

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SPORADİK KOLOREKTAL KANSER İLE İLİŞKİLENDİRİLMİŞ ADAY TEKLİ
NÜKLEOTİT POLİMORFİZMLERİNİN TÜRK POPÜLASYONU İÇİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

ZÜLAL BİLİCİ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. HİLAL ÖZDAĞ

AĞUSTOS

2017

ETİK BEYAN

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

Zülat Bilici

ONAY

Prof. Dr. Hilal Özdağ danışmanlığında Zülal Bilici tarafından hazırlanan bu çalışma 08.08.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. HİLAL ÖZDAĞ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Hatice MERGEN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala Gür DEDEOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Sporadik Kolorektal Kanser İle İlişkilendirilmiş Aday Tekli Nükleotit Polimorfizmlerinin
Türk Popülasyonu İçin Değerlendirilmesi

Zülal Bilici

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Hilal Özdağ

Kanser, günümüzde tüm dünya ve Türkiye çapında yaygın olarak görülen, çeşitli genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile ortaya çıkan ve ölüme sebep olan bir hastalıktır. Kolorektal kanserin (KRK) görülme sıklığı Türkiye genelinde üçüncü, erkeklerde üçüncü ve kadınlarda ise ikinci sırada yer almaktadır. Kolorektal kanser içerisinde ise sporadik kolorektal kanser %70-80 oranına sahiptir.

Genom boyu asosiyasyon çalışmaları (GBAÇ), kompleks hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynayan genetik bileşenlerin belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında, Avrupa popülasyonlarında geniş örneklem üzerinde yürütülmüş GBAÇ'larda KRK ile yüksek istatistiksel güç ve anlamlılık ile ilişkilendirilmiş olan TNP'lerin (Tekli Nükleotit Polimorfizmleri) Türk popülasyonunda da sporadik KRK ile ilişkili olup olmadığının ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda olduğu belirlenen 9 TNP 1019 sporadik kolorektal kanser hastası ve 948 kontrolden oluşan örneklem için Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) teknolojisi ile değerlendirilmiştir.

Tez çalışması sonucunda, 7 TNP (rs1321311, rs4939827, rs16892766, rs3802842, rs10795668, rs4444235 ve rs961253) Türk toplumu için sırası ile 2×10^{-4} , 7×10^{-3} , 1×10^{-4} , 4×10^{-3} , $1,79 \times 10^{-4}$, $1,62 \times 10^{-4}$, 8×10^{-4} p değerleri ile anlamlı bulunmuştur. Bu tez çalışması ile Avrupa popülasyonlarında sporadik kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş TNP'lerin bir kısmının Türk toplumu için valide olduğu ilk kez gösterilmiştir.

2017, 86 sayfa

Anahtar kelimeler: Sporadik kolorektal kanser, tekli nükleotit polimorfizmi, Genom boyu asosiyasyon çalışması, GWAS, TNP,

ABSTRACT

Msc Thesis

Evaluation of Candidate SNPs Associated with Sporadic Colorectal Cancer for Turkish Population

Zülal Bilici

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Hilal Özdağ

Cancer, a disease caused by the effects of various genetic, epigenetic and environmental factors, is widespread all over the world and Turkey today. Colorectal cancer (CRC) is the third most seen cancer in Turkey. It is the third most seen cancer in males and second in females. 70-80% of CRC cases are known to be sporadic.

Genome wide association studies are used to identify genetic components that play a role in the emergence of complex diseases. Nine SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) are selected among SNPs previously shown to be associated with CRC with high statistical significance in European population. The association between CRC and these 9 SNPs were analysed on 1019 sporadic colorectal cancer patients and 948 controls from Turkish population.

As a result of the thesis study, 7 SNPs (rs1321311, rs4939827, rs16892766, rs3802842, rs10795668, rs4444235 ve rs961253) were found to be associated with CRC ($p=2 \times 10^{-4}$, 7×10^{-3} , 1×10^{-4} , 4×10^{-3} , $1,79 \times 10^{-4}$, $1,62 \times 10^{-4}$, 8×10^{-4} , respectively) for Turkish population. In this study SNPs associated with sporadic CRC in European population have been validated for the Turkish population for the first time.

2017, 86 pages

Keywords: Sporadic colorectal cancer, SNP, GWAS

TEŞEKKÜR

Uzun ve zorlu bir çalışma süreci sonucunda yüksek lisans eğitimimi Prof. Dr. Hilal Özdağ danışmanlığında bitirmiş bulunmaktayım. Yüksek lisans tezimi bitirmemde her türlü bilimsel, maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen ve bu tezi yapma olanağını bana veren, sürekli yanımda olan değerli danışman hocama bana kattığı bilimsel ve akademik hayatımla ilgili herşey için çok teşekkür ederim.

Jürimde yer alarak tezimi değerlendiren ve değerli katkılarda bulunan Prof. Dr. Hatice Mergen ve Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamızı maddi olarak destekleyen Türk Onkoloji Grubu Derneği'ne projemize olan büyük katkıları için teşekkür ederim.

Örneklerin toplanmasındaki emekleri için Prof. Dr. Ayhan Kuzu ve diğer merkezlerdeki hocalarıma, istatistiksel analizleri gerçekleştiren Doç. Dr. Özlem İlk Dağ'a teşekkür ederim.

Deneyle ve analizler sırasında her türlü yardımda bulunup gerek laboratuvarında gerek uzaktan iletişim ve erişim halinde olan, manevi desteğini esirgemeyen ve sürekli olarak motive eden Atilla Göknur ve kullandığım cihazların taşınması ve kurulmasındaki yardımlarından dolayı Alihan Aktaş'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans hayatım boyunca, her türlü desteğini esirgmeden sürekli yanımda olan, şuan da Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesinde görev yapmakta olan Yrd. Doç. Dr. Aynur Karadağ hocama bana kattığı bilimsel ve manevi herşey için çok teşekkür ederim.

Genombilim grubundaki çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Emre Akpınar, Dr. M. Reza Dastouri, Blm. Uzm. Seda Taşır Yılmaz'a bana kattıkları herşey için çok teşekkür ederim. Değerli Biyoteknoloji ailesi ve çalışma arkadaşlarıma bana olan destekleri için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve bütün eğitim hayatım boyunca hep yanımda olan beni her türlü maddi ve manevi destekleyen sevgili aileme, kıymetli babam ve annem İsmail Bilici ve Sevgi Bilici, ablam Elif Akyol ve ablam Hilal Bilici'ye en derin duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	2
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. KANSER.....	4
2.2. KANSERİN MOLEKÜLER TEMELLERİ.....	6
2.3. KOLOREKTAL KANSER.....	9
2.4. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ.....	11
2.4.1. KROMOZOM İNSTABİLİTE YOLAĞI:.....	12
2.4.2. MİKROSATELLİT İNSTABİLİTE YOLAĞI:.....	12
2.4.3. CpG ADASI METİLATÖR FENOTİPİ YOLAĞI;.....	13
2.5. KALITIM ŞEKLİNE GÖRE KOLOREKTAL KANSER.....	14
2.5.1. AİLESEL KOLOREKTAL KANSER:.....	15
2.5.2. HEREDİTER NONPOLİPOZİZ KOLOREKTAL KANSER (HNPCC, LYNCH SENDROMU). 16	
2.5.3. SPORADİK KOLOREKTAL KANSER.....	16

2.6. TEKLİ NÜKLEOTİT POLİMORFİZMLERİ	18
2.6.1. TEKLİ NÜKLEOTİT POLİMORFİZMLERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN TEKNİKLER	19
2.6.2. REKABETÇİ ALLEL SPESİFİK PCR (KOMPETİTİVE ALLEL SPESİFİK PCR, KASP).....	19
2.7. BAĞLANTI ANALİZİ.....	21
2.8. GENOM BOYU ASOSİYASYON ÇALIŞMALARI.....	22
2.8.1. SPORADİK KOLOREKTAL KANSER VE GENOM BOYU ASOSİYASYON ÇALIŞMALARI .	23
<u>3. GEREKÇE VE AMAC</u>	<u>28</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>31</u>
4.1. MATERYAL	31
4.2. HASTA KONTROL GRUBUNUN OLUŞTURULMASI	31
4.3. YÖNTEM.....	34
4.3.1. KANDAN DNA İZOLASYONU	34
4.3.2. DNA NİCELİK VE NİTELİK ANALİZİ	35
4.3.3. REKABETÇİ ALEL SPEDİFİK PCR (KOMPETATIVE ALLEL SPECİFİK PCR, KASP)	35
4.3.4. KASP Verilerinin İstatistiksel Analizi	37
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>39</u>
5.1. DNA MİKTAR, KALİTE VE BÜTÜNLÜK ANALİZLERİ.....	39
5.2. KASP ANALİZLERİ	39
5.3. HAM VERİLERİN ANALİZİ	42
5.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	43
5.4.1. Asosiyasyon Analizi	43
<u>6. TARTIŞMA VE SONUC</u>	<u>45</u>

<u>7. KAYNAKLAR.....</u>	<u>61</u>
<u>8. EKLER.....</u>	<u>65</u>
<u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>69</u>
<u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>71</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2-1. Kanserin özellikleri (8)	4
Şekil 2-2. Türkiye kanser istatistikleri (10).....	6
Şekil 2-3. Kanser yolağında rol alan gatekeeper ve catetaker genleri yolakları(12).....	7
Şekil 2-4. Kolorektal kanser gelişimi ve genetik değişimler (9)	10
Şekil 2-5. Kromozom instabilite yolağı (19).....	12
Şekil 2-6. Mikrosatellit instabilite yolağı (19).....	13
Şekil 2-7. CIMP yolağı (19)	14
Şekil 2-8. APC geni mutasyonları	15
Şekil 2-9. Kolorektal kanserin alt tipleri (28).....	16
Şekil 2-10. Kolorektal kansere neden olan lokuslar (30)	18
Şekil 2-11. KASP primer ve FRET kaseti temsili görünüm	20
Şekil 2-12. KASP reaksiyonu	21
Şekil 2-13. KASP genotiplendirme temsili görüntüsü	21
Şekil 4-1. Örneklerin toplandığı merkezlerin temsili görüntüsü (38)	31
Şekil 4-2. Hydrocyler, 384 kuyulu plaka, repeater dispenser	36
Şekil 4-3. K-Seal cihazı	36
Şekil 4-4. Floresan okumaların yapıldığı Omega cihazı	37
Şekil 4-5. KlusterCaller programı ara yüzü ve temsilen seçilen rs4939827 görüntüsü	37
Şekil 5-1. KlusterCaller programı temsilen seçilen rs4939827 analiz görüntüsü	42
Şekil 5-2. Analiz sonuçlarının .csv formatındaki görünümü	42

Şekil 6-1. rs1321311 G>T değişiminin genel görüntüsü.....	49
Şekil 6-2. rs4939827 değişiminin genel görüntüsü	49
Şekil 6-3. rs16892766 A>C değişimi 8q23.3 genel görünümü	51
Şekil 6-4. rs3802842 A>C değişimi 11q23.1 genel görünümü	52
Şekil 6-5. rs10795668 A>G değişimi 10p14 genel görünümü	54
Şekil 6-6. rs4444235 T>C 14q22.2 değişimi genel görünümü.....	56
Şekil 6-7. rs961253 A>C 20p12.3 değişimi genel görünümü	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2-1. Sporadik kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş TNP'ler (38)	24
Çizelge 4-1. Toplanan hasta ve kontrol sayısının bölgelere göre dağılımı (38)	32
Çizelge 4-2. Tez çalışmasında kullanılan hasta-kontrol örneklerinin yaş ve cinsiyet dağılımı (38)	32
Çizelge 4-3. Hastalardan toplanan klinik veriler (38)	33
Çizelge 4-4. KASP reaksiyonu PCR koşulları	36
Çizelge 4-5. Hasta-Kontrol çalışmalarında genotip dağılımı (38)	38
Çizelge 5-1. DNA örneklerinin maksimum minimum değerleri	39
Çizelge 5-2. 1967 Örnek ve 9 TNP KASP Deneyleri Genel Görünümü.....	40
Çizelge 5-3. Avrupa'da yapılan genom boyu asosiyasyon çalışmaları sonucu KRK ilişkili TNP'ler	40
Çizelge 5-4. Tez çalışmasında analiz edilen TNP listesi	41
Çizelge 5-5. Türkiye geneli istatistiki olarak anlamlı bulunan TNP listesi	43
Çizelge 5-6. Doğum yeri bilgilerine göre Türkiye'nin 7 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan TNP'lerin listesi.....	44
Çizelge 5-7. İkamet bölgesine göre Türkiye'nin 7 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı çıkan TNP listesi.....	44
Çizelge 6-1. Tez çalışmasında analiz edilen ve anlamlı bulunan TNP'ler	46
Çizelge 6-2. Tezde analiz edilen TNP'lerin literatür taraması.....	47
Çizelge 6-3. rs1321311 polimorfizminin literatür taraması	48
Çizelge 6-4. rs4939827 polimorfizminin literatür taraması	50

Çizelge 6-5. rs16892766 polimorfizminin literatür taraması	51
Çizelge 6-6. rs3802842 polimorfizminin literatür taraması	53
Çizelge 6-7. rs10795668 polimorfizminin literatür taraması	55
Çizelge 6-8. rs4444235 polimorfizminin literatür taraması	56
Çizelge 6-9. rs961253 polimorfizminin literatür taraması	57

SİMGELER DİZİNİ

A ^o	Angstrom
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
Bp	Baz çifti
BRAF	B-Raf proto-onkogen
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CIMP	CpG adacık metilasyon fenotipi
CIMP-L	CpG adacık metilasyon fenotipi-düşük
CIMP-H	CpG adacık metilasyon fenotipi-yüksek
CIN	Kromozom İnstabilitesi
DNA	Deoksiribonükleik asit
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
eQTL	Expression quantitatif trait locus
FAP	Familial adenomatous polyposis
FRET	Floresans resonant enerji transferi
gr	Gram
GWAS	Genom boyu asosiyasyon çalışması
HAPMAP	Uluslararası Haplotip Haritalama Projesi
HNPCC	Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanser
KASP	Kompetitiv allel spesifik amplifikasyon

Kb	Kilobaz
KRK	Kolorektal kanser
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LD	Bağlantı eğitsizliği “linkage disequilibrium”
LncRNA	Uzun kodlanmayan RNAlar
Mb	Milyon baz
mRNA	Mesajcı RNA
ml	Mililitre
MSI	Mikrosatellit instabil
MSI-H	Mikrosatellit stabil-yüksek
MSI-L	Mikrosatellit stabil-düşük
MMR	Yanlığ anlam tamir mekanizması
MSS	Mikrosatellit stabil
MLH	mutL homolog
μ l	Mikrolitre
nm	Nanometre
Ng	Nanogram
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	Fosfotidil inositol-3 kinaz
RNA	Ribonükleik asit
Rpm	Relatif santrifüj hızı

Rcf	Relatif santrifüj kuvveti
Sn	Saniye
TNP	Tekli nükleotit polimorfizm
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
TGF	Transforming büyüme faktörü β
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WNT	Wnt/ β -katenin Yolağı

1. GİRİŞ

Sağlıklı bir organizmada, hücre döngüsü ve hücre ölümü bir denge halindedir. Bu dengeyi sağlayan çeşitli genler bulunmaktadır. Bu genlerde çevresel veya genetik faktörler etkisiyle meydana gelen mutasyonlar hücrelerdeki söz konusu dengenin bozulmasına ve kanserin ortaya çıkmasına neden olur. Kanser, hücrelerin kontrolsüzce bölündüğü, ölümsüzleştiği ve çevresindeki dokulara yayılabildiği multifaktöriyel bir hastalıktır.

Genlerde meydana gelen mutasyonlar DNA tamir mekanizmaları ile onarılmazsa geri dönüşümü yoktur. Mutasyonlar sonucunda hücre daha hızlı ve kontrolsüzce bölünür ve böylece karsinogenez başlar. Bu süreç kanserleşmiş hücrelerin yayılmasıyla devam eder.

Kanser dünya çapında ölüme sebep olan hastalıklar arasında büyük bir yer kaplamaktadır. En yaygın olarak görülen kanser türleri; akciğer, akciğer karaciğer, mide, kolorektal, meme ve özofagal kanserlerdir. Yüzden fazla kanser türü arasında kolorektal kanser (KRK), Türkiye’de ölümcül hastalıklar içinde üçüncü, erkeklerde üçüncü, kadınlarda ise ikinci sırada görülmektedir.

Kolorektal kanserin yaklaşık %70’e yakını sporadik, %20-25’ini ailesel ve %5’lik bir kısmını ise kalıtsal türleri oluşturmaktadır. KRK, çeşitli dış faktörler ve genetik faktörler sebebi ile ortaya çıkmaktadır. Dış faktörler arasında, doymamış yağlar, kırmızı et, aşırı alkol tüketimi ve hareketsizlik gösterilebilir (1). KRK genellikle 50 yaş üzeri bireylerde görülmesine karşın özellikle kalıtsal formlarda daha genç yaşta bireylerde de görülebilmektedir (2).

Sporadik kolorektal kanser, bireyin genetik bilgisinden veya lokal kolon çevresinden etkilenen somatik genetik hastalıktır. Eşey hattı mutasyonlarından ve ailesel kanser hikayesinden bağımsız olarak kolorektumdan gelişen bir kanser türüdür (3).

Genom boyu asosiyasyon (ilişkilendirme) çalışmaları (GBAÇ, Genome Wide Association Studies, GWAS), çeşitli hastalıklarla ilgili farklı insanlardaki belirteçleri bütün genomda tarayan bir yaklaşımdır. Genom boyunca her insanda farklılık gösteren nükleotit varyasyonları vardır. GWAS günümüzde yaygın olarak kullanılan genom ebadında araştırmalar yapan, çeşitli hastalıklara yatkınlıkları ortaya çıkaran bir yöntemdir (4).

