancers: a clinical review. *Radiat Oncol*. 2017;12(1):11. Epub 2017/01/13. doi: 10.1186/s13014-016-0752-1. PubMed PMID: 28077144; PubMed Central PMCID: PMC5225643.

54. Higgins GA, Jr., Conn JH, Jordan PH, Jr., Humphrey EW, Roswit B, Keehn RJ. Preoperative radiotherapy for colorectal cancer. *Ann Surg*. 1975;181(5):624-31. Epub 1975/05/01. PubMed PMID: 805571; PubMed Central PMCID: PMC1345553.

55. Ciombor KK, Wu C, Goldberg RM. Recent therapeutic advances in the treatment of colorectal cancer. *Annu Rev Med*. 2015;66:83-95. Epub 2014/10/24. doi: 10.1146/annurev-med-051513-102539. PubMed PMID: 25341011.

56. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1296-310. Epub 2008/05/13. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.098. PubMed PMID: 18471507; PubMed Central PMCID: PMC2528832.

57. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014;25(18):2677-81. Epub 2014/09/13. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0916. PubMed PMID: 25213191; PubMed Central PMCID: PMC4161504.

58. Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2005;5(1):65-71. Epub 2005/02/22. PubMed PMID: 15720262.

59. Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(10):790-803. Epub 2010/10/05. doi: 10.1038/nrd3253. PubMed PMID: 20885410; PubMed Central PMCID: PMC3194401.

60. Bollag DM, McQueney PA, Zhu J, Hensens O, Koupal L, Liesch J, et al. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res*. 1995;55(11):2325-33. Epub 1995/06/01. PubMed PMID: 7757983.

61. Pazdur R, Lassere Y, Soh LT, Ajani JA, Bready B, Soo E, et al. Phase II trial of docetaxel (Taxotere) in metastatic colorectal carcinoma. *Ann Oncol.* 1994;5(5):468-70. Epub 1994/05/01. PubMed PMID: 7915537.
62. Einzig AI, Neuberg D, Wiernik PH, Grochow LB, Ramirez G, O'Dwyer PJ, et al. Phase II Trial of Paclitaxel in Patients with Advanced Colon Cancer Previously Untreated with Cytotoxic Chemotherapy: An Eastern Cooperative Oncology Group Trial (PA286). *Am J Ther.* 1996;3(11):750-4. Epub 1996/11/01. PubMed PMID: 11862233.
63. Blaney SM, Seibel NL, O'Brien M, Reaman GH, Berg SL, Adamson PC, et al. Phase I trial of docetaxel administered as a 1-hour infusion in children with refractory solid tumors: a collaborative pediatric branch, National Cancer Institute and Children's Cancer Group trial. *J Clin Oncol.* 1997;15(4):1538-43. Epub 1997/04/01. doi: 10.1200/JCO.1997.15.4.1538. PubMed PMID: 9193350.
64. Extra JM, Rousseau F, Bruno R, Clavel M, Le Bail N, Marty M. Phase I and pharmacokinetic study of Taxotere (RP 56976; NSC 628503) given as a short intravenous infusion. *Cancer Res.* 1993;53(5):1037-42. Epub 1993/03/01. PubMed PMID: 8094996.
65. Seibel NL, Blaney SM, O'Brien M, Krailo M, Hutchinson R, Mosher RB, et al. Phase I trial of docetaxel with filgrastim support in pediatric patients with refractory solid tumors: a collaborative Pediatric Oncology Branch, National Cancer Institute and Children's Cancer Group trial. *Clin Cancer Res.* 1999;5(4):733-7. Epub 1999/04/23. PubMed PMID: 10213206.
66. Taguchi T. [An early phase II clinical study of RP56976 (docetaxel) in patients with cancer of the gastrointestinal tract]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 1994;21(14):2431-7. Epub 1994/10/01. PubMed PMID: 7944488.
67. Willis JC, Lord GM. Immune biomarkers: the promises and pitfalls of personalized medicine. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(5):323-9. Epub 2015/03/31. doi: 10.1038/nri3820. PubMed PMID: 25814400.
68. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;5(6):463-6. Epub 2010/10/28. doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177. PubMed PMID: 20978388; PubMed Central PMCID: PMC3078627.
69. WHO International Programme on Chemical Safety. Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation: World Health Organization; 2001.
70. Jain KK. *The Handbook of Biomarkers: Humana Press; 2010.*
71. Akyol A. Kolorektal Kanserdeki Biyobelirteçler. *Güncel Gastroenteroloji* 2016;20(2).
72. Leandro-Garcia LJ, Leskela S, Landa I, Montero-Conde C, Lopez-Jimenez E, Leton R, et al. Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isoforms. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2010;67(4):214-23. Epub 2010/03/02. doi: 10.1002/cm.20436. PubMed PMID: 20191564.