İnsanlar arasında en yaygın görülen genetik farklılık tekli nükleotid polimorfizmleridir (TNP). Genom boyunca görülen tek nükleotid farklılığına Tekli Nükleotid Polimorfizmi (TNP) denilmektedir. Genellikle 200-300 nükleotitte bir görülmektedir. TNP'ler biyolojik belirteçler olarak çeşitli hastalıklarla ilgili genlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bazı TNP'ler arasında bulunan genetik bağlantı dolayısıyla birlikte kalıtılırlar. Birlikte kalıtıldığı bilinen TNP'ler analiz sırasında önemli ölçüde kolaylık sağlamaktadır.

Bireyler arasında farklılık gösterdiği gibi popülasyonlar arasında da TNP'ler farklılık göstermektedir. Popülasyonlar arasında görülen bu farklılıklardan dolayı çeşitli popülasyonlarda tanımlanmış olan TNP'ler farklı coğrafik bölgelerde yaşayan topluluklar için de valide edilmelidir (5,6).

Kolorektal kanser diğer kanserlerde olduğu gibi geniş çapta bir genetik heterojenitenin etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Kolorektal kanserin çeşitleri arasında da sebep olan genetik unsurlara göre farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, kalıtsal kolorektal kanser tek bir genin mutasyonu ile ortaya çıkarken sporadik kolorektal kanser birden fazla gendeki mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. KRK'e neden olan gen lokusları genom boyu asosiyasyon çalışmaları ile belirlenmiştir.

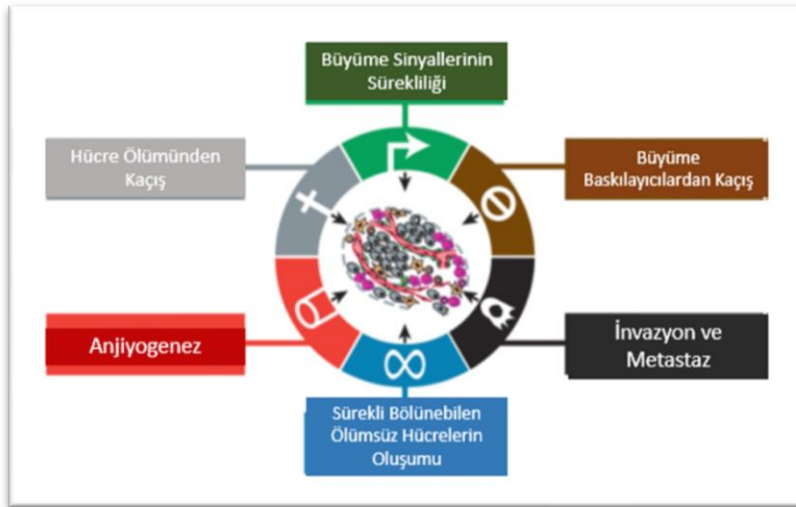
Tez çalışmasında Avrupa'da binlerce hasta kontrol örnekleri üzerinde yapılmış yüksek istatistiksel anlamlılık ile kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş genlerden 9 tane TNP seçilmiş ve Türk popülasyonu için anlamlı olup olmadığı analiz edilmiştir. Tez çalışmasının sonuçlarından elde edilen veriler ile Türk popülasyonu için sporadik kolorektal kanser risk faktörleri ile genetik yatkınlığa neden olan genler belirlenmiş olacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KANSER

Sağlıklı bir organizmada, hücre döngüsü ve hücre ölümü bir denge halindedir. Bu dengeyi sağlayan çeşitli genler bulunmaktadır. Bu genlerde çevresel veya genetik faktörler etkisiyle meydana gelen mutasyonlar hücrelerdeki söz konusu dengenin bozulmasına ve kanserin ortaya çıkmasına neden olur. Kanser genomda meydana gelen değişimlerle hücrelerin kontrolsüzce bölündüğü, ölümsüzleştiği ve çevresindeki dokulara yayılabildiği multifaktöriyel bir hastalıktır (7).

Genlerde meydana gelen mutasyonlar DNA tamir mekanizmaları ile onarılmazsa geri dönüşümü yoktur. Genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda hücre daha hızlı ve kontrolsüzce bölünür ve böylece karsinogenez başlar. Karsinogenez, normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşüp çoğalarak tümör kitleleri oluşturma sürecidir. Bu süreç kanserleşmiş hücrelerin yayılmasıyla devam eder (Şekil 2-1).



Şekil 2-1. Kanser özellikleri (8)

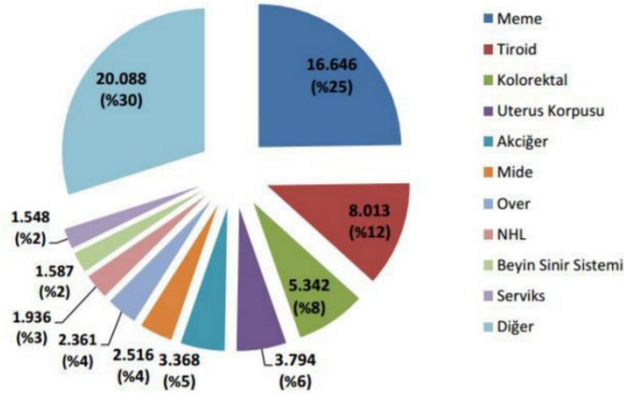
Zaman içerisinde biriken mutasyonlar ile iyi huylu (benign) lezyonlar kötü huylu (malignant) karakter kazanarak tümör oluştururlar. Meydana gelen ilk mutasyon (gatekeeping) normal epitel hücrelere seçici büyüme avantajı sağlayarak çevresindeki hücreler ile büyümesine izin verir ve mikroskopik klonlar oluştururlar (9).

Kanser genetik, epigenetik ve çevresel faktörler sebebi ile ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal olarak anne ve babanın eşey hattı hücrelerinde mutasyona uğramış olan alellerin aktarılması ile kanser ortaya çıkabileceği gibi bireyin genlerinde meydana gelen somatik mutasyonlar ile de kanser ortaya çıkabilmektedir. Genlerin mutasyona uğraması, epigenetik değişimlerle susturulması veya aktive edilmesi ile karsinogenez başlar. Yaşam şekli, beslenme alışkanlıkları, sigara kullanımı, UV ışınları, çeşitli kimyasal ve nükleer etkenlere maruz kalma durumları da kansere etki eder.

Kanserde meydana gelen ve seçici büyüme avantajı sağlayan ilk mutasyonlara driver (sürücü) mutasyonlar denir. Şimdiye kadar keşfedilmiş olan 138 driver gen bulunmaktadır. Bu genler 12 yolakta rol almaktadır. Bir tümör hücresinde 2-8 driver gen mutasyonu bulunmaktadır. Driver gen mutasyonu ile tümör hücreleri yeni hücre oluşumu ve hücre ölümü arasındaki %0,4'lük fark ile seçici büyüme avantajı kazanır. Bu fark küçük olmasına rağmen yıllar geçtikçe büyük hücre kitleleri oluşumuna neden olur. Aynı zamanda neoplastik süreçte etkisi olmayan mutasyonlar da meydana gelebilir, bu mutasyonlara passenger (yolcu) mutasyon denilmektedir (9).

Kanser dünya çapında ölüme sebep olan hastalıklar arasında büyük bir yer kaplamaktadır. Dünya'da her yıl 14 milyon kişiye kanser teşhisi koyulmakta ve 8 milyon kişi de kanser sebebiyle hayatlarını kaybetmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre en yaygın olarak görülen kanser türleri; akciğer, karaciğer, mide, kolorektal, meme ve özofagal kanserlerdir. Yüzden fazla kanser türü arasında kolorektal kanser (KRK), Türkiye'de ölümcül hastalıklar içinde üçüncü, erkeklerde üçüncü, kadınlarda ise ikinci sırada görülmektedir.

Sağlık Bakanlığının 2017 yılında yayınladığı verilere göre, Türkiye'de erkeklerde yaklaşık 97 bin, kadınlarda ise 67 bin kişiye olmak üzere yılda toplam 163 bin, kanser teşhisi koyulmaktadır. Ülkemizde her gün 450 kişide yeni kanser vakası görülmektedir. Ülkemizde erkeklerde en yaygın olarak görülen kanserler akciğer, prostat, kolorektal ve mesane kanserleridir. Kadınlar da ise meme, tiroit, kolorektal ve uterus kanserlerine yaygın olarak rastlanmaktadır. Kanser sebepli ölüm istatistiklerine baktığımızda ise ülkemizde kanser kaynaklı ölüm oranı %2'dir (10) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2. Türkiye kanser istatistikleri (10)

2.2. KANSERİN MOLEKÜLER TEMELLERİ

Genetik bir hastalık olan kanserin ortaya çıkışından birçok gen ve bu genlerin rol aldığı yollar sorumludur. Üç tip genin mutasyonu ile karsinogenez başlar. Bunlar, onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve stabilite genleridir (11).

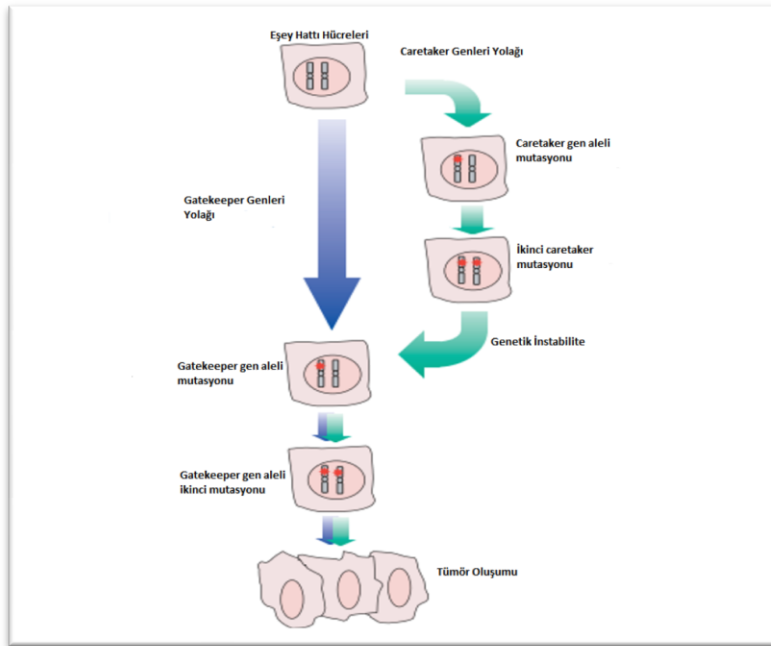
Onkogenler, normalde hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eden protoonkogenlerdir. Onkogenler, genin sürekli aktif olması veya yabancıl tip (wild type) genin aktif olmadığı durumlarda mutasyona uğrar ve aktifleşir. Meydana gelen mutasyonlar ile onkogen olarak davranırlar ve karsinogeneze neden olurlar. Onkogenlerin aktivasyonu, kromozomal translokasyonlar, gen amplifikasyonları veya intragenik mutasyonlar ile genin aktivasyonunu sağlayan kritik bölgelerde meydana gelen mutasyonlar ile gerçekleşir. Onkogenin bir alelinde meydana gelen aktive edici somatik mutasyon hücrenin seçici büyüme avantajı için yeterlidir (9,11).

Tümör baskılayıcı genler ise hücre büyümesini ve farklılaşmasını baskılayan genlerdir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar genin aktivitesini düşürerek fonksiyon kaybıyla karsinogeneze neden olur. Tümör baskılayıcı genlerin aktivitesi için önemli olan bölgelerde meydana gelen missense mutasyonlar ile delesyon veya insersiyonlardan dolayı yanlış sentezlenen kesik (truncated) proteinler veya epigenetik susturma meydana gelir (9,11).

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar, neoplastik süreçte tümör hücre sayısını artırarak, yeni hücre oluşumunu indükleyerek veya hücre ölümünü inhibe ederek, hücre döngüsünün durdurulmasını, hücrelerin apoptoza girmesini önleyerek karsinogenez için fizyolojik olarak aynı etkiyi yaratırlar.

Karsinogenezde rol alan bir diğerk gen grubu ise stabilite genleridir (caretaker) ve daha farklı yolaklar ile kanserin ortaya çıkmasına neden olurlar. DNA yanlış eşleşme tamir (DNA mismatch repair genes, MMR), nükleotit eksizyon onarımı (nucleotide excision repair, NER), baz eksizyon onarımı (base excision repair, BER) genlerindeki mutasyonlar DNA replikasyonunda veya mutajenlere maruz kalma durumlarında hata oluşur ve karsinogeneze neden olur. Mitotik rekombinasyon, kromozomal segregasyon gibi büyük kromozom kısımlarının rol aldığı süreçlerde de stabilite genleri rol alır (*BRCA1*, *BLM*, *ATM* genleri gibi). Stabilite genleri genetik değışimleri en düşük seviyede tutarlar. Bütün gelenler mutasyonlardan etkilenir fakat, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler hücre büyümesini ve seçici büyüme avantajını etkilerler. Fizyolojik olarak bir sonucun ortaya çıkması için tümör baskılayıcı genlerin ve stabilite genlerinin iki alelinin de inaktive olması gerekir (9,11).

Kanser yolağında rol alan tümör baskılayıcı genler ve onkogenlere “gatekeeper” ve “caretaker” genleri olarak isimlendirilen sınıflandırılmalar yapılmıştır (12) (Şekil 2-3).



Şekil 2-3. Kanser yolağında rol alan gatekeeper ve caretaker genleri yolakları(12)

Gatekeeper genleri; hücre büyümesini önleyerek, apoptoza girişı indükleyerek, son (terminal) farklılaşmaya uyararak doğrudan hücre büyümesini kontrol eder. Sporadik tümörlerde bu genlerin mutasyona uğrama olasılığı daha düşüktür. Kalıtsal tümörlerde ise eşey hattında maternal ve paternal alellerin ikisinin de mutasyona uğraması gerekir. İki

alelde de meydana gelen değişimler nokta mutasyonları, delesyonların neden olduğu heterozigotluğun kaybedilmesi (loss of heterozygosity, LOH), promoter bölgelerinin hipermetilasyonudur. Gatekeeper geninin tekrar fonksiyon kazanması ile tümör hücreleri normale döner (11-14).

Gatekeeper genlerinin doku spesifik olmasından dolayı belirli bir gatekeeper geninde meydana gelen değişim o dokudaki kanser yatkınlığını verir.

Gatekeeper genleri;

Adenomatosis polyposis coli (APC) geni; hücre adhezyonu, *Wnt* gibi sinyal yolakları ve mikrotübüllerle ilgili yolaklarda görevlidir. Bu gendeki mutasyonlar ailesel adenomatöz poliposiz (familial adenomatous polyposis coli, FAP) gelişiminde kolonda yüzlerce polip oluşmasına neden olur. Bu poliplerin kansere dönüşme olasılığı sporadiklerden daha düşük olmasına rağmen sayıca fazla oldukları için kanser riskini artırır. *APC* geni, kolon, tiroit, mide ve beyin kanserlerinde etkilidir.

Retinoblastoma 1 geni (Rb1); *E2F* transkripsiyon faktörü ile etkileşime girerek S fazı için gerekli genlerin aktivasyonunda görevlidir. *TP53* (tümör protein 53) ile birlikte tümör baskılayıcı yolakta rol alır. *TP53*'e bağlanarak degradasyonuna yol açan *MDM2* (Mouse double minute 2) proteinini inhibe eder. Böylece DNA hasarından dolayı apoptoza girmesi gereken hücreleri *TP53* apoptoza yönlendirir. Meme, küçük hücreli akciğer kanseri, osteosarkoma, glioblastoma ve mesane kanserleri gibi yolaklarda yer alır.

Tümör protein 53 (TP53) geni; hem gatekeeper hem de caretaker olarak sınıflandırılabilir. Apoptoza yönlendirmesiyle gatekeeper, genetik stabiliteyi sağlamasıyla caretaker özelliği gösterir. Yarı ömrünün kısa olması sebebiyle hücrede sürekli olarak düşük miktarda sentezlenir. DNA hasarı, inflamasyon, asidite, büyüme ve sağ kalım sinyallerinde azalma gibi stres durumlarında *MDM2*'nin *TP53*'e bağlanması inhibe edilir ve hücre döngüsü durdurularak veya hücre apoptoza yönlendirilerek hasar giderilir. Birçok kanser yolağında rol alır (11-14).

Caretaker genleri, genetik stabilitenin devamlılığını ve gatekeeper ve onkogenlerin mutasyona uğrama oranının azalmasını sağlamada görevlidir. Bu genlerin mutasyonu tümörigenezin hızlanmasına neden olur. Caretaker genlerin mutasyonu sporadik

tümörlerde eşey hattı mutasyonlarına göre daha düşüktür. Kalıtsal kanserlerde, mutasyona uğramış caretaker geninin bir alelini taşıyan bireylerde, normal caretaker gen mutasyonu ve gatekeeper geninin mutasyona uğramış iki aleli olmak üzere üç somatik mutasyon ile kanser ortaya çıkar. Bu bireyler normale göre 5-50 kat daha fazla kanser riski taşır. Bu yüzden, kanser oluşumunda caretaker gen mutasyonları tek başına yeterli ve gerekli değildir. Bu genlerin fonksiyonunu geri kazanması neoplastik sürecin geri gitmesine yeterli değildir, çünkü gatekeeper genlerinin de mutasyona uğraması ile kanser ortaya çıkmıştır.

Landscapeer tümör baskılayıcı genler, mutasyona uğramış tümör epitel hücrelerini değil de tümör mikro çevresindeki stromal hücrelerden ifade edilen genleri tanımlar. Bu genler, büyüme faktörleri, hayatta kalım faktörleri, hücre yüzeyi, adhezyon, hücre dışı matris proteinlerini düzenleyerek tümör mikro çevresini etkiler. Landscapeer genlerinin mutasyon ile fonksiyonlarını kaybetmeleri ile epitel hücrelerin yakınındaki hücrelerin neoplastik dönüşümüne neden olur.

Caretaker genleri;

Meme kanser genleri (BRCA) genleri; genetik stabiliteyi koruması ve apoptoza yönlendirmesi ile hem gatekeeper hem de caretaker özelliği gösterir. Hücre döngüsü kontrol noktalarında, sentrozom duplikasyonunda, T lenfositlerinin gelişimi gibi yollaklarda görevlidir. TP53 ile kanser hücrelerini apoptoza yönlendirirler. Meme kanseri gibi birçok kanser yollaklarında yer alırlar.

DNA tamir mekanizması genleri (DNA mismatch repair genes, MMR); DNA replikasyonu sırasında oluşan yanlış eşleşmeleri düzeltmede görevli genlerdir. İlk olarak herediter nonpolipzis kolorektal kanser (herediter non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)'de tanımlanmışlardır. Mikrosatellit dengesizliğine yol açarak kansere neden olurlar (9,11,13,14).

2.3. KOLOREKTAL KANSER

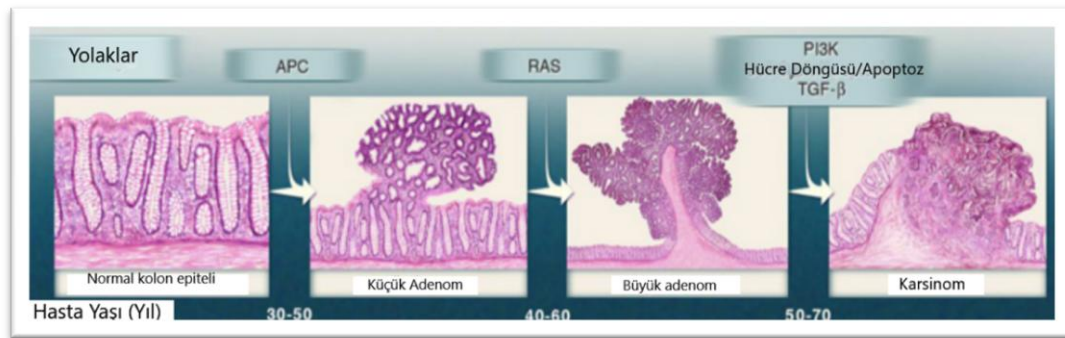
Kolorektal kanser (KRK) kolon ve rektumda meydana gelen, genelde ileri yaş gruplarında ortaya çıkan, ölüme sebep olan ve ölüm oranının çok yüksek olduğu bir kanser türüdür. Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organisation, WHO) verilerine göre kolorektal kanser, akciğer ve karaciğer kanserinden sonra en yüksek ölüm oranına sahiptir.

Sağlık Bakanlığının 2017 yılında yayınladığı kanser istatistiklerine göre kolorektal kanserin Türkiye’de görülme sıklığı erkeklerde ve kadınlarda üçüncü sıradadır.

Kolorektal kanserin ortaya çıkmasında kalıtsal veya somatik mutasyonlar şeklinde görülebilen genetik faktörlerin yanı sıra çeşitli beslenme ve yaşam tarzı gibi dış faktörler de etkilidir (1,3,15,16). Beslenme ve yaşam tarzında önemli olan nedenler doymamış yağlar, kırmızı et, aşırı alkol tüketimi ve hareketsizlik gösterilebilir (1). Kolon gibi kendini sürekli yenileyen dokulardaki tümörlerin mutasyonları direk olarak yaş ile ilgilidir. Mutasyonların birikimi ile kanser süreci ileri yaşlarda kendini gösterir (9). KKK genellikle 50 yaş üzeri bireylerde görülmesine karşın özellikle kalıtsal formlarda daha genç yaşta bireylerde de görülebilmektedir (2).

Gastrointestinal ve genito-üriner epitel dokuları sürekli yenilediği için buradaki mutasyonlar neoplastik süreç ile ilgili olmayan passenger mutasyonlar olarak adlandırılır (9). Örneğin, beyin ya da pankreas gibi dokularda daha az mutasyon görülür çünkü bu dokularda kendini yenileme potansiyeli daha düşüktür. Bu sebepten kolorektal kanserin ortaya çıkışında çok sayıda farklı mutasyon etkilidir. Kalıtsal olan ve kalıtsal olmayan türlerinin arasında ortaya çıkış nedenlerinde farklılıklar görülmektedir (1,9,16).

Kolorektal kanser genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda bağırsaktaki normal glandular epitel hücrelerin invaziv adenokarsinoma dönüşmesiyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu süreç normal epitel hücrelerin benign adenomlara dönüşmesi ve daha sonra invaziv karsinoma ve metastatik kansere dönüşmesi şeklinde işler (15) (Şekil 2-4).



Şekil 2-4. Kolorektal kanser gelişimi ve genetik değişimler (9)

Kolorektal kanserin kalıtsal ve sporadik olmak üzere iki ana tipi bulunmaktadır. Ailesel olarak kalıtılan kansere kalıtsal (hereditary) kolorektal kanser, aile hikayesi bulunmayan

türüne sporadik kolorektal kanser denilmektedir (2). KRK'lerin yaklaşık %15-30'unun kalıtsal olarak aktarıldığı, yaklaşık %80'inin sporadik olarak ortaya çıktığı görülmektedir (1).

2.4. KOLOREKTAL KANSERİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Kolorektal kanser genetik ve epigenetik değişimlerin zamanla birikimiyle ortaya çıkan çok basamaklı ve birçok genin etkili olduğu multigenik bir hastalıktır.

Diğer kanserlerde olduğu gibi kolorektal kanserde de onkogenlerin farklı veya artmış ifadesi ve tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarını kaybetmesi sonucu karsinogenez görülür (1). KRK'e neden olan genetik değişiklikler *APC*, *KRAS*, *p53*, *Wnt β-katenin*, DNA tamir mekanizmasında görevli genlerin mutasyonu, kromozom instabilitesi, mikrosatellit instabilitesi, CpG adalarını içeren promotor bölgelerin hipermetilasyonu ve global DNA metilasyonu gibi epigenetik değişikliklerdir (1,9,15). Kolorektal kansere neden olan genetik ve epigenetik değişimlerin genel kısa bir açıklaması aşağıda verilmiştir.

APC genindeki mutasyonlar ile kolorektal adenomalar ortaya çıkar. Daha sonra *KRAS* geni mutasyonlarının sinerjik etkisi ile kolorektal karsinoma süreci başlar. Meydana gelen diğer mutasyonlar ve özellikler tümör baskılayıcı genler *SMAD4* ve *TP53*'ün çevresinde meydana gelen alelik kayıplar ile malign süreç başlar. *TP53* genini içeren kromozom 17p kayıpları çoğunlukla benign kolorektal karsinomaların %75'inde görülür. Bu da *TP53*'ün kolorektal karsinomaların ortaya çıkışında değil gelişiminde etkili olduğunu gösterir (17).

Epigenetik değişimlerde ise genlerin promotor bölgelerindeki global DNA metilasyonu ya da hipometilasyonu genomik instabiliteye, genlerin ifadesinin artması veya azalmasına, genomik damgalamanın kaybolmasına neden olur (17).

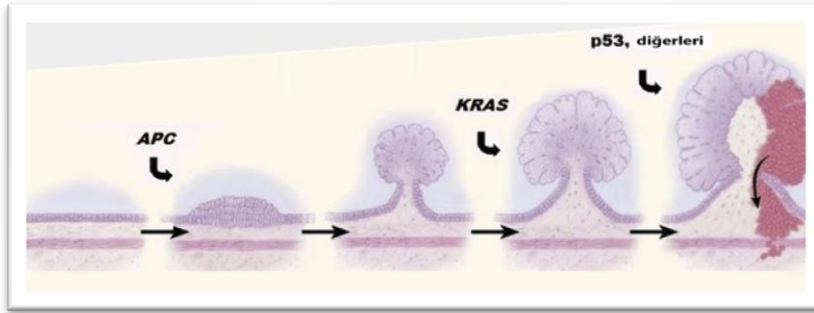
Genomik instabilite kolorektal kanserin en önemli sebeplerindendir. Kolorektal kanserde tanımlanmış 3 grup genetik ve epigenetik değişim bulunmaktadır. Bunlar; Kromozom İstabilitesi (CIN), Mikrosatellit İstabilitesi (MSI), CpG Adalarının Metilatör Fenotipi (CIMP) olarak sınıflandırılabilir (15).

2.4.1. Kromozom İnstabilite Yolağı:

Kromozom instabilitesi (Chromosomal Instability, CIN) kolorektal kanserde en yaygın görülen moleküler değişimdir. Tümörlerin yaklaşık %65-85'i CIN yolağı ile oluşmaktadır.

Kromozom sayısındaki değişimler ile anöplodik tümörler oluşur. Kromozom duplikasyonları, kromozom bölgelerinin veya tamamının kaybı şeklinde mutasyonlar meydana gelir.

APC, *KRAS*, *TP53*, *PI3K* gibi kritik genlerin mutasyonu ile kolorektal kanser ortaya çıkmaktadır (Şekil 2-5). CIN yolağında en yaygın olarak görülen mutasyon tümör baskılayıcı gen olan *APC* geni mutasyonudur, daha sonrasında ise *KRAS* mutasyonları görülmektedir. *APC* geni mutasyonu, organ gelişimi, hücre bölünmesi, morfoloji, motilite ve embriyonik kök hücrelerin kaderinin belirlenmesi gibi biyolojik yollarda görevli olan Wnt yolağındaki β -kateninin nukleusa translokasyonu ile tümörigenez ve invazyon genlerinin transkripsiyonuna yol açar. Hücre bölünmesinde görevli *MAPK* yolağındaki *KRAS* ve *PI3K* mutasyonları *MAP* kinazın sürekli aktivasyonu ile proliferasyonun artışına neden olur. Hücre döngüsünün kontrol noktalarında görevli *TP53*'ün fonksiyon kaybı mutasyonu ile kontrolsüz hücre bölünmesi gerçekleşir (18-21).



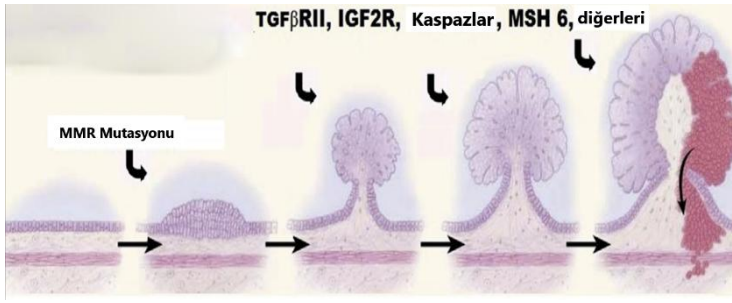
Şekil 2-5. Kromozom instabilite yolağı (19)

2.4.2. Mikrosatellit İnstabilite Yolağı:

DNA tamir mekanizmasının bozulması ile hücreler mutasyona daha açık olan genotipe sahip olurlar. Mikrosatellit instabilitesi (MSI) olan tümörlerde, hasar meydana gelmiş olan kısa DNA zincirleri veya 2-5 baz çifti uzunluğundaki art arda tekrarların tamiri azalır bu nedenle bu bölgelerde mutasyonlar birikmeye daha meyillidir. Kolorektal kanserin de spesifik nokta mutasyonlarından ziyade zaman içerisinde biriken birçok mutasyonun etkisi

ile ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu mutasyonlar kodlamayan veya kodlayan gen bölgelerini etkileyebilir.

DNA yanlış eşleşme tamir (MMR) genlerinin fonksiyon kaybı, promotor bölgelerinin hipermetile olması ile spontane olarak veya eşey hattı mutasyonları ile gerçekleşir. DNA tamir mekanizmasında görevli *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2* genleri MSI tümörlerde mutasyona uğramaktadır (Şekil 2-6). Kolorektal kanserin yaklaşık %15'i MMR genlerinde meydana gelen mutasyon kaynaklı olarak gelişmektedir. MSI tümörler Lynch sendromu gibi kalıtsal kolorektal kanser türlerinde görülmektedir. MSI tümörler genellikle sporadik tümörlere göre daha iyi prognoza sahiptir (18-23).



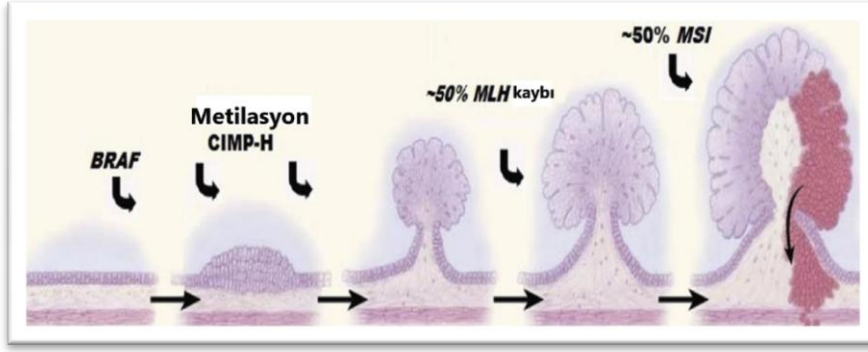
Şekil 2-6. Mikrosatellit instabilite yolağı (19)

2.4.3. CpG Adası Metilatör Fenotipi Yolağı;

CpG adaları bütün genlerin yarısından çoğunda bulunan CG-zengin DNA dizisine sahip bölgelerdir. CpG adaları neoplastik olmayan normal hücrelerde metile değildir. Metilasyona uğradığında ise bu genlerin susturulmasına neden olmaktadır.

Kolorektal kansere neden olan son yolak ise CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) yolağıdır (Şekil 2-7). Epigenetik dengesizlik CpG adalarının metilasyonuna neden olur. Onkogenlerin promotor bölgelerinin hipermetile olması ile protein sentezinin susturulması en yaygın görülen CIMP değişimidir.

Genetik ve epigenetik değişimler kolorektal kanserde birlikte etki gösterirler. Metilasyonlar, nokta mutasyonlarından daha fazla oranda KKK gelişiminde etkilidir. CIMP tümörlerde BRAF mutasyonu ve MSI tümörlerin görülmesi genetik ve epigenetik değişimlerin KKK gelişiminde birlikte etki gösterdiklerine örnektir (18-21).



Şekil 2-7. CIMP yolağı (19)

2.5. KALITIM ŞEKLİNE GÖRE KOLOREKTAL KANSER

Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir mekanizması genlerinde meydana gelen mutasyonlar ile ortaya çıkan kolorektal kanser genetik temellerine göre kalıtsal, ailesel ve sporadik olmak üzere üç ana gruba ayrılır.

Kalıtsal kolorektal kanser KRK vakalarının bütününün yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Kalıtsal kolorektal kanserlerde tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genlerinin bir aleli eşey hattında inaktive olur ve somatik ikinci bir mutasyon ile yabancı tip alelin ifadesi susturularak tümörigenez oluşumu başlar. Polipozis ve polipozis olmayan formlarda olabilir. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) kolonda birçok malignant polip oluşturur. Kalıtsal polipoz olmayan KRK (HNPCC) DNA tamir genlerinde meydana gelen mutasyonlar ile ortaya çıkar. FAP ve HNPCC dışında Gardner ve Turcot sendromları, Hamartamatöz polipoziz, Juvenil polipoziz, MYH ilişkili adenomatöz polipoziz sendromları nadir rastlanan kalıtsal kolorektal kanser türleridir.

Ailesel kolorektal kanser ise tüm vakaların %25'ini oluşturur. Ailesel olarak aktarılır ancak kalıtsal kolorektal kanser sınıflandırmasında yer almaz. En az birinci dereceden yakınında kolorektal kanser görülüyorsa ailesel olarak sınıflandırılır.

Sporadik kolorektal kanser tüm kolorektal kanser vakaların %70-80'ini oluşturur. Ailesel kanser öyküsü olmadan kendiliğinden gelişen tümörler ile sporadik kolorektal kanser ortaya çıkar. Yaşam boyunca biriken çeşitli nokta mutasyonlar karsinogenez başlar. İlk mutasyon bir tümör baskılayıcı gen olan APC geninde meydana gelerek adenoma olan polipleri oluşturur. Bu poliplerin %15'i yaklaşık 10 yıllık bir süreçte karsinomaya dönüşür.

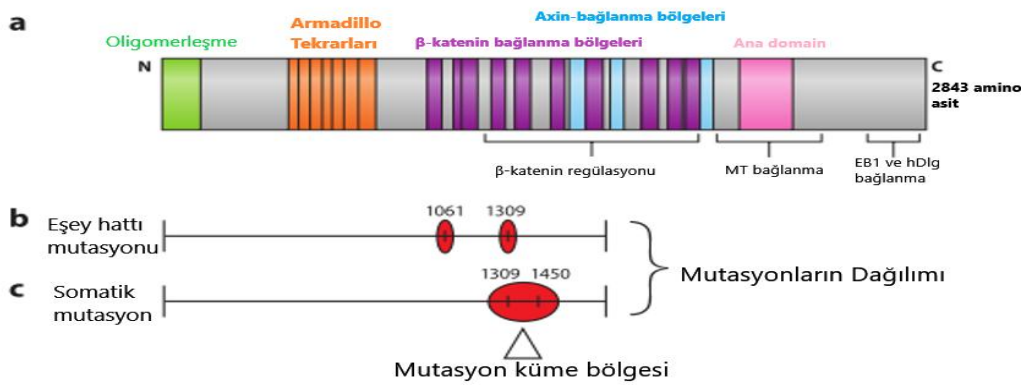
APC geni mutasyonlarını *KRAS*, *TP53* ve *PI3K* genlerinin mutasyonları takip eder (1,15,17,24).