73. Sullivan KF, Cleveland DW. Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(12):4327-31. Epub 1986/06/01. PubMed PMID: 3459176; PubMed Central PMCID: PMCPMC323725.
74. Sullivan KF. Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu Rev Cell Biol*. 1988;4:687-716. Epub 1988/01/01. doi: 10.1146/annurev.cb.04.110188.003351. PubMed PMID: 3058169.
75. Luduena RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol*. 1998;178:207-75. Epub 1997/12/31. PubMed PMID: 9348671.
76. Lewis SA, Gu W, Cowan NJ. Free intermingling of mammalian beta-tubulin isotypes among functionally distinct microtubules. *Cell*. 1987;49(4):539-48. Epub 1987/05/22. PubMed PMID: 3552250.
77. Tischfield MA, Baris HN, Wu C, Rudolph G, Van Maldergem L, He W, et al. Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell*. 2010;140(1):74-87. Epub 2010/01/16. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.011. PubMed PMID: 20074521; PubMed Central PMCID: PMCPMC3164117.
78. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(2):397-406. Epub 2013/12/07. doi: 10.1074/mcp.M113.035600. PubMed PMID: 24309898; PubMed Central PMCID: PMCPMC3916642.
79. Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mork SJ. Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J Child Neurol*. 2003;18(12):851-66; discussion 67. Epub 2004/01/23. doi: 10.1177/088307380301801205. PubMed PMID: 14736079.
80. Svendsen CN, Bhattacharyya A, Tai YT. Neurons from stem cells: preventing an identity crisis. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(11):831-4. Epub 2001/11/21. doi: 10.1038/35097581. PubMed PMID: 11715059.
81. Draberova E, Lukas Z, Ivanyi D, Viklicky V, Draber P. Expression of class III beta-tubulin in normal and neoplastic human tissues. *Histochem Cell Biol*. 1998;109(3):231-9. Epub 1998/04/16. PubMed PMID: 9541471.
82. Jouhilahti EM, Peltonen S, Peltonen J. Class III beta-tubulin is a component of the mitotic spindle in multiple cell types. *J Histochem Cytochem*. 2008;56(12):1113-9. Epub 2008/09/18. doi: 10.1369/jhc.2008.952002. PubMed PMID: 18796406; PubMed Central PMCID: PMCPMC2583904.
83. Koh Y, Jang B, Han SW, Kim TM, Oh DY, Lee SH, et al. Expression of class III beta-tubulin correlates with unfavorable survival outcome in patients with resected non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2010;5(3):320-5. Epub 2010/01/21. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181ce684f. PubMed PMID: 20087230.

84. Mariani M, Zannoni GF, Sioletic S, Sieber S, Martino C, Martinelli E, et al. Gender influences the class III and V beta-tubulin ability to predict poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(10):2964-75. Epub 2012/03/23. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2318. PubMed PMID: 22438565.
85. McCarroll JA, Sharbeen G, Liu J, Youkhana J, Goldstein D, McCarthy N, et al. betaIII-tubulin: a novel mediator of chemoresistance and metastases in pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2015;6(4):2235-49. Epub 2014/12/30. doi: 10.18632/oncotarget.2946. PubMed PMID: 25544769; PubMed Central PMCID: PMC4385848.
86. Choi JW, Kim Y, Lee JH, Kim YS. Expression of beta-tubulin isotypes in urothelial carcinoma of the bladder. *World J Urol.* 2014;32(2):347-52. Epub 2012/11/28. doi: 10.1007/s00345-012-0993-z. PubMed PMID: 23184177.
87. Shibazaki M, Maesawa C, Akasaka K, Kasai S, Yasuhira S, Kanno K, et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of betaIII-tubulin protein expression in relation with cell cycle-dependent regulation of tumor cells. *Int J Oncol.* 2012;40(3):695-702. Epub 2011/12/14. doi: 10.3892/ijo.2011.1291. PubMed PMID: 22159867.
88. Chen ZF, Paquette AJ, Anderson DJ. NR5F/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nat Genet.* 1998;20(2):136-42. Epub 1998/10/15. doi: 10.1038/2431. PubMed PMID: 9771705.
89. Raspaglio G, Filippetti F, Prislei S, Penci R, De Maria I, Cicchillitti L, et al. Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1alpha binding to its 3' flanking region. *Gene.* 2008;409(1-2):100-8. Epub 2008/01/08. doi: 10.1016/j.gene.2007.11.015. PubMed PMID: 18178340.
90. Bordji K, Grandval A, Cuhna-Alves L, Lechapt-Zalcman E, Bernaudin M. Hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha), but not HIF-1alpha, is essential for hypoxic induction of class III beta-tubulin expression in human glioblastoma cells. *FEBS J.* 2014;281(23):5220-36. Epub 2014/09/23. doi: 10.1111/febs.13062. PubMed PMID: 25244496.
91. Cochrane DR, Spoelstra NS, Howe EN, Nordeen SK, Richer JK. MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(5):1055-66. Epub 2009/05/14. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-1046. PubMed PMID: 19435871; PubMed Central PMCID: PMC4573391.
92. Leskela S, Leandro-Garcia LJ, Mendiola M, Barriuso J, Inglada-Perez L, Munoz I, et al. The miR-200 family controls beta-tubulin III expression and is associated with paclitaxel-based treatment response and progression-free survival in ovarian cancer patients. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18(1):85-95. Epub 2010/11/06. doi: 10.1677/ERC-10-0148. PubMed PMID: 21051560.
93. Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M, et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest.* 1997;100(5):1282-93. Epub 1997/09/01. doi:

10.1172/JCI119642. PubMed PMID: 9276747; PubMed Central PMCID: PMC508306.

94. Ranganathan S, Benetatos CA, Colarusso PJ, Dexter DW, Hudes GR. Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Br J Cancer*. 1998;77(4):562-6. Epub 1998/03/04. PubMed PMID: 9484812; PubMed Central PMCID: PMC2149944.

95. Gan PP, Pasquier E, Kavallaris M. Class III beta-tubulin mediates sensitivity to chemotherapeutic drugs in non small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2007;67(19):9356-63. Epub 2007/10/03. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0509. PubMed PMID: 17909044.

96. Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, Kim SJ, Miyoshi Y, Noguchi S, et al. Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer. *Int J Oncol*. 2006;28(2):375-81. Epub 2006/01/05. PubMed PMID: 16391792.

97. Chen Q, Lu P, Jones AV, Cross NC, Silver RT, Wang YL. Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn*. 2007;9(2):272-6. Epub 2007/03/27. doi: 10.2353/jmoldx.2007.060133. PubMed PMID: 17384221; PubMed Central PMCID: PMC1867436.

98. Percy MJ, McMullin MF. The V617F JAK2 mutation and the myeloproliferative disorders. *Hematol Oncol*. 2005;23(3-4):91-3. Epub 2005/11/15. doi: 10.1002/hon.761. PubMed PMID: 16285006.

99. Huang T, Zhuge J, Zhang WW. Sensitive detection of BRAF V600E mutation by Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR. *Biomark Res*. 2013;1(1):3. Epub 2013/11/21. doi: 10.1186/2050-7771-1-3. PubMed PMID: 24252159; PubMed Central PMCID: PMC3776245.

100. Tommasi S, Mangia A, Lacalamita R, Bellizzi A, Fedele V, Chiriatti A, et al. Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: the role of beta-tubulins. *Int J Cancer*. 2007;120(10):2078-85. Epub 2007/02/08. doi: 10.1002/ijc.22557. PubMed PMID: 17285590.

101. Yuan SF, Zhu LJ, Zheng WE, Chen H, Wu LL, Zhang W, et al. Expression of beta-tubulin III and survivin in advance stage breast cancer correlates with chemotherapeutic effects of docetaxel. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(1):361-5. Epub 2012/04/17. PubMed PMID: 22502701.

102. Hwang JE, Hong JY, Kim K, Kim SH, Choi WY, Kim MJ, et al. Class III beta-tubulin is a predictive marker for taxane-based chemotherapy in recurrent and metastatic gastric cancer. *BMC Cancer*. 2013;13:431. Epub 2013/09/24. doi: 10.1186/1471-2407-13-431. PubMed PMID: 24053422; PubMed Central PMCID: PMC4015872.

103. Ploussard G, Terry S, Maille P, Allory Y, Sirab N, Kheuang L, et al. Class III beta-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-

based chemotherapy. *Cancer Res.* 2010;70(22):9253-64. Epub 2010/11/04. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1447. PubMed PMID: 21045157; PubMed Central PMCID: PMC3290526.

104. Akasaka K, Maesawa C, Shibasaki M, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, et al. Loss of class III beta-tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2009;129(6):1516-26. Epub 2009/01/06. doi: 10.1038/jid.2008.406. PubMed PMID: 19122647.

105. Giarnieri E, De Francesco GP, Carico E, Midiri G, Amanti C, Giacomelli L, et al. Alpha- and beta-tubulin expression in rectal cancer development. *Anticancer Res.* 2005;25(5):3237-41. Epub 2005/08/17. PubMed PMID: 16101133.

106. Melling N, Tsaklakidis AM, Simon R, Stahl P, Bokemeyer C, Terracciano L, et al. β III-tubulin overexpression is linked to left-sided tumor localization and nuclear β -catenin expression in colorectal cancer. *Cancer Treatment Communications.* 2015;4:96-102. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ctrc.2015.06.004>.

107. Toth C, Sukosd F, Valicsek E, Herpel E, Schirmacher P, Renner M, et al. Expression of ERCC1, RRM1, TUBB3 in correlation with apoptosis repressor ARC, DNA mismatch repair proteins and p53 in liver metastasis of colorectal cancer. *Int J Mol Med.* 2017;40(5):1457-65. Epub 2017/09/28. doi: 10.3892/ijmm.2017.3136. PubMed PMID: 28949378; PubMed Central PMCID: PMC5627886.

108. Portyanko A, Kovalev P, Gorgun J, Cherstvoy E. beta(III)-tubulin at the invasive margin of colorectal cancer: possible link to invasion. *Virchows Arch.* 2009;454(5):541-8. Epub 2009/04/11. doi: 10.1007/s00428-009-0764-4. PubMed PMID: 19360438.

109. Zhao X, Yue C, Chen J, Tian C, Yang D, Xing L, et al. Class III beta-Tubulin in Colorectal Cancer: Tissue Distribution and Clinical Analysis of Chinese Patients. *Med Sci Monit.* 2016;22:3915-24. Epub 2016/10/25. PubMed PMID: 27771732; PubMed Central PMCID: PMC5088737.

110. Seve P, Mackey J, Isaac S, Tredan O, Souquet PJ, Perol M, et al. Class III beta-tubulin expression in tumor cells predicts response and outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving paclitaxel. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(12):2001-7. Epub 2005/12/24. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0244. PubMed PMID: 16373715.

111. Lu M, Gao J, Wang XC, Shen L. Expressions of Thymidylate Synthase, Thymidine Phosphorylase, Class III beta-tubulin, and Excision Repair Cross-complementing Group I predict Response in Advanced Gastric Cancer Patients Receiving Capecitabine Plus Paclitaxel or Cisplatin. *Chin J Cancer Res.* 2011;23(4):288-94. Epub 2013/01/30. doi: 10.1007/s11670-011-0288-8. PubMed PMID: 23358102; PubMed Central PMCID: PMC3551314.

112. Yang YL, Luo XP, Xian L. The prognostic role of the class III beta-tubulin in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients receiving the taxane/vinorebine-based chemotherapy: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(4):e93997. Epub 2014/04/08. doi:


10.1371/journal.pone.0093997. PubMed PMID: 24705847; PubMed Central PMCID: PMC3976369.