Aşağıda kolorektal kanserin en çok rastlanan türleri olan ailesel adenomatöz polipoziz (FAP) ve kalıtsal polipoziz olmayan kolorektal kanser (HNPCC) ve sporadik kolorektal kanser açıklanmıştır.

2.5.1. Ailesel Kolorektal Kanseri:

Ailesel adenomatöz polipoziz (FAP) bütün kolorektal kanserler arasında %1'lik bir görülme oranına sahiptir. Otozomal dominant olarak kalıtılır. Bireylerde binlerce adenoma (polip) oluşumu erken yaşlarda gözlenmeye başlar. Eğer poliplerin tamamı alınmazsa malignan tümörlere dönüşürler. Malignan tümörlere dönüşme olasılığı %95 olduğundan, hastaların kolonoskopi muayenelerinin devamlı olarak yapılması gerekmektedir.

APC geninin eşey hattı mutasyonu ile FAP ortaya çıkar. *APC* geninde 700'den fazla mutasyon saptanmıştır (Şekil 2-8). Bu mutasyonlar nokta mutasyonları, çerçeve kayması, anlamsız mutasyonlar ile kesilmiş proteinlerin üretilmesi şeklinde oluşur. Wnt yolağında rol alan *APC* geninin mutasyonu, hücre büyümesi ve bölünmesinde etkili olan çeşitli onkogenler ve önemli genlerin sürekli olarak aktif olmasına neden olur. *APC* geni mutasyonu ile hücreler anormal şekilde büyüyerek adenomaları oluşturur. *APC* geni eşey hattında 1061 ve 1309. Kodonları mutasyona daha yatkındır ve FAP bireylerde sırasıyla %11 ve %17 oranında bu kodonların mutasyona uğradığı gösterilmiştir (1,25-27).

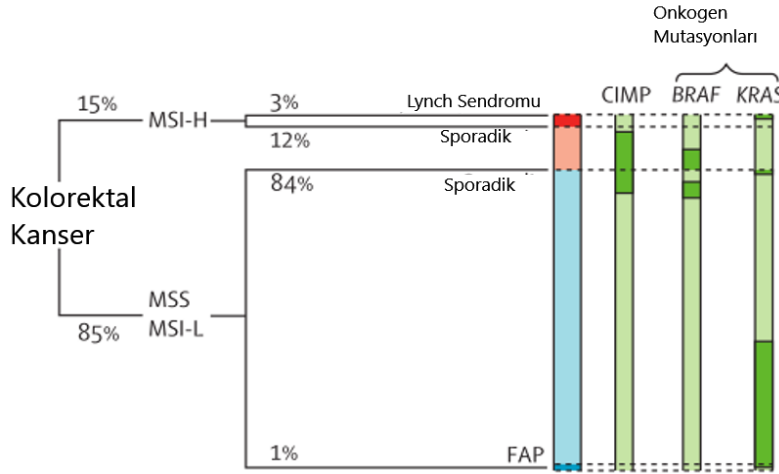


Şekil 2-8. APC geni mutasyonları

2.5.2. Herediter Nonpolipoziz Kolorektal Kanser (HNPCC, Lynch Sendromu)

HNPCC 1913 yılında, üç jenerasyonda da HNPCC görülmüş bir ailede yapılan çalışmalar ile tıbbi literatüre kalıtsal kanser olarak ilk kanser türlerindedir (1). Lynch sendromu tüm kolorektal kanser vakalarının %3-5'ini oluşturmaktadır (Şekil 2-9).

Lynch sendromu, DNA tamir mekanizması (MMR) genlerinde (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) meydana gelen mutasyonlar ile karakterizedir. Bu mutasyonlar mikrosatellit instabilitesine (MSI) neden olmaktadır. DNA tamir mekanizmasında rol alan genlerden herhangi birindeki bir mutasyona sahip olan bireyler %60-90 daha fazla kolorektal kanser riski taşımaktadır (1,17,28,29).



Şekil 2-9. Kolorektal kanserin alt tipleri (28)

2.5.3. Sporadik Kolorektal Kanser

Sporadik kolorektal kanser, eşey hattı mutasyonu taşımadan veya aile hikayesi olmadan ortaya çıkmaktadır. Kolorektal kanserin %70-80'ini oluşturur. Bireyin genetik altyapısından, bölgesel kolonik çevresinden ve çevresel etkiler ile ortaya çıkan somatik genetik bir hastalıktır. Sporadik kolorektal kanser bir ileri yaş hastalığı olmakla beraber 10-20 yıl içerisinde biriken mutasyonlar ile ortalama 60 yaş civarında kendini gösterir. İleri yaş gruplarında düzenli kolonoskopi muayenelerinin yapılması hastalığı önlemede, ilk evrelerde erken teşhis ve tedavide büyük öneme sahiptir. Kolorektal kanserde 138 driver gen tanımlanmıştır. Neoplastik süreçte 2-8 driver gen mutasyonu ve passenger mutasyonların birikmesi ile ortaya çıkan sporadik kolorektal kanserde her bireyin kansere sebep olan genetik altyapısı kendine has özellik taşır (3).

Kanser projenitör (öncül) hücrelerinin köken aldıkları parental hücrelerden farklı olarak genetik ve epigenetik değişimlerin birikmesi ile sporadik kolorektal kanser oluşmaya başlar. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı mutasyonu, onkogenlerin fonksiyon kazanması ile hücreler seçici büyüme avantajı kazanırlar.

Sporadik KRK mutasyonlara ve sayılarına göre iki ana gruba ayrılabilir. Hipermutant formu sporadik kolorektal kanserin %16'sını oluşturur. Bu formda her 10^6 bazda 12 baz mutasyona uğramakta ve tümörlerde ortalama 728 mutasyona görülmektedir. Hiper mutant olmayan grupta ise her 10^6 bazda 8,24 bazda mutasyona uğramakta ve tümörlerde ortalama 58 mutasyon görülmektedir (3).

Sporadik kolorektal tümörler en yaygın olarak CIN yolağı ile ortaya çıkar, daha sonra ise CIMP ve MSI yolaklarına ve DNA tamir mekanizmasında rol alan genlerin mutasyonlarına rastlanmaktadır. *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *POLE* (DNA polimeraz), *KRAS*, *TP53*, *PI3K*, *MYC*, *SMAD3*, *SMAD4* gibi genler de en yaygın mutasyona uğrayan genlerdir. Sporadik kolorektal kanserde meydana gelen mutasyonlar kromozom sayısındaki anormallikler, translokasyonlar, nokta mutasyonları, anlamsız mutasyonlar şeklinde görülür(3,30,31) (Şekil 2-10).

Sporadik KRK'de düşük penetranslı genler yüksek oranda görülmektedir. Düşük penetranslı genler çevresel ve beslenme kaynaklı etkiler ile kolorektal kansere yakalanma riskini artırmaktadır. Yapılan birçok genom boyu asosiyasyon çalışmaları ile sporadik kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş ilgili genlerin içinde veya yakınında lokalize olmuş birçok tekli nükleotit polimorfizmi (TNP) bulunmuştur. Popülasyon boyutunda yapılan bu çalışmalar sporadik KRK riski oluşturan genetik varyasyonları tanımlamaktadır (3,32).

2.6.1. Tekli Nükleotit Polimorfizmlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Teknikler

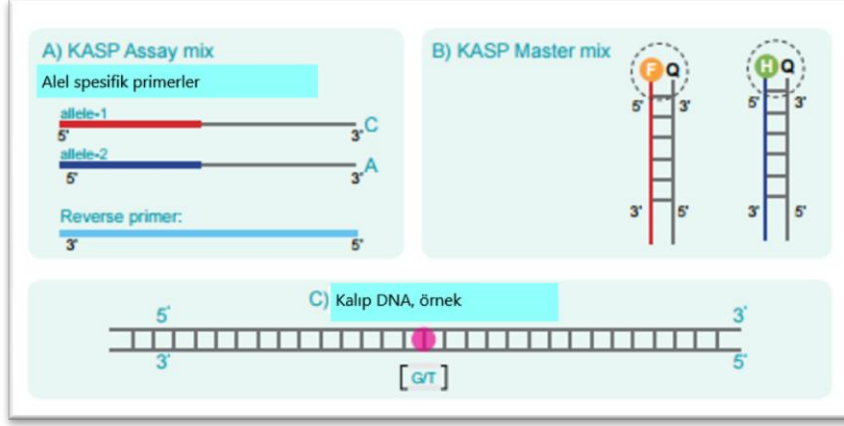
Tekli nükleotit polimorfizmlerinin belirlenmesinde DNA dizi analizi, TNP dizinleri (array/chip), genom boyu asosiyasyon çalışmaları, aday gen yaklaşımı, RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), Primer extension, Real Time PCR (eş zamanlı PCR), KASP gibi teknikler kullanılmaktadır. DNA dizileme ile gelişen dizileme teknikleri sayesinde daha fazla bölge daha yüksek doğruluk payı ile dizilenebilmektedir. İlgili bölgelerin dizilenmesi ile TNP'ler belirlenebilir. TNP chipleri ile array teknolojisi kullanılarak genom ebadında TNP'ler tanımlanmaktadır. Aday gen yaklaşımı ile hastalığa neden olan moleküler temeller araştırılırken ilgili genler analiz edilir. Genom boyu asosiyasyon çalışmalarında ise hastalığa neden olabilecek genler TNP'lerin tanımlanması ile belirlenir. Genom boyu asosiyasyon çalışmalarından sonra ise ilişkili bulunan TNP'lerin bu bölgedeki genlerin ifade düzeyleri üzerine olası etkilerini değerlendirmek üzere eQTL (expression quantitative trait loci) analizi kullanılabilir. Genom boyu asosiyasyon çalışmalarının yüksek hacimde çalışma potansiyeli TNP belirlemede yaygın olarak kullanılan teknik olmasını sağlamıştır.

2.6.2. Rekabetçi Allel Spesifik PCR (Kompetitive Allel Spesifik PCR, KASP)

TNP'lerin tanımlanabilmesi için tez çalışmasında uygulanan yöntem ise KASP (kompetative allel specific PCR) teknolojisidir. KASP genotiplendirme analizleri rekabetçi allel spesifik PCR yöntemine dayanan, belirli bir noktadaki tekli nükleotit polimorfizmlerini, delesyon ve insersiyonları bialelik olarak belirlemeye yarayan yöntemdir. KASP teknolojisinde allel spesifik primerler kullanılarak TNP'ler tanımlanır ve ayrıca homozigotluk heterozigotluk durumu belirlenir. KASP yöntemi, maliyeti önemli derecede azaltarak analiz sonuçlarının son derece yüksek düzeyde sağlamlığını ve doğruluğunu sunar. 10ng gibi düşük örnek konsantrasyonu ve düşük reaksiyon hacimlerinde sonuç verir.

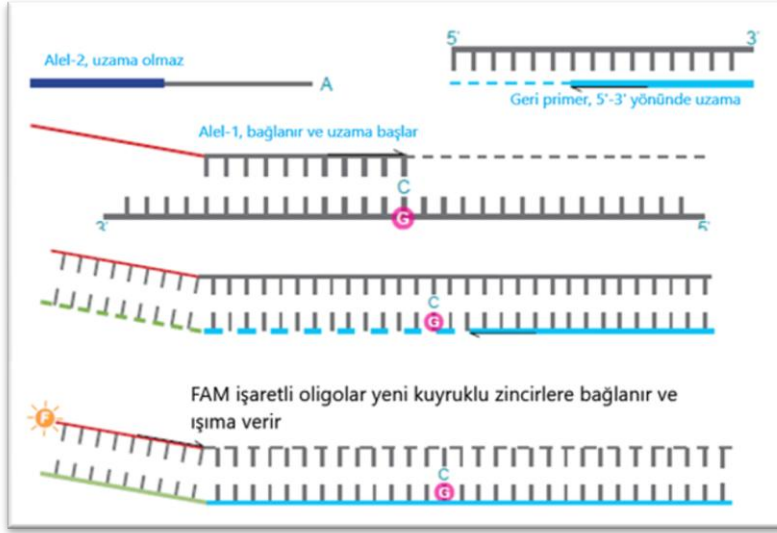
KASP genotiplendirme analizinin bileşenleri; KASP primer karışımı, KASP master karışımı ve DNA örneğinden oluşmaktadır. İlgili TNP'nin değişimlerine göre tasarlanmış alele özgü ileri primerler ve evrensel geri primer KASP primer karışımını oluşturur. KASP master karışımının içinde ise ilgili bölgenin PCR döngüleri sırasında çoğalmasını ve floresan ışımaya sağlayan FRET kaseti (fluorescent resonant energy transfer) ile ayrıca

PCR reaksiyonu için gerekli Taq polimeraz enzimi, uygun konsantrasyondaki Mg^{+2} u içeren tampon yer alır (Şekil 2-11). KASP teknolojisi ile, alel spesifik primerler ve ışımaya veren FRET kaseti içindeki floresan oligolar ile yüksek doğruluk payıyla sonuçlar elde edilir.

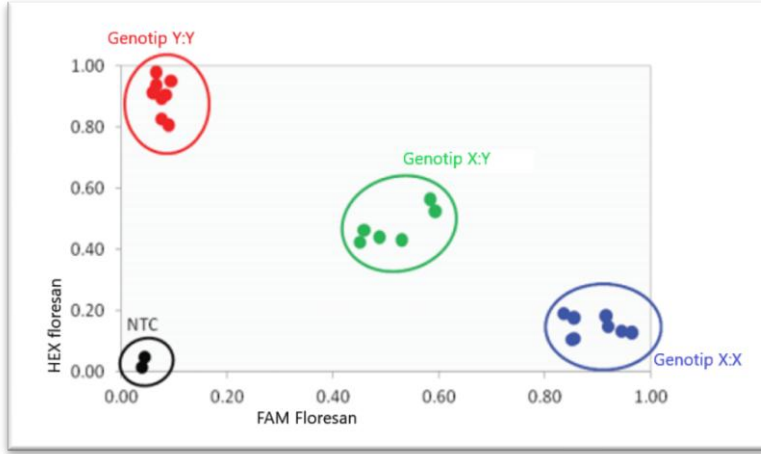


Şekil 2-11. KASP primer ve FRET kaseti temsili görünüm

Alele özgü iler primerler DNA'daki tekli nükleotit değişimine göre tasarlanmıştır ve her iki alelin primerinin 5' uçlarında kuyruk bölgeleri bulunur. Alel spesifik primerler TNP'nin olduğu bölgeye bağlanırlar ve evrensel geri primerlerin de bağlanmasıyla PCR reaksiyonu başlar. İlerleyen PCR döngülerinde alel spesifik primerler ile çoğaltılan TNP bölgesi geri primerler ile çoğaltılarak sayıca daha fazla duruma getirilir. Alele özgü primerin kuyruk bölgesini tanıyan FRET kasetindeki oligolar ile TNP bölgesi işaretli bir şekilde çoğalır. FRET kasetinden ayrılmış olan FAM ve HEX boyalı oligolar floresan ışımaya vermeye başlar (Şekil 2-12). Son nokta floresan ışımaya temeline dayalı okumalar ile sonuçlar alınır. KlusterCaller isimli program kullanılarak ışımalar görüntülenir. FAM mavi, HEX kırmızı renkte ışımaya verir. Homozigotluk durumunda kırmızı veya mavi ışımalar, heterozigotluk durumunda kırmızı ile mavinin karışımı olan yeşil renkte ışımaya alınır. Programın verdiği grafikte X ekseninde FAM mavi, Y ekseninde HEX kırmızı ve ortada yeşil renkte ışımalar görünür. Program homozigotluk veya heterozigotluk durumuna göre her bir örneği kümeleyerek grafikte sonuçları görünür hale getirir (Şekil 2-13).



Şekil 2-12. KASP reaksiyonu



Şekil 2-13. KASP genotiplendirme temsili görüntüsü

2.7. BAĞLANTI ANALİZİ

Genetik bağlantı analizi, genlerin kromozomdaki lokusları ve fonksiyonları arasındaki ilişkiyi analiz eder. Birbirine yakın olan genler mayoz bölünme sırasında birlikte gelecek nesillere aktarılırlar.

Mayoz bölünme sırasında aynı kromozomdaki genler birlikte aktarılmaktadır. Mayoz bölünmede görülen krosing over ile farklı kromozomlar arasında değişim gerçekleşir ve genetik çeşitlilik yaratacak şekilde genler aktarılır. Birbirine yakın pozisyonlarda olan genler arasında krosing over gerçekleşme olasılığı düşüktür ve genellikle birlikte aktarılır. Birlikte aktarılan genler arasında genetik bağlantı bulunmaktadır. TNP'ler arasında da

genetik bağlantı bulunabilmektedir. Bazı TNP'ler birlikte kalıtılırlar. Birlikte kalıtıldığı bilinen TNP'ler analiz sırasında önemli ölçüde kolaylık sağlamaktadır.