EKLER

Çalışma için alınan etik izin belgesi, canlılık tayini ham absorbans ölçümleri, qRT-PCR deneylerine ait Tm ve amplifikasyon eğrileri ekte gösterilmiştir. Ayrıca kullanılan hücre hattının özellikleri ve kullanılan mevcut makine teçhizat listesi ekte verilmiştir.

Ek 1: Çalışma İçin Alınan Etik İzin Belgesi



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 226
Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 07 ŞUBAT 2017 SALI
Toplantı No : 2017/04
Proje No : GO 16/720 (Değerlendirme Tarihi: 24.11.2016)
Karar No : GO 16/720- 03

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Aytekin AKYOL' un sorumlu araştırmacı olduğu ve Blm. Uzm. Sıdika ÖZTOP' un doktora tezi olan, GO 16/720 kayıt numaralı, **"Kolonorektal Kanselerde Yeni Biyobelirteçlerin Tanımlanması"** başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan)	10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Üye)	11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)	12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)	İZİNLI (Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye)	13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)
İZİNLI (Üye)	14. Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)	İZİNLI (Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)	15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye)
8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye)
9. Prof. Dr. Mintaz Kerem GÜNEL (Üye)	17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGELEN (Üye)
	İZİNLI (Üye)
	18. Av. Meltem ONURLU (Üye)

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için: _____

Ek 2: Kullanılan Hücre Hattının Özellikleri

HCT116 (DSMZ)

Cell line: HCT116

DSMZ no.: ACC 581

Species: human (*Homo sapiens*)

Cell type: colon carcinoma

Origin: established from the primary colon carcinoma of an adult man; cells were described in the literature to carry a RAS mutation in codon 13 and to be tumorigenic in nude mice

Reference(s): Brattain, M. G., Brattain, D. E., Sarrif, A. M., McRae, L. J., Fine, W. D., Hawkins, J. G. (1982). Enhancement of growth of human colon tumor cell lines by feeder layers of murine fibroblasts. *Journal of the National Cancer Institute* 69 (4): 767-771. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6956756>

Biosafety level: 1

Ek 3: Kullanılan Makine-Teçhizat Listesi

Kullanılan Makine – Teçhizat Listesi	
Adı/Modeli	Kullanım Amacı
Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi, Protein Simple marka FluorChem FC3 model	Agaroz jel ve western blot membranlarının görüntülenmesinde kullanılmıştır.
Spektrofotometre, Nanodrop ND-2000 Spektrofotometre	DNA ve RNA kalite-kontrol tayini için kullanılmıştır.
Masaüstü Soğutmalı Santrifüj, HETTICH Marka ROTINA 380 R Model Masaüstü Soğutmalı Santrifüj	RNA ve protein izolasyonu için kullanılmıştır.
Class II Mikrobiyolojik Emniyet Kabini ("Laminar Flow"), BIOBASE BSC-1300 II A2-X model	Hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
PCR (Thermal cycler) Cihazı, Bioer GenePro thermal cycler with B-96G (gradient)	PCR çalışmaları için kullanılmıştır.
Mini Western Blot Seti, BioRad Mini PROTEAN Tetra Cell	Western blot için kullanılmıştır.
Otomatik Pipet Seti ve Pipetleme Yardımcısı, Gilson Pipetman neo	Tüm deneylerde ölçülü örnek aktarımı için kullanılmıştır.
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı, Finetech SHPM-10 model	İHK ve tampon hazırlamak için kullanılmıştır.
Masa Tipi PH Metre, Hanna HI 221 PH metre	Tamponların hazırlanmasında kullanılmıştır.
Karbondiyoksitli inkübatör, VISION BIONEX Marka VS 9000 Model Karbondiyoksitli İnkübatör	Hücre kültürü için kullanılmıştır.
Görüntüleme Sistemli Stereo Zoom Mikroskop, Leica S6D	Hücre kültüründe hücreleri görüntülemek için kullanılmıştır.
Çekerocak, Uniterm Marka	İHK çalışmalarında kullanılmıştır.
Hassas Terazi, Kern ABS 220-4M	Katı kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.
Su banyosu, JSR JSWB-11T	Hücre kültürü ve RNA izolasyonu için kullanılmıştır.
Etüv (İnkübatör), JSR JSGI-30T inkübatör	İHK için kullanılmıştır.
Kaba Terazi, Kern PLE 3100-2N	Katı malzemelerin tartılmasında kullanılmıştır.
Yatay Elektroferez Sistemleri, Scie-Plas VG-SYS Yatay Elektroferez sistemleri	Agaroz Elektroforezi için kullanılmıştır.
Vakum Pompası, ROCKER 300 Vacuum Pump	Hücre kültüründe aspirasyon için kullanılmıştır.
Spektrafuge cihazı, Labnet-C1301-230V	Örneklerin kısa süre santrifüjlenmesinde kullanılmıştır.
Masaüstü santrifüj, Orto Alresa Microcen 22	DNA izolasyonu ve hücre kültürü için kullanılmıştır.
Isı bloğu, BIOSAN- TDB-120 Dry block thermostat	Western blot için kullanılmıştır.
qRT-PCR, Agilent Stratagene Mx3005P	qRT-PCR için kullanılmıştır.
Güç kaynağı, BIO-RAD PowerPac Basic	Elektroferez ve western blot için güç kaynağı olarak kullanılmıştır.
Vorteks, DRAGONLAB MX-F	Çeşitli malzemelerin vortekslenmesinde kullanılmıştır.
Yatay çalkalayıcı, Grant-bio Mini-Rocker Shaker, PMR-30	Western blot için kullanılmıştır.
S1 arıtma sistemi, MILLIPORE Water Purification System, ZRQSV030	ddH ₂ O elde etmek için kullanılmıştır.
96 kuyulu plaka okuyucu, SpectraMax Plus 384 Microplate Reader	Hücre kültürü için kullanılmıştır. Bu ölçüm Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji anabilim dalı laboratuvarında yapılmıştır.

Doku takibi cihazı, Thermo Scientific Excelsior ES Tissue Processor	Doku takibi için kullanılmıştır. Bu işlem Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji anabilim dalı laboratuvarında yapılmıştır.
Otomatize İHK cihazı, Leica Bond Max Fully automated IHC & ISH Stainer	Otomatize sistemde İHK için kullanılmıştır. Bu işlem Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji anabilim dalı laboratuvarında yapılmıştır.
Manuel doku mikrodizin cihazı, Advanced Tissue Arrayer (ATA100), CTR Scientific	Doku mikrodizini yapılırken kullanılmıştır.
Manuel doku mikrodizin aracı, UNITMA Recipient Block Mold Kit (Quick Mold)	Doku mikrodizini yapılırken kullanılmıştır.



Ek 4: Canlılık Tayini Sonuçlarının Ham Absorbans Değerleri

450 nm											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-0,147	-0,1105	-0,1022	-0,0991	-0,099	-0,0921	-0,0993	-0,0988	-0,098	-0,0937	-0,1074	-0,1478
-0,1177	-0,0098	0,9614	1,1356	0,7961	1,2315	0,9069	1,1028	1,2159	1,3108	0,9479	-0,0894
-0,0962	-0,0089	1,0592	1,119	1,3579	1,3277	1,2805	1,3938	1,1607	1,4409	1,2577	-0,0853
-0,0855	0,0044	3,3741	1,3074	1,4084	1,2311	1,36	1,2763	1,4742	1,4907	1,3691	-0,0744
-0,0757	0,0131	-0,0424	-0,043	-0,0415	-0,0407	-0,0375	-0,0396	-0,0418	-0,0413	-0,0431	-0,0609
-0,0944	-0,0032	-0,0675	-0,0635	-0,065	-0,0652	-0,0609	-0,0632	-0,0621	-0,0613	-0,067	-0,0815
-0,1339	0,0044	-0,0588	-0,0731	-0,0719	-0,0673	-0,0713	-0,0696	-0,0721	-0,0709	-0,0505	-0,096
-0,1396	-0,1431	-0,1235	-0,1159	-0,1106	-0,1087	-0,1077	-0,1065	-0,1069	-0,1097	-0,1194	-0,1475
600 nm											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-0,03227	-0,02687	-0,02637	-0,02517	-0,02537	-0,02467	-0,02497	-0,02567	-0,02577	-0,02587	-0,02767	-0,03317
-0,02567	-0,01397	-0,01157	-0,00957	-0,01157	-0,00787	-0,00587	-0,00687	-0,00477	-0,00437	-0,00477	-0,02157
-0,01397	-0,00397	0,003033	0,003533	0,003333	0,005533	0,005833	0,003333	0,003633	0,007833	0,000233	-0,01197
-0,00157	0,008033	0,086133	0,010633	0,012833	0,012633	0,013433	0,014133	0,016533	0,016033	0,015333	-0,00067
0,003433	0,013133	0,005933	0,005733	0,005333	0,006233	0,006633	0,006233	0,006433	0,006733	0,007133	0,006933
-0,00737	0,002933	-0,00527	-0,00567	-0,00527	-0,00517	-0,00507	-0,00617	-0,00477	-0,00417	-0,00447	-0,00497
-0,02367	-0,00617	0,000433	-0,01617	-0,01517	-0,01427	-0,01467	-0,01487	-0,01527	-0,01437	-0,01207	-0,01587
-0,02387	-0,03247	-0,01987	-0,02287	-0,02137	-0,02097	-0,02147	-0,02127	-0,02127	-0,02197	-0,02287	-0,03167
siRNA transfeksiyonundan 24 saat sonrasına ait ham WST1 ölçüm değerleri											