Bağlantı analizi 20. yüzyılın sonlarına kadar en yaygın olarak kullanılan istatistiksel genetik haritalama yöntemi idi. Günümüzde ise kompleks hastalıkların düşük etkili ortak varyantlarının belirlenmesinde asosiyasyon çalışmaları kullanılmaya başlanmıştır. Bu tür varyantlar için bağlantı analizinden asosiyasyon çalışmaları daha güçlü sonuçlar vermektedir. Genom boyu asosiyasyon çalışmaları (GWAS) asosiyasyon haritalama yöntemlerinde tekli nükleotit polimorfizmlerini kullanır. GWAS ile tam olarak tanımlanamayan nadir görülen varyantlar için ise biriken tüm genom ve ekzom dizi verileri ile aile temelli örnekler kullanarak bağlantı analizleri ile daha iyi sonuçlar vermektedir (34,36,37).

2.8. GENOM BOYU ASOSİYASYON ÇALIŞMALARI

Diyabet, şizofreni, kanser, obezite, kardiyovasküler hastalıklar gibi yaygın olarak görülen karmaşık hastalıkların genetik risk faktörlerini tanımlamak insan genetik çalışmalarının esas amacıdır. Genom boyu asosiyasyon çalışmaları (GWAS), popülasyonda yaygın olarak görülen hastalığın genetik çeşitliliğini DNA dizisini analiz ederek tanımlayan çalışmalardır. Genom boyu asosiyasyon çalışmalarının temel amacı genetik risk faktörleri ile risk altında olan bireyleri tahmin etmek ve hastalığın biyolojik temellerini anlayarak yeni koruma ve tedavi yöntemleri geliştirmektir. Genetik etkinin biyolojik temellerinin anlaşılması en çok farmakolojik terapilerde önemlidir. DNA dizisindeki çeşitlilikler ilaç metabolizması, etkinliği ve yan etkilerin anlaşılması ile ilaçların uygun kullanım dozlarının ayarlanmasına da katkı sağlar. Yapılan bu çalışmaların sonuçları kişiselleştirilmiş tıp alanına önemli katkılarda bulunmaktadır (3,33,34).

Genom boyu asosiyasyon çalışmaları, yaygın olarak görülen çeşitli hastalıklarla ilgili farklı insanlardaki belirteçleri geniş bir popülasyonda bütün genom boyunca tarayan bir yaklaşımdır. Genom boyunca her insanda farklılık gösteren nükleotit varyasyonları vardır. Bu varyasyonlar geçtiğimiz yaklaşık 20 sene içerisinde yapılan genom çalışmalarında belirlenmiştir. Bu çalışmalardan, 2003 yılında tamamlanan İnsan Genom Projesi ile insan genomu çıkarılması ve gen dizilerinin elde edilmesi ile genomik çalışmaların önü açılmıştır. HapMap projesi ile insan genomunun haplotipi çıkarılmış ve çok sayıda TNP

(Tekli Nükleotid Polimorfizmi) belirlenmiştir. Daha sonra ise 1000 Genom projesi ile dünya çapındaki farklı etnik popülasyonların kapsamlı bir genetik varyasyon haritası çıkarılmıştır. Bu projelerden elde edilen TNP verilerinin yardımı ile genom boyu asosiyasyon çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. GWAS günümüzde yaygın olarak kullanılan genom ebatında araştırmalar yapan, çeşitli hastalıklara yatkınlıkları ortaya çıkaran bir yöntemdir.(4)

GWAS hastalıklara neden olan genetik yatkınlığın belirlenmesinde kullanılan en güncel teknolojidir. Özellikle son on yılda yapılan çalışmalar ile GWAS daha çok yaygınlaşmış ve sonuçlar birikmeye başlamıştır. Hastalıkların fenotipleri ile genetik temelleri arasındaki ilişki GWAS ile belirlenmiş ve genetik moleküler belirteçler olarak literatüre girmeye başlamıştır.

Nadir görülen hastalıklarda düşük penetranslı genler etkili olabilmektedir. Düşük penetranslı genler ile hastalık arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi de GWAS ile mümkün olabilmektedir. Düşük penetranslı genlerin etkili olduğu nadir görülen hastalıklarda haplotip olarak aktarılan TNP'ler genetik yatkınlığa sebep olmakta ve moleküler belirteç olarak tanısında kullanılabilir (3,33,34).

2.8.1. Sporadik Kolorektal Kanser ve Genom Boyu Asosiyasyon Çalışmaları

Kolorektal kanser diğer kanserlerde olduğu gibi geniş çapta bir genetik heterojenitenin etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Kolorektal kanserin çeşitleri arasında da sebep olan genetik unsurlara göre farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, kalıtsal kolorektal kanser tek bir genin mutasyonu ile ortaya çıkabilirken sporadik kolorektal kanser birden fazla gendeki mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Kolorektal kansere neden olan gen lokusları ve genetik yatkınlık lokusları genom boyu asosiyasyon çalışmaları ile belirlenmiştir.

Sporadik kolorektal kanser bilinen genetik nedenleri dışında düşük penetranslı genlerin de genetik yatkınlığa sebep olduğu bilinmektedir. Sporadik kolorektal kanserin direk genetik ve epigenetik analizlerine ek olarak GWAS ile belirlenmiş düşük penetranslı alellerde yer alan TNP'ler potansiyel moleküler belirteçler olarak literatürde yerini almıştır. Yapılan bu çalışmalar $p < 5 \times 10^{-8}$ gibi p değerleri ile karmaşık hastalıkların altında yatan DNA değişimlerini tanımlamıştır. GWAS tümör oluşumu, gelişimi ve metastaz mekanizmaları ve

nedenleri hakkında bilgi vermemesine rağmen düşük penetranslı genler de dahil olmak üzere genler ve hastalık arasındaki ilişkiyi verir. İlişkili genlerin çevresindeki TNP'lerin patofizyolojik çalışmalarla ile hastalık ile ilgisinin kanıtlanması gerekmektedir. Aşağıdaki çizelgede (Çizelge 2-1) sporadik kolorektal kanser ile GWAS sonucu ilişkili bulunmuş TNP'lerin listesi verilmiştir. Sporadik kolorektal kanser daha çok 50 yaş ve üzeri bireylerde ortaya çıktığı için aile temelli olarak analiz yapmak güçtür. Bu yüzden geniş çaptaki örnekler ile popülasyon düzeyinde genom boyu asosiyasyon analizleri yapılarak ilişkili genler belirlenir.

Çizelge 2-1. Sporadik kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş TNP'ler (38)

No	Makale	Yıl	KRK	Kontrol	Popülasyon	Anlamli bulunan TNP	Genler	Lokasyon	Yazarlar	Makale
1	Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24.	2007	1257	1336	Kanada	rs10505477, rs6983267	DQ515897, DQ486513	8q24	Zanke BW	Nat Genet.
			4024	4042	Kanada, Amerika, İngiltere					
			2199	2401	Fransa, Avrupa					
2	A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk.	2007	627 KRK, 313 adenoma	965	İngiltere	rs4939827	SMAD7	18q21.1	Broderick P	Nat Genet.
			7473	5984						
3	A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21.	2007	930	960	Avrupa	rs6983267	POU5F1	8q24.21	Tomlinson IP	Nat Genet.
			4316	3752						
			1901	1079						
			1072	415						
4	A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3.	2008	627	965	Avrupa	rs10795668, rs16892766	EIF3H	8q24, 15q13, 18q21, 10p14, 8q23.3	Tomlinson IP	Nature Genetics
			2873	2871						
			4287	3743						
			10731	10961						
5	Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer.	2008	1902	1929	İngiltere	rs4444235, rs9929218, rs10411210, rs961253	BMP4; CDH1; RHPN2;	14q22.2, 16q22.1, 19q13.1, 20p12.3	COGENT Study	Nature Genetics
			4878	4914						
			13406	14012						
6	Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21.	2008	1012	1012	İskoçya	rs3802842, rs7014346, rs4939827	SMAD7, POU5F1P1, HsG57825, DQ515897	11q23, 8q24, 18q21	Tenesa A	Carcinogenesis
			14500	13294	İskoçya, İngiltere, Almanya, İsrail, İspanya, Kanada, Japonya					
7	Colorectal cancer risk is not associated with increased levels of homozygosity in a population from the United Kingdom.	2009	921	929	İngiltere	nope	nope	nope	Spain SL	Cancer Res.
			1214	1435	İngiltere					
8	A genome-wide scan of 10 000 gene-centric variants and colorectal cancer risk.	2009	2873	2871	İngiltere	rs1133950	UTP23 K195Q	8q24.11	Webb E	Eur J Hum Genet.
9	Meta-analysis of three genome-	2010	3334	4628	Avrupa	rs6691170,	LARP4,	1q41,	Houlston RS	Nature

	wide association studies identifies susceptibility loci for colorectal cancer at 1q41, 3q26.2, 12q13.13 and 20q13.33.		18095	20197	Avrupa	rs6687758 rs10936599, rs1116955 rs7136702, rs4925386	DIP2B, ATF1, LAMA5, MYNN	3q26.2, 12q13.13, 20q13.33		Genet.
10	Genome-wide association study for colorectal cancer identifies risk polymorphisms in German familial cases and implicates MAPK signalling pathways in disease susceptibility.	2010	371	1263	Almanya	rs12701937, rs6038071, rs11014993	GLI3, INHBA, CSNK2A1, MYO3A	8q24.21 and 11q23	Lascorz J	Carcino genesis
			4915	5607						
11	Genotype-environment interactions in microsatellite stable/microsatellite instability-low colorectal cancer: results from a genome-wide association study.	2011	1191	999	Kanada, Yeni Zelanda, Avustralya	nope	nope	nope	Figueiredo JC	Cancer Ep. Biomar. Prev
			872	810	Avrupa					
12	Common variant in 6q26-q27 is associated with distal colon cancer in an Asian population	2011	1583	1898	Japonya	rs7758229, rs6983267, rs7837328	SLC22A3, SMAD7	6q26-q27, 8q24	Cui R	Gut
			4809	2973	Japonya, Kore					
13	Evidence of linkage to chromosomes 10p15.3-p15.1, 14q24.3-q31.1 and 9q33.3-q34.3 in non-syndromic colorectal cancer families.	2011	241(53 Aile)	-	Avustralya, İspanya	rs10508218 ,rs10508270	PFKP, PITRM1, KLF6	10p15.3- p15.1	Saunders IW	J Hum Genet.
14	Genome-wide association analyses in east Asians identify new susceptibility loci for colorectal cancer	2012	2098	5749	Doğu Asya	rs647161, rs 2423279, rs10774214	CCND2, HAO1, PLCB1, PITX1, CATSPER3, PCBD2, MIR4461, H2AFY	5q31.1, 20p12.3, 12p13.32	Jia WH	Nat.Gen et.
			5358	5922						
15	Association of Caucasian-Identified Variants with Colorectal Cancer Risk in Singapore Chinese	2012	1000	1000	Kuzey ve HonKong Çinlileri	rs6983267, rs6695584, rs11986063, rs3087967, rs2059254, rs7226855, r s827401	EIF3H, UTP23, SMAD 7	8q24.21, 1q41, 8q23.3, 11q23.1, 16q22.1, 18q21.1	Thean LF	Plos One
16	Genome-wide investigation of gene-environment interactions in colorectal cancer.	2012	314	-	Almanya	rs1944511	TRIM29	11q23.3	Siegert S	Hum Genet
			259	1002						
17	Genome-wide search for gene-gene interactions in colorectal cancer.	2012	8380	10558	Fransa, Almanya, Kanada, Avustralya, Amerika	rs10795668, rs367615, rs1571218, rs10879357		10p14, 5q21, 20p12.3, 12q21.1	Jiao S	PLoS One
			2527	2628	Almanya					
18	Colorectal cancer-susceptibility single-nucleotide polymorphisms in Korean population	2013	105	-	Kore	rs4939827, rs4779584, rs10795668, rs17051076	SMAD7, CRAC1,	18q21, 15q14, 4q28, 10p14,	Hong SN	J of Gastro and Hepatol
			189	190						
19	Fine-mapping of genome-wide association study-identified risk loci for colorectal cancer in African Americans	2013	1894	4703	Afrikalı Amerikalı	rs12759486, rs7547751, rs7252505	GPATCH1, RP11- 815M8.1	19q13.1, 1q41	Wang H	Hum. Mol. Genet.
20	A colorectal cancer genome-	2013	882	473	İspanya	rs12080929,	SLC5A9,	1p33,	Fernandez-	BMC

	wide association study in a Spanish cohort identifies two variants associated with colorectal cancer risk at 1p33 and 8p12		1436	1780		rs11987193	DUSP4	8p12	Rozadilla C	Genomics
21	BMP2/BMP4 colorectal cancer susceptibility loci in northern and southern European populations.	2013	1449	1000	İspanya	rs4444235, rs1957636, rs961253, rs4813802	BMP4, BMP2,	14q22.2, 20p12.3	Fernandez-Rozadilla C	Carcinogenesis.
			2028	4273	İspanya, Portekiz, İtalya					
22	A genome-wide association study on copy-number variation identifies a 11q11 loss as a candidate susceptibility variant for colorectal cancer.	2013	881	667	İspanya	rs1944682	OR4A15	11q11	Fernandez-Rozadilla C	Hum Genet.
			1342	1874						
23	Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Colorectal Cancer Susceptibility and Loss of Heterozygosity in a Taiwanese Population	2014	705	1802	Tayvan	rs10795668, rs4631962, rs1338565, rs12657484, rs3802842, and rs4444235	FLJ3802842, CCND2, BMP4, ZNF239, C11orf93	10p14, 10q11.22, 5q31.1, 11q23,	Yang CY	Plos One
24	Genetic ancestry is associated with colorectal adenomas and adenocarcinomas in Latino populations	2014	303-190 adenocarcinomas, 113 sporadic adenomas	243	Kolombiya	678 SNP	Valide edilmedi	Valide edilmedi	Hernandez-Suarez G1	Eur. J of Hum. Genet.
25	A colorectal cancer susceptibility new variant at 4q26 in the Spanish population identified by genome-wide association analysis.	2014	480	801	İspanya	rs3987, rs1100508, rs8111948, rs10936599, rs10505477, rs6983267, rs3824999, rs4444235	TRAM1L1 and NDST3 GPR37, LINC00662, LINC00906, LINC00587, PRNCR1	4q26, 7q31.33, 19q12, 3q36.2, 8q24, 8q24.21, 11q13.4, 14q22.2	Real LM	PLOS One
			1305	2049						
26	Genome-wide association study identifies a new SMAD7 risk variant associated with colorectal cancer risk in East Asians	2014	1773	2642	Çin, Güney Kore, Japon	rs7229639, rs4939827	SMAD7	18q21.1	Zhang B	Int. Journal of Cancer
			3612	3,523						
			3290	4339						
27	Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk	2014	2098	6172	Çin, Japonya, Güney Kore	rs647161, rs10774214, rs2423279, rs7229639	TCF7L2, TGFBI, ZMIZ1, FEN1, FADS1, FADS2	10q22.3, 10q25.2, 11q12.2, 12p13.31, 17p13.3, 19q13.2, 8q24.11, 10q21.1, 10q24.2	Zhang B	Nat.Genet.
			3519	6275	Çin					
			2814	11358	Japonya					
			6532	8140	Çin, Japonya, Güney Kore					
			14963	31945						
			11934	28282						
28	Trans-ethnic genome-wide association study of colorectal cancer identifies a new susceptibility locus in VT11A	2014	4521	8500	Japonya, Afrika Kökenli (Metaanaliz)	rs12241008	VT11A	10q25	Wang H	Nature Com.
			16,823	18211	Avrupa					
29	A novel colorectal cancer risk locus at 4q32.2 identified from an international genome-wide association study.	2014	2462	1497	Askenazi Yahudileri, Kanada, Avustralya, Amerika	rs35509282	FSTL5	4q32.2	Schmit SL	Carcinogenesis
			1131	831	Askenazi Yahudileri					
30	Genetic variations affecting serum carcinoembryonic antigen levels and status of regional lymph nodes in patients	2014	-	4346 erkek	Kuzey Çin	rs1047781	FUT2	19q13	Liang Y	PLOS One
			194	-						

	with sporadic colorectal cancer from Southern China									
31	Genome-wide association study of colorectal cancer identifies six new susceptibility loci.	2015	18299	19656	Kuzey Amerika, Avustralya, Avrupa	rs35360328, rs812481, rs11190164, rs3184504, rs73208120, rs6066825	CTNNB1, LRIG1, SLC25A28, ENTPD7, COX15, CUTC, ABCC2, SH2B3, NOS1, PREX1	3p22.1, 3p14.1, 10q24.2, 12q24.12, 12q24.22, 20q13.13	Schumacher FR	Nature Com.
			4725	9969	Çin, Japonya, Kore					
32	A new GWAS and meta-analysis with 1000Genomes imputation identifies novel risk variants for colorectal cancer	2015	7577	9979	Kanada, Amerika, Avustralya, İngiltere	rs72647484, rs16941835, rs10904849	CDC42, WNT4RP11-58A18.1, CUBN	1p36.2, 16q24.1, 10p13	Al-Tassan NA	Sci Rep
33	A genome wide association study on Newfoundland colorectal cancer patients' survival outcomes.	2015	431	-	Kanada	rs17057166, rs17026425	AC011343.1, LINC01121, JUN/JUND	2p21, 19p13.2	Xu W	Biomar. Res.
34	A genome-wide association study for colorectal cancer identifies a risk locus in 14q23.1.	2015	16517	14487	Avrupa	rs17094983	RTN1	14q23.1	Lemire M	Hum. Genet.
			1894	4703	Afrika					
			22627	3797	Japonya					
35	Genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for colorectal cancer at 5q23.3 and 17q12 in Han Chinese.	2015	932	966	Han Çinlileri	rs12522693, rs17836917, rs6983267, rs10795668	CDC42SE2, CHSY3, ASIC2, CCL2	5q23.3, 17q12, 8q24.21, 10p14	Jiang K	Oncotar get.
			1759	1875						
			943	1838						
36	Common genetic variation and survival after colorectal cancer diagnosis: a genome-wide analysis.	2016	3494	-	Avrupa	rs209489	ELOVL5	6p12.1	Phippis AI	Carcino genesis.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Bu tez çalışmasında hipotezimizi, “Sporadik kolorektal kanser için batı popülasyonlarında yüksek istatistiki güç ve anlamlılık ile tanımlanmış TNP’ler Türk popülasyonunda görülen KRK’lar ile de ilişkilidir.” olarak kurduk. Hipotezimizi test etmek için uygun çalışma grubu ile deney tasarımını yaptık ve söz konusu tez çalışmasını gerçekleştirdik.

Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) 2015 yılı verilerine göre, dünya çapında ölüme sebep olan hastalıklar arasında kanser ilk sıralarda yer almaktadır. En yaygın olarak görülen kanser türleri; akciğer, akciğer karaciğer, mide, kolorektal, meme ve özofagal kanserlerdir. Kolorektal kanser dünyada ölümcül hastalıklar arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Türkiye’de ise Kolorektal kanser (KRK), ölümcül hastalıklar içinde üçüncü, erkeklerde üçüncü, kadınlarda ise ikinci sırada görülmektedir.

Sporadik kolorektal kanserin altında yatan genetik temellerin anlaşılması hastalığın erken tanı ve tedavisine yansımaları açısından önemlidir. Yapılan pek çok çalışmada kolorektal kanserde görülen moleküler değişimler tespit edilmiştir. Kromozomal kayıplar/kazançlar, mikrosatellit instabilitesi, mutasyonlar ve ekspresyon değişimleri başlıkları altında toplanan bu moleküler değişimler kolorektal kanserlerin heterojenitesinin anlaşılmasına önemli ölçüde katkı sağlamıştır.

Kanser gibi multifaktöriyel hastalıklarda genetik yatkınlığın temelini açığa çıkarılması için kullanılan güncel strateji popülasyon veya aile temelli olarak iki farklı şekilde tasarlanabilen genom boyu asosiyasyon çalışmalarıdır. Popülasyon temelli asosiyasyon çalışmalarında güvenilir sonuç alabilmenin yolu binlerce hasta-kontrol üzerinde çalışılmasından geçer. Buna karşın ikinci bir yöntem olan aile temelli genom boyu asosiyasyon çalışma tasarımında etkilenmiş birey/hasta (çocuk) ile onun sağlıklı anne ve babası (trio) ile çalışılabilmektedir.

Kolorektal kanser diğer kanserlerde olduğu gibi geniş çapta bir genetik heterojenitenin etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Kolorektal kanserin çeşitleri arasında da sebep olan genetik unsurlara göre farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, kalıtsal kolorektal kanser tek bir genin mutasyonu ile ortaya çıkabilirken sporadik kolorektal kanser birden fazla gendeki

mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. KRK'e neden olan gen lokusları genom boyu asosiyasyon çalışmaları ile belirlenmiştir.

TNP'ler bireyler arasında farklılık gösterdiği gibi popülasyonlar arasında da farklılık göstermektedir. Popülasyonlar arasında görülen bu farklılıklardan dolayı çeşitli popülasyonlarda tanımlanmış olan TNP'ler farklı coğrafik bölgelerde yaşayan toplumlar için de valide edilmelidir (33,39). Bu nedendir ki Batı popülasyonunda tanımlanmış olan TNP'ler Türk popülasyonu için de doğrulanmalıdır. Bu tez çalışması ile Türk popülasyonunda kolorektal kansere yatkınlığa yol açan tekli nükleotit polimorfizmlerinin önemli bir kısmı belirlenmiş olacaktır.

Çalışma grubumuz daha önceki çalışmalarında, Avrupa'da binlerce hasta kontrol grubu üzerinde yapılan çalışmalarla yüksek istatistiki güç ve anlamlılık ile tanımlanmış olan sporadik kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş 7 TNP'yi (rs1035209, rs6691170, rs11169552, rs7136702, rs4925386, rs6983267) Türk popülasyonu için analiz etmiş ve bunlar içinde yalnızca tek bir TNP'nin (8q24'e lokalize olan rs6983267) Türk toplumunda görülen KRK ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu tespit tezimizi desteklemektedir; ilgilenilen TNP ne kadar geniş bir popülasyonda doğrulanmış olursa olsun ilgili popülasyon bütün dünya popülasyonunu temsil edememektedir. İşte bu nedendir ki TNP validasyon çalışmaları her popülasyona özgü olacak şekilde tekrarlanmalıdır.

Yapmış olduğumuz daha önceki çalışmalar ve bu çalışma sonucunda elde edilecek verilerin birleştirilmesi ile Türk popülasyonunda görülen sporadik kolorektal kanser TNP'lerinin diğer popülasyonlardan farklılıkları gösterilmiş olacaktır. Türk popülasyonuna özgü sporadik kolorektal kanser TNP'lerinin belirlenmesi ile bu hastalığın tanımlanması, erken tanı ve tedavisi için literatüre ve ilerleyen yıllarda önleyici klinik uygulamalara önemli bir katkı sağlanacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Bu tezde kullanılan çalışma grubu ve sağlıklı kontroller, çalışma grubumuz tarafından TÜBİTAK 112S348 numaralı projesi kapsamında toplanmıştır. Örnekler Türk popülasyonunu temsilen Türkiye'nin yedi bölgesinden farklı şehirlerden toplanmıştır. Türkiye genelinde 45 merkez ve 52 cerrahi uzmanı ile çalışılmıştır (Şekil 4-1) (Ek 1). İlgili izinler Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumundan alınmıştır (Karar sayısı 41343506/5454.9788). Örneklerin toplanması için gereken etik kurul kararı Ankara Üniversitesinden 28.12.2015 tarihli 20-879-15 numaralı izin ile alınmıştır.



Şekil 4-1. Örneklerin toplandığı merkezlerin temsili görüntüsü (38)

4.2. HASTA KONTROL GRUBUNUN OLUŞTURULMASI

Çalışma grubu Türkiye'nin yedi bölgesinden kolorektal kanser teşhisi koyulmuş, aile hikayesi olmayan bireylerden, kontrol grubu ise kolonoskopi kontrolleri yapılmış sağlıklı bireylerden alınan periferik kan örneklerinden oluşmaktadır.

Projeye başlarken hasta kontrol örnekleri toplanırken en baştaki amaç 1000 kontrol 1000 örnek olmak üzere toplam 2000 örnek toplanması idi. Ancak 3 yıllık TÜBİTAK projesi süresince 1019 hasta, 948 kontrol olmak üzere toplam 1967 örnek toplanabilmiştir. Toplanan bu örnek sayısı ile hedeflenen örnek sayısının %95'ine ulaşılmıştır.

Proje bitimine kadar, hasta örneklerinde istenilen sayıya ulaşılmış olmasına rağmen hasta yaş ve cinsiyet dağılımında homojeniteyi sağlamak için örnek toplanmasına devam

edilmiştir. Aynı zamanda, kontrol örnekleri de toplanmaya devam edilerek sayısının artması sağlanmıştır.

Hasta/kontrol gruplarının; sayısı, yaş-cinsiyet ve bölgelere göre dağılımı (Çizelge 4-1 ve Çizelge 4-2), klinik verileri ise (

Çizelge 4-3) verilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan hasta ve kontrol DNA örnekleri, ifade edildiği üzere 112S634 numaralı proje devam ederken bu projede görev almış çalışma arkadaşlarım tarafından toplanmış ve izole edilmiştir.

Çizelge 4-1. Toplanan hasta ve kontrol sayısının bölgelere göre dağılımı (38)

	Kontrol (%)	Çalışma Grubu (%)	Toplam (%)
İç Anadolu	178 (21)	208 (23)	386 (22)
Akdeniz	193 (22)	155 (17)	348 (20)
Ege	27 (3)	58 (7)	85 (5)
Karadeniz	187 (22)	143 (16)	330 (19)
Marmara	197 (23)	222 (25)	419 (24)
Doğu Anadolu	51 (6)	76 (9)	127 (7)
Güney Doğu Anadolu	26 (3)	24 (3)	50 (3)
Ara Toplam	859	886	1745
Bilgisi Eksik Kontrol Birey Sayısı		89	
Bilgisi Eksik Hasta Birey Sayısı		133	
Toplam		1967	

Çizelge 4-2. Tez çalışmasında kullanılan hasta-kontrol örneklerinin yaş ve cinsiyet dağılımı (38)

Grup	Yaş/Cinsiyet	n (%)	Toplam n (%)	Toplam n (%)
Çalışma Grubu	50 yaş üstü Erkek	524 (27)	638 (32)	957 (49)
	50 yaş altı Erkek	114 (6)		
	50 yaş üstü Kadın	235 (12)	319 (16)	
	50 yaş altı Kadın	84 (4)		
Kontrol Grubu	50 yaş üstü erkek	226 (11)	417 (21)	908 (46)
	50 yaş altı erkek	191 (10)		
	50 yaş üstü kadın	258 (13)	491 (25)	
	50 yaş altı kadın	233 (12)		
Toplam				1865 (95)
Doğum Tarihi Belirsiz Çalışma Grubu	Erkek- Yaş Belirsiz	36 (2)		102(5)
	Kadın-Yaş Belirsiz	26 (1)		
Doğum Tarihi Belirsiz Kontrol Grubu	Erkek- Yaş Belirsiz	11 (1)		
	Kadın-Yaş Belirsiz	29 (1)		
Toplam				1967

Çizelge 4-3. Hastalardan toplanan klinik veriler (38)

Klinik Parametreler
Doktor Bilgisi
Tedavi Merkezi
İkincil Odak Durumu
Ailesel Kanser Durumu
Radyolojik Evre
Lezyonun Yeri
Preoperatif- Neoadjuvan
Çevre Organ İnvazyonu
Lenf Nodu Metastazı
Uzak Organ Metastazı
Kanser Tipi
Differansiasyon
TNM EVRESİ
Periferik Nöral-Periferik Vasküler İnvazyonu

4.3. YÖNTEM

4.3.1. Kandan DNA İzolasyonu

Tez çalışmasında kullanılan DNA örnekleri çalışma arkadaşlarımız tarafından daha önceki proje ve tez çalışmalarında toplanmış ve DNA izolasyonu yapılmıştır. Kolorektal kanser ve sağlıklı kontrollerden toplanan toplam 1967 periferik kan örneği Promega DNA izolasyon kiti (Promega, Wizard Genomic DNA Purification Kit-A1125) kullanılarak izole edilmiştir. DNA örnekleri -20°C ve -80°C’de saklanmıştır.

1. 300 µl kan örneği üzerine 900 µl hücre liziz solüsyonu (Cell Lysis Solution) eklenir ve karıştırılır.
2. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.
3. 13.000 g’de 20 saniye santrifüjlenir, süpernatant atılır ve pelet vortekslenir.
4. Peletin üzerine 300 µl çekirdek liziz solüsyonu (Nuclei Lysis Solution) eklenir ve ters düz edilerek karıştırılır.
5. Üzerine 100 µl protein çöktürme solüsyonu (Protein Precipitation Solution) eklenir ve 20 saniye vortekslenir.
6. 13.000 g’de 3 dakika santrifüjlenir
7. Süpernatant içinde 300 µl izopropanol olan yeni bir tüpe alınır.
8. 13.000 g’de 1 dakika santrifüjlenir.
9. Süpernatant atılır ve peletin üzerine 300 µl %70 etanol eklenir.
10. 13.000 g’de 1 dakika santrifüj yapılır.
11. Etanol uzaklaştırılır ve pelet 10-15 dakika havada (air-dry) kurutulur.

12. DNA 100 µl DNA rehidrasyon (DNA Rehydration Solution) sulandırılır. 1 saat 65°C'de veya 4°C'de gece boyu inkübe edilerek DNA'nın çözünmesi sağlanır.

4.3.2. DNA Nicelik Ve Nitelik Analizi

İzole edilen DNA örneklerinin kalite ve saflığı spektrofotometrik olarak Nanodrop cihazı ile analiz edilmiştir. 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında 2 µl örnek kullanılarak DNA miktarı ve saflığı ölçülmüştür.

İzole edilen DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek bütünlüğü görüntülenmiştir.

%1'lik Agaroz Jel Hazırlanışı;

1 gr agaroz (Sigma-A9539) hassas terazide tartılır ve 1X Tris borik asit EDTA tamponu (TBE) ile 100 ml'ye tamamlanır. Mikrodalgada yüksek sıcaklıkta yaklaşık 2 dakika boyunca kaynatılarak çözünmesi sağlanır.

1X Tris Borik Asit EDTA Hazırlanışı;

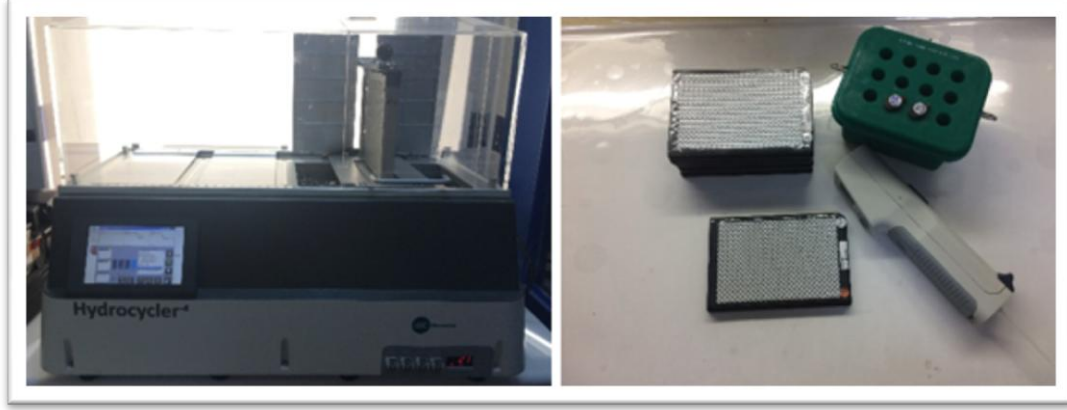
- Trisma Base: 10,8 gr (Sigma-T1503)
- Borik Asit: 5,5 gr (Sigma- B6768)
- EDTA (0,5 M, pH:8): 4 ml (Lonza-51201)

Hacim ddH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır ve karıştırılır.

TBE içinde çözülmüş agaroz yeterince soğuduktan sonra 4 µl Red Safe boyası (Chembio-21141) eklenerek uygun jel tabak ve tarakları kullanılarak polimerleşmeye bırakılır. 3 µl DNA örneği ve 1,5 µl 5X yükleme boyası (Fermentas, R0611) karıştırılarak kuyulara yüklenir ve 85 Voltta 1 saat yürütülür. UV ile görüntüleme yapılır.

4.3.3. Rekabetçi Alel Spedifik Pcr (Kompetative Allel Specific PCR, KASP)

Tez çalışmasında kullanılan 1967 örnek ve 9 TNP sayısı dikkate alındığında, işlem hacmini artırmak için, örnekler 384 kuyulu plakalara (plate) dağıtılmıştır. Aynı anda 4 tane 384 kuyulu plaka ile su banyosu temelli PCR gerçekleştiren Hydrocyler cihazı kullanılmıştır (Şekil 4-2).



Şekil 4-2. Hydrocyler, 384 kuyulu plaka, repeater dispenser

Örnekler 384 kuyulu plakalara dağıtılır ve üzerine uygun oranlarda karıştırılmış olan primer ve KASP master karışımı repeater dispenser pipet ile eklenir. Dağıtım işlemi bittikten sonra plakanın üzeri K-Seal cihazı kullanılarak sıcaklıkla aktifleşen naylon tabaka ile kapatılır. K-seal cihazı ile 3 saniye 175°C’de plakaların üzerini kaplama işlemi gerçekleştirilir (Şekil 4-3).



Şekil 4-3. K-Seal cihazı

Plakalar Hydrocyler cihazında uygun PCR koşullarında reaksiyonuna bırakılır (

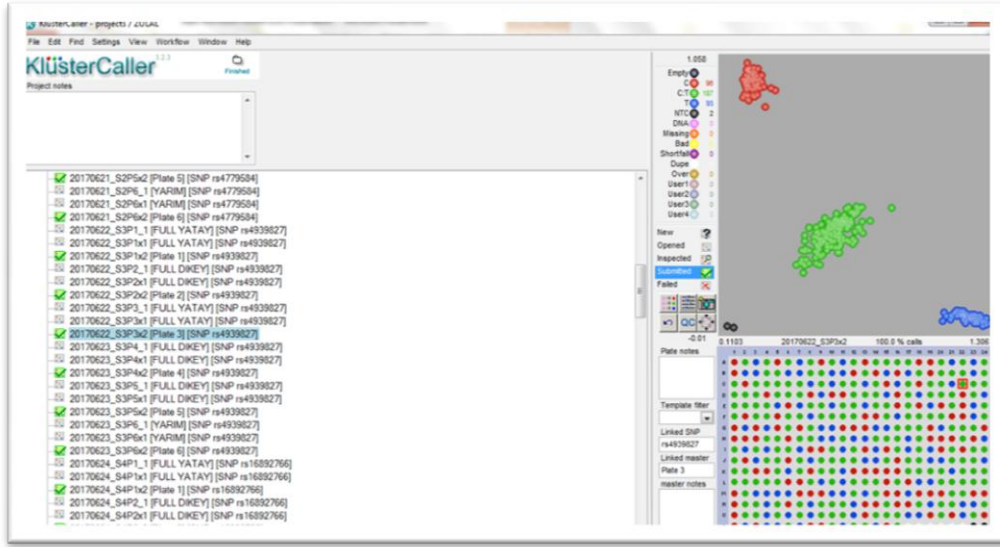
Çizelge 4-4). PCR bitince plakların floresan okuması Omega cihazında uygun dalga boylarında gerçekleştirilir (Şekil 4-4). Okumaların analizi için Kluster programı kullanılır. Bu programda floresan ışımalara göre her bir kuyudaki DNA örneğinin homozigot veya heterozigot kümelemesi yapılır (Şekil 4-5).

Çizelge 4-4. KASP reaksiyonu PCR koşulları

94°C	15:00	10 döngü
94 °C	00:20	
61-55 °C	01:00	
94 °C	00:20	26 döngü
55 °C	01:00	



Şekil 4-4. Floresan okumaların yapıldığı Omega cihazı



Şekil 4-5. KlusterCaller programı ara yüzü ve temsilen seçilen rs4939827 görüntüsü

4.3.4. KASP Verilerinin İstatistiksel Analizi

1967 örnekten oluşan geniş çaptaki popülasyon temelli asosiyasyon çalışmamızın istatistiksel analizini, hasta ve sağlıklı bireylerin alelik frekanslarını karşılaştırarak gerçekleştirdik. Hasta örnekleri kolorektal kanseri teşhisi konmuş aile hikayesi olmayan bireylerden toplanan periferik kan örnekleridir. Sağlıklı örnekler ise kolonoskopileri yapılmış kanser teşhisi koyulmamış bireylerden alınan periferik kan örnekleridir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu hasta ve sağlıklı örnek grubu arasındaki tekli nükleotit polimorfizm alellerinin frekans farklılıkları hesaplanmış ve genetik yatkınlık ile kanser riskindeki artışa sebep olabilecek genetik belirteçler belirlenmiştir.

Popülasyon temelli asosiyasyon çalışmalarında öncelikle Hardy-Weinberg dengesi kontrol edilir. Sonrasında ise genetik belirteçler ve hastalık lokusu arasındaki asosiyasyonu ölçebilmek için Cochran-Armitage Ki-kareli eğilim testi ve alel hasta kontrol testi

uygulanmıştır. Çizelge 4-5'te gösterildiği şekilde iki alelli belirteç tablosu oluşturulmuş, 1019 sporadik kolorektal kanser ve 948 sağlıklı kontrolün analizinde bu testler kullanılmıştır.

Çizelge 4-5. Hasta-Kontrol çalışmalarında genotip dağılımı (38)

Genotip	AA	Aa	aa	Toplam
Hasta	r ₀	r ₁	r ₂	R
Kontrol	s ₀	s ₁	s ₂	S
Toplam	n ₀	n ₁	n ₂	N

Cochran-Armitage'in ki-kareli eğilim testi ve alel vaka-kontrol testi için istatistikler sırasıyla denklem (1) ve (2)'de verilmektedir (38).

$$\chi_T^2 = \frac{N[N(r_1 + 2r_2) - R(n_1 + 2n_2)]^2}{R(N - R)[N(n_1 + 4n_2) - (n_1 + 2n_2)^2]} \quad (1)$$

$$\chi_A^2 = \frac{2N[2N(r_1 + 2r_2) - 2R(n_1 + 2n_2)]^2}{(2R)2(N - R)[2N(n_1 + 2n_2) - (n_1 + 2n_2)^2]} \quad (2)$$

Sıfır hipotezi, bu analizler için, genetik belirteç ve hastalık lokusu arasında asosiyasyon yok olarak kurulur. Bu iki istatistik de, sıfır hipotezi altında, asimptotik olarak, yani büyük örneklemelerde, bir serbestlik dereceli ki-kare eğilim dağılımını takip eder. Bu dağılım ile p-değerleri hesaplanmış ve ilişkili lokus ve belirteçler belirlenmiştir. Bu tip veriler için, lojistik regresyon ve skor testleri de yukarıda bahsedilen testlerle ilişkili veya denk olduğundan, çalışmamızda sadece bu ki-kare testlerinin uygulanmasının yeterli görülmüştür. Aynı veri setine birden fazla istatistiksel test uygulamamızdan kaynaklanan ve bu tip veriler için hep geçerli olan çoklu test düzeltmesi ('multiple testing correction') de uygulanmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. DNA MİKTAR, KALİTE VE BÜTÜNLÜK ANALİZLERİ

DNA izolasyon, miktar, kalite ve bütünlük analizleri Dr. Özge Cumaoğulları tarafından TÜBİTAK 112S348 nolu proje dahilinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan DNA izolasyonları sonucunda DNA örneklerinin kalite ve miktar tayini spektrofotometrik ölçüm ile Nanodrop cihazında yapılmıştır. (Çizelge 5-1).

Çizelge 5-1. DNA örneklerinin maksimum minimum değerleri

DNA Ölçüm Minimum/Maksimum Değerleri	
Konsantrasyon (ng/ul)	25-1369
A ₂₆₀ /280	1,8-1,9
A ₂₆₀ /230	1,9-2,30

5.2. KASP ANALİZLERİ

KASP genotiplendirme deneyleri 1967 örnek üzerinde, Avrupa’da geniş çapta çalışma örnekleri ve yüksek istatistiki veriler ile tanımlanmış ve KRK ile ilişkilendirilmiş 26 TNP arasından seçtiğimiz 9 TNP ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma planının genel görüntüsü Çizelge 5-2’te verilmiştir.

Yapmış olduğumuz kapsamlı literatür araştırmaları sonucu, Avrupa’da yapılmış olan genom boyu asosiyasyon çalışmalarından elde edilen yüksek istatistiki veriler ile KRK ile ilişkilendirilmiş olan 25 TNP belirlenmiştir (Çizelge 5-3). 7 TNP çalışma grubumuz tarafında analiz edilmiş ve 1 TNP $p < 0,05$ değeri ile anlamlı bulunmuştur. Bu tez çalışmasında, TNP’ler arasından 9 tanesinin seçimi, yakınındaki genler, TNP’lerin genlere göre durumu, kolorektal kanser veya kanser yolaklarında rol alma durumu, literatürdeki diğer çalışmalardaki varlığı ve literatürde rastlanma sıklığı gibi kriterlere göre yapılmıştır (Çizelge 5-4).

1967 örnek toplamda 6 plakaya dağıtılmıştır. Her plaka ikişer kuyu olmak üzere negatif kontrol içermektedir. Plakaların örnek düzeni ve TNP’lerin rs numara bilgileri Ek-2 ve Ek-3’te verilmiştir.

- Plaka 1: 376 örnek
- Plaka 2: 376 örnek
- Plaka 3: 376 örnek
- Plaka 4: 376 örnek
- Plaka 5: 288 örnek
- Plaka 6: 178 örnekten oluşmaktadır.

Çizelge 5-2. 1967 Örnek ve 9 TNP KASP Deneyleri Genel Görünümü

PLAKA 1	PLAKA 2	PLAKA3	PLAKA 4	PLAKA 5	PLAKA 6
TNP1	TNP1	TNP1	TNP1	TNP1	TNP1
TNP2	TNP2	TNP2	TNP2	TNP2	TNP2
TNP3	TNP3	TNP3	TNP3	TNP3	TNP3
TNP4	TNP4	TNP4	TNP4	TNP4	TNP4
TNP5	TNP5	TNP5	TNP5	TNP5	TNP5
TNP6	TNP6	TNP6	TNP6	TNP6	TNP6
TNP7	TNP7	TNP7	TNP7	TNP7	TNP7
TNP8	TNP8	TNP8	TNP8	TNP8	TNP8
TNP9	TNP9	TNP9	TNP9	TNP9	TNP9

Çizelge 5-3. Avrupa’da yapılan genom boyu asosiyasyon çalışmaları sonucu KRK ilişkili TNP’ler

Kromozom Lokusu	Yakın Gen(ler)	TNP rs numarası	p değeri	Referans
1q25.3	LAMC1	Rs10911251	1.75×10^{-8}	Whiffin vd. 2014
1q41	DUSP10	Rs6691170*	9.55×10^{-10}	Houlston vd. 2010
3q26.2	TERC, MYNN	Rs10936599	3.39×10^{-8}	Houlston vd. 2010
6p21.2	CDKN1A	Rs1321311	1.14×10^{-10}	Dunlop vd. 2012
8q23.3	EIF3H	Rs16892766	3.3×10^{-18}	Tomlinson vd. 2008
8q21.1	CCAT2/CASC8	Rs6983267 *	3.16×10^{-11}	Zanke vd. 2007, Tomlinson vd. 2007
10p14	GATA3	Rs10795668	2.5×10^{-13}	Tomlinson vd. 2008
10q24.2	-	Rs1035209 *	4.54×10^{-11}	Whiffin vd. 2014
11q13.4	POLD3	Rs3824999	3.65×10^{-10}	Dunlop vd. 2012
11q23.1	FLJ45803	Rs3802842	5.8×10^{-10}	Tenesa vd. 2008
12p13.32	CCND2	Rs3217810*	2.16×10^{-10}	Whiffin vd. 2014
12q13	DIP2B, ATF1	Rs11169552*	1.89×10^{-10}	Houlston vd. 2010
12q13	DIP2B, ATF1	Rs7136702*	4.02×10^{-8}	Houlston vd. 2010
14q22.2	BMP4	Rs4444235	8.1×10^{-10}	Houlston vd. 2008
14q22.2	BMP4	Rs1957636	1.36×10^{-9}	Tomlinson vd. 2011

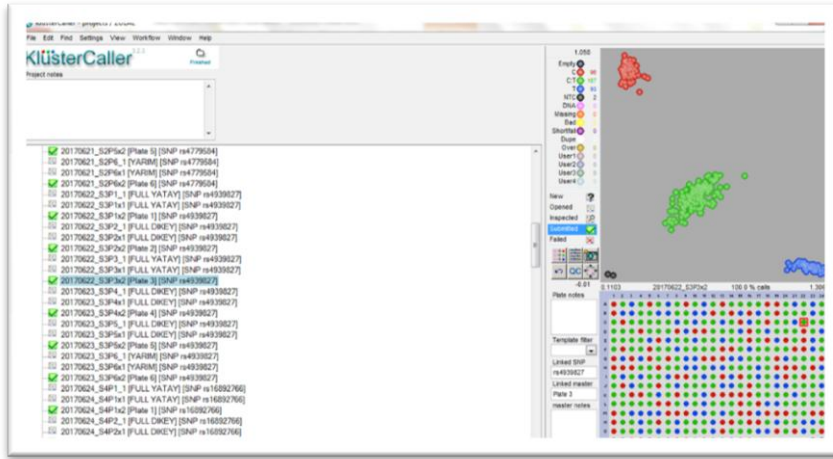
15q13.3	SCG5, GREM1	Rs4779584	4.44×10^{-14}	Jaeger vd. 2008, Tomlinson vd. 2011
15q13.3	SCG5, GREM1	Rs16969681	5.33×10^{-8}	Jaeger vd. 2008, Tomlinson vd. 2011
15q13.3	SCG5, GREM1	Rs11632715	2.30×10^{-10}	Jaeger vd. 2008, Tomlinson vd. 2011
16q22.1	CDH1	Rs9929218	4.6×10^{-9}	Houlston vd. 2008
18q21.2	SMAD7	Rs4939827	1.0×10^{-12}	Broderick vd. 2007
19q13.11	RHPH2, GPATCH1	Rs10411210	4.6×10^{-9}	Houlston vd. 2008
20p12.3	BMP2	Rs961253	2.0×10^{-10}	Houlston vd. 2008, Tomlinson vd. 2011
20p12.3	BMP2	Rs4813802	7.52×10^{-11}	Houlston vd. 2008, Tomlinson vd. 2011
20q13.33	LAMA5	Rs4925386*	1.89×10^{-10}	Houlston vd. 2010
Xp22.2	SHROOM2	Rs5934683	7.30×10^{-10}	Dunlop vd. 2012
*işaretili TNP'ler çalışma grubumuz tarafından önceden analiz edilmiştir.				

Çizelge 5-4. Tez çalışmasında analiz edilen TNP listesi

TNP No	Kromozom Lokusu	Yakın Gen(ler)	TNP rs numarası	Genlere göre durumu	P Değeri	Referans
1	6p21.2	CDKN1A	Rs1321311	5' intergenik	1.14×10^{-10}	Dunlop vd. 2012
2	15q13.3	SCG5, GREM1	Rs4779584	GREM1 için 5' intergenik	4.44×10^{-14}	Jaeger vd. 2008, Tomlinson vd. 2011
3	18q21.2	SMAD7	Rs4939827	intronik	1.0×10^{-12}	Broderick vd. 2007
4	8q23.3	EIF3H	Rs16892766	5' intergenik	3.3×10^{-18}	Tomlinson vd. 2008
5	11q23.1	FLJ45803 (COLCA1/2)	Rs3802842	intronik varyant	5.8×10^{-10}	Tenesa vd. 2008
6	10p14	GATA3	Rs10795668	3' intergenik, ncRNA içinde	2.5×10^{-13}	Tomlinson vd. 2008
7	14q22.2	BMP4	Rs4444235	5' intergenik	8.1×10^{-10}	Houlston vd. 2008
8	16q22.1	CDH1	Rs9929218	intronik	4.6×10^{-9}	Houlston vd. 2008
9	20p12.3	BMP2 (CAS20)	Rs961253	BMP2 5'(uzak), CAS20 5'(yakın)	2.0×10^{-10}	Houlston vd. 2008, Tomlinson vd. 2011

5.3. HAM VERİLERİN ANALİZİ

Plakalara dağıtılan DNA örnekleri üzerine KASP karışımı eklendikten sonra Hydrocycler cihazında alel spesifik PCR ile TNP lokusunun verdiği floresan ışımaya Omega cihazında ölçülmüştür. Alınan ölçüm sonuçları Kluster Caller adlı program ile görünür hale getirilip analiz edilmiştir. Program her bir kuyudan gelen ışımaya sinyallerine göre alellerin homozigot veya heterozigot olması durumuna göre örnekleri XY düzleminde konumlandırır. Analiz sonuçları “csv” dosya formatında alınarak istatistiksel analize hazır hale getirilir. Şekil 5-1 ve Şekil 5-2’te Kluster Caller programı analiz görüntüleri ve csv dosya formatında sonuç görüntüleri verilmiştir.