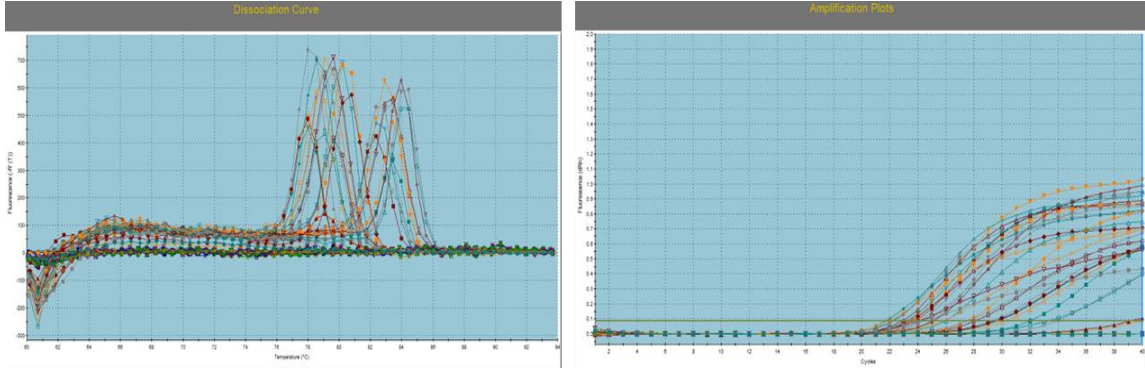
450nm											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-0,17093	-0,15043	-0,13403	-0,11263	-0,10913	-0,12873	-0,12083	-0,10933	-0,13033	-0,14323	-0,16843	-0,18033
-0,15533	-0,01093	2,329767	2,338767	2,316867	2,290267	1,121167	2,604967	2,554767	2,335067	2,344067	-0,13393
-0,10703	0,007267	2,811067	2,629367	2,673667	2,647667	2,696567	2,648067	2,615467	2,739867	2,703967	-0,05083
-0,09373	0,003667	2,673267	2,912467	2,903267	2,790967	2,759967	2,923867	2,878867	2,943967	2,834567	-0,06783
-0,08793	-0,01703	0,056067	0,007867	0,072267	0,044567	0,045367	0,087967	0,106367	0,080667	0,068067	-0,05823
-0,10273	-0,03393	-0,03183	-0,04233	0,006067	0,019967	-0,03243	0,026967	0,018167	0,081867	-0,04363	-0,09113
-0,12573	-0,06873	-0,06193	-0,05613	-0,05713	-0,05633	-0,05973	-0,06233	-0,03933	-0,04463	-0,06103	-0,13843
-0,17223	-0,12713	-0,15073	-0,13893	-0,13893	-0,13453	-0,12103	-0,03893	-0,13113	-0,14063	-0,15743	-0,18293
600nm											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,390433	0,178033	-0,05787	-0,03587	-0,03367	-0,04987	-0,04657	-0,03317	-0,05087	-0,06297	-0,06937	0,032433
-0,06687	-0,00947	-0,00667	0,019933	0,034633	0,012633	0,016833	0,056533	0,030533	0,000033	-0,00357	0,314133
0,151933	0,001933	0,071433	0,063933	0,114933	0,104533	0,081733	0,126033	0,098233	0,090133	0,010433	0,233133
0,129733	0,007533	0,078333	0,121933	0,134433	0,122133	0,112033	0,090233	0,173633	0,121133	0,078733	0,236933
0,271933	0,496133	0,382133	0,460633	0,346033	0,338133	0,345833	0,384433	0,406633	0,365633	0,305933	0,313333
0,377133	0,448733	0,401733	0,231333	0,058433	0,068033	0,018233	0,073933	0,088233	0,200333	0,164233	0,156233
0,170233	0,051533	0,096133	0,087033	0,057933	0,065533	0,080633	0,079933	0,103833	0,130033	0,154433	0,231233
0,198933	-0,01677	-0,03347	-0,01007	0,009733	-0,00797	0,008533	0,047433	0,017433	-0,00477	0,030633	0,056933
siRNA transfeksiyonundan 48 saat sonrasında ait ham WST1 ölçüm değerleri											

450 nm											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-0,26397	-0,26777	-0,28167	-0,28177	-0,27567	-0,27697	-0,27887	-0,27827	-0,27987	-0,28307	-0,28067	-0,26187
-0,26627	-0,13457	1,507133	1,600733	2,108333	1,764533	1,739333	1,963433	1,504133	1,827633	1,651333	-0,25797
-0,25857	-0,12807	2,422333	2,536133	2,655433	2,464233	2,593533	2,610633	2,756133	2,889333	2,636133	-0,22087
-0,25057	0,006733	2,351333	2,646033	3,055233	2,720233	3,261233	3,141333	3,187933	2,615233	2,794233	-0,16657
0,098433	0,126933	1,207433	1,205933	1,252533	0,983233	1,578933	1,956933	1,896233	2,333333	1,800633	-0,19587
-0,25667	0,129333	1,557733	3,333633	1,900733	1,680833	1,726033	1,780233	2,064333	1,760633	2,660633	-0,22447
-0,25517	-0,00037	2,328133	2,408533	2,174033	2,341133	2,637033	2,337133	2,268633	1,837833	2,524933	-0,25287
-0,25457	-0,25657	0,328533	1,162633	1,125633	1,785133	1,972833	1,206333	1,848733	1,670933	0,763033	-0,26147
600 nm											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,18705	0,14865	-0,15695	-0,15505	-0,14955	-0,15055	-0,15125	-0,15125	-0,15355	-0,15115	-0,14995	0,07705
0,25165	-0,13405	-0,12005	-0,12395	-0,12015	-0,12555	-0,12615	-0,12495	-0,03905	-0,03915	-0,12675	0,30045
0,19225	-0,12245	-0,01775	-0,00825	-0,10935	-0,10755	-0,10935	-0,11215	-0,04515	-0,10775	-0,10685	0,24685
0,14645	0,00835	0,03745	0,07075	-0,02895	-0,03565	-0,06765	-0,10125	-0,09735	-0,10575	-0,08665	0,20775
0,37605	0,12435	0,05415	0,10935	0,00355	0,03675	-0,01345	-0,07875	-0,08835	-0,09275	-0,09415	0,19295
0,15915	0,13285	0,07695	0,13285	-0,01645	0,05245	0,03445	-0,03155	-0,10905	-0,11265	-0,10365	0,15535
0,07255	-0,00905	0,02045	0,03255	-0,03155	0,07425	0,08195	0,07925	0,09385	-0,05165	-0,11095	0,21835
0,01665	0,17365	-0,12705	-0,12525	-0,11825	0,02045	0,09615	0,12935	0,07295	-0,07035	-0,13775	0,16755
siRNA+Paklitaksel (2,5 nM ve 5 nM) sonrasında ait ham WST1 ölçüm değerleri											

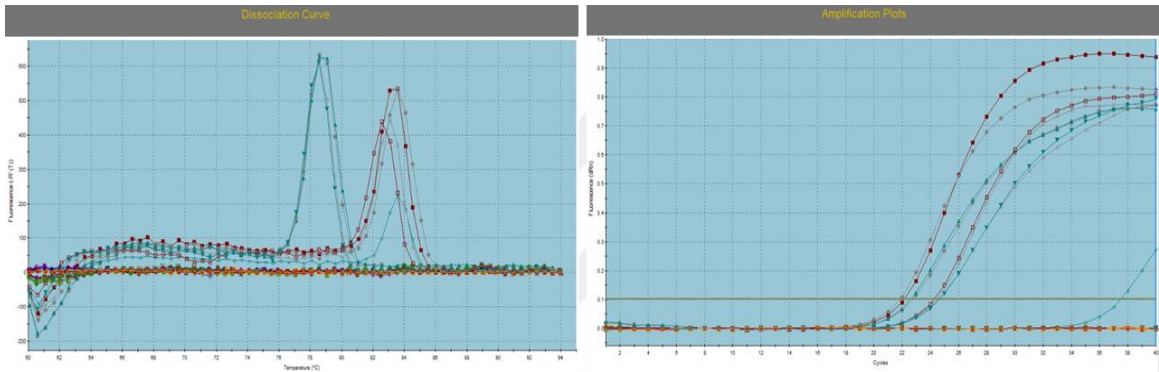
450 nm											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-0,19363	-0,18463	-0,19723	-0,19783	-0,19673	-0,19503	-0,19423	-0,19083	-0,19323	-0,19743	-0,19923	-0,17403
-0,17283	-0,01633	1,474767	1,312367	1,380167	1,271567	1,002367	1,500767	1,615967	1,601767	1,136267	-0,18063
-0,15793	0,030667	2,115867	2,262367	2,494867	1,857267	2,790067	2,029667	1,793667	2,375367	2,493667	-0,16263
-0,14703	0,001867	2,092467	2,288767	2,400967	2,281867	2,211867	2,447367	2,716267	3,068467	2,584367	-0,14863
-0,11063	0,012267	0,877367	1,155467	0,870467	0,755567	0,791667	1,436267	0,903967	0,780367	0,819567	-0,13453
-0,15873	0,002467	1,025067	0,993467	0,826567	0,935467	0,906867	1,216067	1,356367	0,476467	1,030367	-0,17273
-0,17943	-0,03093	0,975967	1,203067	1,275567	0,940067	0,954967	0,757367	0,794567	0,923067	1,088967	-0,18233
-0,18773	-0,18653	0,932467	1,316867	1,154367	1,345367	1,280767	1,409667	1,528367	1,785767	0,112367	-0,18263
600 nm											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,037367	0,068667	-0,07153	-0,07083	-0,07073	-0,06943	-0,06903	-0,06783	-0,06833	-0,07173	-0,07813	0,338767
0,261767	-0,00903	-0,01203	0,002367	-0,01173	-0,01013	-0,01913	-0,01293	-0,00803	-0,00123	0,004867	0,317367
0,312767	0,008167	0,008567	0,007067	0,003567	-0,00403	-0,00353	0,009967	0,012467	0,015567	0,015867	0,229667
0,164967	0,008567	0,022867	0,017567	0,019767	0,013067	0,010167	0,018867	0,019867	0,037267	0,029567	0,165767
0,131567	0,013767	0,022567	0,031267	0,018467	0,020367	0,030867	0,031067	0,026967	0,046467	0,043267	0,278967
0,346767	0,008567	0,017867	0,026367	-0,00183	0,001567	0,016267	0,017467	0,024367	0,560867	0,018067	0,056367
0,031867	-0,03003	-0,00443	0,002967	0,004367	-0,01123	0,005667	0,006667	0,008467	0,005567	0,004167	0,229767
0,303367	0,055067	-0,04223	-0,03993	-0,04123	-0,03713	-0,03603	-0,04263	-0,04673	-0,03903	-0,05463	0,166167
siRNA+Paklitaksel (10 nM ve 20 nM) sonrasına ait ham WST1 ölçüm değerleri											

450 nm											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-0,27265	-0,28465	-0,26485	-0,27915	-0,26625	-0,26405	-0,27885	-0,27205	-0,27675	-0,28365	-0,27695	-0,28125
-0,26695	-0,16625	0,10035	0,24875	0,20825	0,14685	0,20355	0,19595	0,26925	0,08485	0,01305	-0,28045
-0,23675	-0,05535	0,27735	0,28385	0,27475	0,18325	0,22285	0,20215	0,30855	0,32185	0,41385	-0,24805
-0,24215	0,05695	0,30945	0,30535	0,40285	0,24205	0,35625	0,49185	0,38265	0,29635	0,60445	-0,25305
-0,21645	0,16465	3,30005	2,75545	2,04505	3,47685	3,06315	3,36225	3,03765	3,65735	3,55885	-0,21665
-0,24515	0,04935	0,09235	0,09885	0,01935	0,02955	0,03905	0,07885	-0,03175	-0,01615	0,03265	-0,24125
-0,25745	-0,15465	0,02225	0,09115	0,08305	0,01535	0,08915	0,08075	0,04865	0,00375	-0,22615	-0,25615
-0,26385	-0,27355	-0,27585	-0,27435	-0,23475	-0,21935	-0,18475	-0,27145	-0,28195	-0,28865	-0,28705	-0,27195
600 nm											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0,135375	-0,11273	0,238175	-0,15303	0,129975	0,176175	-0,17093	-0,02213	-0,15283	-0,17673	0,144275	-0,01533
0,378075	-0,15703	-0,03423	0,063575	0,020275	0,028075	0,091875	0,084275	0,045375	-0,05263	-0,14623	-0,00403
0,271375	-0,05293	0,072875	0,053775	0,136875	0,041075	0,071375	0,069775	0,081375	0,076275	0,056175	0,206275
0,272175	0,062075	0,098775	0,117775	0,146275	0,037675	0,102375	0,121775	0,112275	0,065975	0,086675	-0,11553
0,355475	0,147875	0,138275	0,068575	0,140575	0,092675	0,121675	0,100275	0,075275	0,120675	0,123775	-0,07953
0,255275	0,228675	0,267675	0,385575	0,181575	0,145575	0,238675	0,327675	0,061975	0,261875	0,111075	0,205975
0,314575	-0,02833	0,208375	0,218775	0,182475	0,124175	0,241575	0,181175	0,175275	0,104075	-0,01813	0,172275
0,123475	-0,11023	-0,15113	-0,15633	-0,13553	-0,11863	-0,08183	-0,16763	-0,17513	-0,17833	-0,17833	0,019375
siRNA+Paklitaksel (50 nM) sonrasına ait ham WST1 ölçüm değerleri											

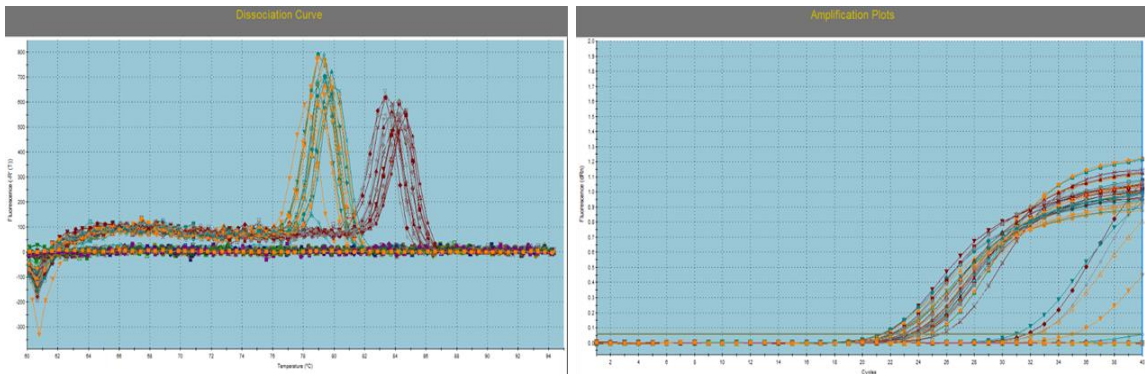
Ek 5: qRT-PCR Analizlerine Ait Tm ve Amplifikasyon Eğrileri



Taze dokular ile yapılan qRT-PCR analizi Tm ve Amplifikasyon eğrileri



Transfeksiyon öncesi HCT116 hücreleri ile yapılan qRT-PCR analizi Tm ve Amplifikasyon eğrileri



Transfeksiyon öncesi HCT116 hücreleri ile yapılan qRT-PCR analizi Tm ve Amplifikasyon eğrileri

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sıdıka Öztop

Doğum Yeri: İstanbul

Doğum Tarihi: 15.06.1987

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: İngilizce, Rusça (başlangıç seviyesinde)

Eğitim Durumu

Lise: Şanlıurfa Anadolu Lisesi (2001-2005)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji (2006-2011)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji (2011-2013)

Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyoinformatik (2016-)

Yayınlar ve Bildiriler

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler

Sıdıka ÖZTOP, Aynur IŞIK, Güneş GÜNER TAŞ, Erkan YILMAZ, Aytekin AKYOL, Class III Beta-Tubulin Expression in Colorectal Cancer Development, 1st International Congress On Cancer & Ion Channels, 2017

Ulusal Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler

Aytekin AKYOL, Meral ÜNER, Aynur IŞIK, Sıdıka ÖZTOP, Gökhan GEDİKOĞLU, Cenk SÖKMENSÜER, DNA Hatalı Eşleşme Tamir Mekanizması Bozukluğu İçeren Kolorektal

Kanserlerin Dörtlü İmmünohistokimyasal Panel İle Değerlendirilmesi, 25. Ulusal Patoloji Kongresi, 2015

İş Tecrübesi

Kurumu: TUBİTAK 113S985 “Kolorektal Kanserlerin Moleküler Alt Tiplendirilmesi Ve Yeni Genetik Belirteçlerin Tanımlanması”

Görevi: Proje Bursiyeri **Yılları:** 2014-2017

Kurumu: Ankara Üniversitesi BAP 13L3330005 “Kolorektal Kanserli Hastalarda Kök Hücre Gen Ekspresyon Profili Ve Prognostik Önemi”

Görevi: Araştırmacı **Yılları:** 2012-2013



TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Oztop S, Isik A, Guner G, Gurdal H, Karabulut E, Yilmaz E, et al. Class III beta-tubulin Expression in Colorectal Neoplasms Is a Potential Predictive Biomarker for Paclitaxel Response. *Anticancer Res.* 2019;39(2):655-62. Epub 2019/02/04. doi: 10.21873/anticancerres.13160. PubMed PMID: 30711942.