Şekil 5-1. KlusterCaller programı temsilen seçilen rs4939827 analiz görüntüsü

Lab Kodu	Örnek	Doğ. Bölgesi	Doğ. İl	İks. Bölgesi	İks. İl	Doğ. Tarihi	Ginşyet	Lab. Kayıt Tar.	Kan Alınm Tar.	Doktor Adı/Soyadı	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
8	13/083	Kontrol	İç Anadolu	Sivas	İç Anadolu/Ankara	5960	Erkek	27.06.2013	27.06.2013	Cihangir Akçol	A/A	G/G	A/A	A/A	C/T	C/C	T/T	C/A	G/G
9	13/084	Çalışma	Marmara	Çorum	Karadeniz/Çorum	5965	Erkek	27.06.2013	27.06.2013	Cihangir Akçol	G/G	T/G	A/A	C/A	C/C	C/C	T/T	C/A	G/G
10	13/086	Çalışma	Akdeniz	Hatay	Akdeniz/Hatay	5960	Kadın	04.07.2013	04.07.2013	Ayhan Kuzu	G/G	T/G	C/A	A/A	C/C	C/C	C/T	C/A	G/G
11	13/087	Çalışma	İç Anadolu	Kırşehir	İç Anadolu/Ankara	5950	Erkek	04.07.2013	02.07.2013	Bülent Erkek	G/A	G/G	A/A	A/A	C/T	C/C	C/T	C/A	A/A
12	13/088	Kontrol	Karadeniz	Samsun	İç Anadolu/Ankara	5978	Erkek	04.07.2013	28.06.2013	Cihangir Akçol	G/G	G/G	A/A	A/A	C/T	C/C	T/T	C/A	G/G
13	13/089	Kontrol	İç Anadolu	Kırkkilise	İç Anadolu/Ankara	5960	Kadın	04.07.2013	02.07.2013	Cihangir Akçol	A/A	T/G	A/A	C/A	C/T	C/C	C/T	C/A	G/G
14	13/090	Kontrol	Marmara	Bilecik	Marmara/Bilecik	5960	Erkek	04.07.2013	02.07.2013		G/G	T/G	A/A	C/A	C/C	C/C	A/A	G/G	
15	13/091	Çalışma	Marmara	Balıkesir	Marmara/Balıkesir	5944	Erkek	08.07.2013	05.07.2013	Ayhan Kuzu	G/A	G/G	A/A	C/A	C/T	C/C	T/T	C/A	G/G
16	13/092	Çalışma	İç Anadolu	Ankara	İç Anadolu/Ankara	5973	Erkek	08.07.2013	05.07.2013	Bülent Erkek	G/A	G/G	A/A	A/A	C/T	T/T	C/C	C/A	G/G
17	13/093	Çalışma	Karadeniz	Trabzon	Karadeniz/Trabzon	5959	Erkek	08.07.2013	02.07.2013	Dr. Reyhan Yıldırım	G/A	T/G	A/A	C/A	C/C	C/C	C/C	C/A	G/G
18	13/094	Çalışma	Karadeniz	Rize	Karadeniz/Rize	5956	Erkek	08.07.2013	03.07.2013	Dr. Mehmet Uluşel	T/G	A/A	C/A	C/A	C/C	C/C	T/T	C/A	G/G
19	13/095	Kontrol	İç Anadolu	Kırşehir	İç Anadolu/Ankara	5959	Erkek	08.07.2013	05.07.2013	Cihangir Akçol	G/A	G/G	A/A	A/A	T/T	C/C	C/C	C/A	G/G
20	13/096	Kontrol	Karadeniz	Rize	Marmara/İstanbul	5950	Erkek	08.07.2013	03.07.2013	Prof. Dr. Mehmet Kar	G/A	G/G	C/A	A/A	C/C	C/C	C/C	C/A	G/G
21	13/097	Kontrol	Güney Doğu A	Şanlıurfa	Akdeniz/Adana	5961	Kadın	10.07.2013	01.07.2013	Sefa Özyazıcı	G/G	T/G	A/A	C/A	C/C	C/C	C/T	C/A	G/G
22	13/098	Kontrol	Akdeniz	Adana	Akdeniz/Adana	5959	Erkek	10.07.2013	01.07.2013	Sefa Özyazıcı	G/G	T/T	A/A	C/A	C/T	C/C	C/C	C/A	G/G
23	13/099	Kontrol	Akdeniz	Adana	Akdeniz/Adana	5941	Kadın	10.07.2013	01.07.2013	Sefa Özyazıcı	G/A	G/G	C/A	A/A	C/T	C/C	T/T	C/A	G/G
24	13/100	Kontrol	Doğu Anadolu	Bitlis	Akdeniz/Adana	5969	Kadın	10.07.2013	08.07.2013	Sefa Özyazıcı	G/G	T/T	C/A	A/A	C/T	C/C	C/C	A/A	G/G
25	13/101	Kontrol	Güney Doğu A	Gaziantep	Akdeniz/Adana	5969	Kadın	10.07.2013	08.07.2013	Sefa Özyazıcı	G/G	T/G	A/A	A/A	T/T	C/C	C/C	C/A	A/A
26	13/102	Kontrol	Güney Doğu A	Mardin	Akdeniz/Adana	5962	Kadın	10.07.2013	08.07.2013	Sefa Özyazıcı	A/A	T/G	A/A	A/A	C/T	C/C	C/T	C/A	G/G
27	13/103	Kontrol	İç Anadolu	Ankara	İç Anadolu/Ankara	5977	Kadın	17.07.2013	16.07.2013	Ayhan Kuzu	G/A	T/G	A/A	C/A	C/T	C/C	C/C	C/A	G/G
28	13/104	Kontrol	Akdeniz	Osmaniye	Akdeniz/Osmaniye	5962	Kadın	10.07.2013	08.07.2013	Sefa Özyazıcı	G/A	G/G	A/A	A/A	C/T	C/C	T/T	C/A	G/G
29	13/105	Çalışma	Karadeniz	Tokat	Marmara/Bolu	5951	Erkek	10.07.2013	02.07.2013	Prof. Dr. N. Şengül	G/A	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	C/T	C/A	G/G
30	13/106	Kontrol	Marmara	Bolu	Marmara/Bolu	5954	Kadın	10.07.2013	09.07.2013	Prof. Dr. N. Şengül	G/A	T/G	A/A	C/A	C/C	C/C	C/T	C/A	G/G
31	13/107	Çalışma	Marmara	Bolu	Marmara/Bolu	5964	Kadın	10.07.2013	04.07.2013	Prof. Dr. N. Şengül	G/G	T/G	A/A	C/A	C/T	C/C	C/T	C/A	G/G
32	13/108	Kontrol	Karadeniz	Tokat	Marmara/Bolu	5966	Kadın	10.07.2013	02.07.2013	Prof. Dr. N. Şengül	G/A	T/T	A/A	C/A	C/T	C/C	C/T	C/A	G/G
33	13/109	Kontrol	Marmara	Bolu	Marmara/Bolu	5975	Kadın	10.07.2013	02.07.2013	Prof. Dr. N. Şengül	A/A	T/G	A/A	C/A	C/T	C/C	C/C	C/A	A/A
34	13/110	Çalışma	İç Anadolu	Kayseri	Ege/Muğla	5993	Erkek	10.07.2013	10.07.2013	Süleyman Deniz K'G A	T/G	A/A	A/A	T/T	C/C	C/C	C/C	C/A	G/G
35	13/111	Çalışma	İç Anadolu	Gaziantep	İç Anadolu/Ankara	5961	Erkek	10.07.2013	10.07.2013	Süleyman Deniz K'G A	T/T	A/A	A/A	T/T	C/C	C/C	C/T	C/A	G/G

Şekil 5-2. Analiz sonuçlarının .csv formatındaki görünümü

5.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

5.4.1. Asosiyasyon Analizi

1967 örnekte 9 TNP için yapılan genotiplendirme analizleri için Ki kare testi kullanılmıştır. Ki kare testi ile beklenen ve gözlenen arasındaki fark saptanmıştır. Analizler; tüm Türkiye, doğum yeri, ikamet adresi 7 coğrafik bölge esas alınarak yapılmıştır. Aşağıdaki çizelgelerde yapılan analizlerin sonuçları verilmiştir.

Çizelge 5-5. Türkiye geneli istatistiki olarak anlamlı bulunan TNP listesi

SNP	rs Numarası	n	Kayıp veri (n)	Ki-Kare	p-değeri	Kromozom	Gen Sembolü
1	Rs1321311	1967	52	14,077	2×10^{-4} *	6p21.2	<i>CDKN1A</i>
2	Rs4779584	1967	119	1,04	0,3078	15q13.3	<i>SCG5, GREM1</i>
3	Rs4939827	1967	44	7,261	7×10^{-3} *	18q21.2	<i>SMAD7</i>
4	Rs16892766	1967	66	16,513	1×10^{-4} *	8q23.3	<i>EIF3H</i>
5	Rs3802842	1967	40	8,272	4×10^{-3} *	11q23.1	<i>FLJ45803 (COLCA1/2)</i>
6	Rs10795668	1967	30	5,601	0,0179*	10p14	<i>GATA3</i>
7	Rs4444235	1967	25	5,786	0,0162*	14q22.2	<i>BMP4</i>
8	Rs9929218	1967	29	0,103	0,7485	16q22.1	<i>CDHI</i>
9	Rs961253	1967	32	11,231	8×10^{-4} *	20p12.3	<i>BMP2 (CAS20)</i>

*istatistik olarak anlamlı bulunanlar

Türkiye genelinde analiz ettiğimiz 9 TNP arasından 7 tanesinin (rs1321311, rs4939827, rs16892766, rs3802842, rs10795668, rs4444235 ve rs961253) p değerleri 0,05'ten düşük çıkmıştır. Çıkan bu sonuçlar 7 TNP'nin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir (Çizelge 5-5).

Örneklerin doğum yeri bölgesine göre ki-kare testi yapıldığında p değeri 0,05'ten düşük olan 6 TNP için 10 farklı p değeri bulunmuştur. Doğum yeri bilgilerine İç Anadolu'da rs1321311 ve rs16892766, Doğu Anadolu'da rs1321311, rs4939827 ve rs16892766, Akdeniz'de rs1321311 ve rs4779584, Karadeniz'de rs16892766, Marmara'da rs10795668, Güney Doğu Anadolu'da ise rs961253 anlamlı bulunmuştur (Çizelge 5-6).

Çizelge 5-6. Doğum yeri bilgilerine göre Türkiye'nin 7 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunan TNP'lerin listesi

Doğum Yerine Göre Ki-Kare Testi p<0,05 Olan TNP'ler							
rs Numarası	Bölge	n	Kayıp (n)	Ki-Kare	p-değeri	p<0.05	p<0.1
rs1321311	İç Anadolu	349	5	10.387	0.0013	*	*
	Akdeniz	289	12	6.649	0.0099	*	*
	Doğu Anadolu	240	6	6.546	0.0105	*	*
rs4779584	Akdeniz	289	23	4.099	0.0429	*	*
rs4939827	Doğu Anadolu	240	7	29.007	0.0092	*	*
rs16892766	İç Anadolu	349	12	4.813	0.0282	*	*
	Doğu Anadolu	240	6	6.271	0.0123	*	*
	Karadeniz	491	16	6684	0.0097	*	*
rs10795668	Marmara	263	7	10414	0.0013	*	*
rs961253	Güneydoğu Anadolu	118	1	5.378	0.0204	*	*

Yapılan genotipleme analizleri sonucu ikamet yeri bilgilerine göre ki-kare testi uygulanan örneklerde 7 TNP 13 farklı 0,05'ten küçük p değeri ile değişik bölgelerde kolorektal kanser ile ilişkili çıkmıştır. İç Anadolu'da rs1321311, rs4939827, rs16892766, Akdeniz'de rs1321311, rs4779584, rs4939827, rs16892766, Doğu Anadolu'da rs1321311 ve rs10795668, Karadeniz'de rs16892766, Güneydoğu Anadolu'da rs4444235, Marmara bölgesinde ise rs10795668 ve rs961253'ün p değerleri 0,05'ten düşük çıkmıştır (Çizelge 5-7).

Çizelge 5-7. İkamet bölgesine göre Türkiye'nin 7 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı çıkan TNP listesi

İkamet Bölgesine Göre Ki-Kare Testi p<0,05 Olan TNP Listesi							
rs Numarası	Bölge	n	Kayıp (n)	Ki-Kare	p-değeri	p<0.05	p<0.1
rs1321311	İç Anadolu	386	5	5,192	0,0227	*	*
	Akdeniz	348	14	12,34	4,00E-04	*	*
	Doğu Anadolu	127	5	5,279	0,0216	*	*
rs4779584	Akdeniz	348	26	6,299	0,0121	*	*
rs4939827	İç Anadolu	386	6	4,816	0,0282	*	*
	Akdeniz	348	8	4,107	0,0427	*	*
rs16892766	İç Anadolu	386	13	6,729	0,0095	*	*
	Akdeniz	348	13	5	0,0253	*	*
	Karadeniz	330	10	5,013	0,0252	*	*
rs10795668	Doğu Anadolu	127	1	4,155	0,0415	*	*
	Marmara	419	9	10,68	0,0011	*	*
rs4444235	Güneydoğu Anadolu	50	0	5,784	0,0162	*	*
rs961253	Marmara	419	11	6,409	0,0114	*	*

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kompleks hastalıklarda etkin olabilecek genetik bileşenlerin ortaya çıkarılması için mevcut en etkin yaklaşım olan genom boyu asosiyasyon çalışmaları 2 aşamalı olarak planlanmaktadır. Birinci aşamada geniş hasta ve kontrol popülasyonlarında tüm genomun taranması yolu ile hastalıkla ilişkili TNP'ler saptanmakta, ikinci aşamada ise bu TNP'ler bağımsız ve geniş hasta, kontrol popülasyonlarında valide edilmektedir. Kompleks hastalıklarda ilgili hastalıkla ilişkili bulunmuş olan TNP'lerin başka popülasyonlarda çalışılması durumunda bu ilişkinin tekrar tespit edilememesi durumu ile sıkça karşılaşılabilmektedir (33,34). Bu durum asosiyasyon çalışmaları özellikle dar hasta, kontrol grupları ile yapıldığında ortaya çıkmaktadır.

Diğer yandan kompleks hastalıklarda hastalığa genetik yatkınlık profili toplumdaki topluma da farklılık gösterebilmektedir (33,34). İşte bu nedenlerden ötürü bu tez çalışmasında Avrupa popülasyonlarında KRK ile ilişkili bulunmuş TNP'lerin Türk popülasyonunda KRK ile ilişkili olup olmadığı sorgulanmak istenmiştir.

Bu amaçla, bu tez çalışmasında Avrupa popülasyonlarında geniş çapta popülasyonlarda yapılmış ve yüksek istatistiksel değerler ile kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş olan tekli nükleotit çalışmaları derin bir literatür araştırması ile belirlenmiş ve söz konusu tekli nükleotit polimorfizmlerinden seçilen TNP'ler geniş çaptaki Türk popülasyonunda doğrulanmıştır.

Avrupa popülasyonunda tanımlanmış 25 TNP'den (Çizelge 5-3) 7 tanesi daha önce grubumuz tarafından çalışılmış ve yalnızca TNP (rs6983267) KRK ile ilişkili bulunmuştu. Bu çalışmada ise bu TNP'lerden 9 tanesi seçilmiştir (Çizelge 6-1). TNP'lerin seçimi, p değerleri, yakınındaki veya içinde bulunduğu genler, kanser ve kolorektal kanser yollarında rol almaları, literatürdeki yeri ve rastlanma sıklığı gibi kriterler ile yapılmıştır.

Avrupa popülasyonunda tanımlanmış olan TNP'lerin analiz edilmesinin amacı ise, Türkiye'ye coğrafik yakınlığı ve toplumlar arasındaki benzerliktir. Türklerin yakın zamana kadar olan tarihine baktığımızda Orta Asya'dan başlayan ve Avrupa'ya kadar uzanan bir göç geçmişi vardır. Bu da toplumların sürekli etkileşim içinde olmasına neden olmaktadır. Ayrıca Türkiye'nin jeopolitik konumuna baktığımızda ise önemli ticaret yolları üzerinde

bulduğunu bilmekteyiz. Tekli nükleotit polimorfizmleri gibi bireyler arasında ve popülasyonlar arasında farklılık gösteren genetik varyasyonlar genetik belirteçler olarak kullanılmaktadır. Bu çeşitlilikten dolayı popülasyonların kendi içinde anlamlı olan polimorfizmleri belirlemeleri gerekmektedir. Yapılan çalışmalara baktığımızda ise Türk popülasyonunun Avrupa toplumuna özellikle Güney Avrupa ve Akdeniz gen havuzuna genetik olarak daha çok benzediği görülmüştür (40).

Tez çalışmasında analiz edilen TNP'lerin bilgileri, yakınındaki genler ve genlere göre durumu ve referansları (rs1321311, rs4779584, rs4939827, rs16892766, rs3802842, rs10795668, rs4444235, rs9929218, rs961253) Çizelge 6-1'de gösterilmiştir (41-46). Yapılan Cochran-Armitage Ki-kareli eğilim testi ile $p < 0,05$ olan istatistiki olarak anlamlı bulunmuş olan 7 TNP vardır (rs1321311, rs4939827, rs16892766, rs3802842, rs10795668, rs4444235, rs961253).

Çizelge 6-1. Tez çalışmasında analiz edilen ve anlamlı bulunan TNP'ler

SNP	rs Numarası	n	Kayıp Veri (n)	Ki-Kare	p-değeri	Kromozom	Gen Sembolü
1	Rs1321311	1967	52	14,077	2×10^{-4}*	6p21.2	<i>CDKN1A</i>
2	Rs4779584	1967	119	1,04	0,3078	15q13.3	<i>SCG5, GREM1</i>
3	Rs4939827	1967	44	7,261	7×10^{-3}*	18q21.2	<i>SMAD7</i>
4	Rs16892766	1967	66	16,513	1×10^{-4}*	8q23.3	<i>EIF3H</i>
5	Rs3802842	1967	40	8,272	4×10^{-3}*	11q23.1	<i>FLJ45803 (COLCA1/2)</i>
6	Rs10795668	1967	30	5,601	0,0179*	10p14	<i>GATA3</i>
7	Rs4444235	1967	25	5,786	0,0162*	14q22.2	<i>BMP4</i>
8	Rs9929218	1967	29	0,103	0,7485	16q22.1	<i>CDH1</i>
9	Rs961253	1967	32	11,231	8×10^{-4}*	20p12.3	<i>BMP2 (CAS20)</i>

*İstatistiki olarak anlamlı bulunanlar

Tez çalışmasında analiz edilen ve anlamlı bulunan TNP'lerin literatür taraması yapıldığında ise farklı popülasyonlar yapılmış birçok çalışmada bu polimorfizmlerin sporadik kolorektal kanser ile ilişkilendirildiği görülmektedir. Aşağıdaki çizelgede bu polimorfizmlerin analiz edildiği popülasyonlar, hasta/kontrol sayıları, p değerleri ayrıntılı bir şekilde verilmiştir (Çizelge 6-2).

Çizelge 6-2. Tezde analiz edilen TNP'lerin literatür taraması

rs Numarası	Kromozom	Gen	Hasta/Kontrol	p Değeri	Popülasyon	Kaynak	Yıl	Analiz	Sonuç
Rs1321311	6p21.2	CDKN1A	21096/ 19555	1.14×10^{-10}	Avrupa ve 1 Japon	Dunlop vd.	201 2	Meta-Analiz	KRK ilişkili
			1160/ 9180	4.2×10^{-3}	Avrupa, Amerika	Kantor vd.	201 4	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			776	<0.05	Kore	Kang vd.	201 5	Genotiplendirme	TT genotipi kötü Hayatta kalımla ilişkili
Rs4939827	18q21.2	SMAD7	7423/ 5984	1.0×10^{-12}	Avrupa	Broderick vd.	200 7	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			10731/ 10961	1.7×10^{-6}	Avrupa	Tomlinson vd.	200 8	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			17457/ 16353	7.8×10^{-28}	Avrupa, Kanada, Japonya İsrail	Tenesa vd.	200 8	Genotiplendirme	KRK ilişkili
Rs16892766	8q23.3	EIF3H	10731/ 10961	3.3×10^{-18}	Avrupa	Tomlinson vd.	200 8	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			684	1×10^{-4}	Avrupa, Avusturalya	Talseth- Palmer vd.	201 1	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			927	$0,003$	Avusturalya, Amerika, Kanada	Win vd.	201 3	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			34620/ 39296	$< 0,001$	Beyaz ırk, Afrika	Li vd.	201 5	Meta-Analiz	KRK ilişkili
Rs3802842	11q23.1	COLCA1/2	3311/ 4466	4×10^{-5}	Avrupa, Amerika, Japon, Afrika	He vd.	201 1	Genotiplendirme	KRK ilişkili (Avrupalı Amerikan)
					Hücre Kültürü	Biancolella	201 4	Fonksiyonel	KRK ilişkili
			1030/ 1061	$< 0,002$	Kanada	Peltekova vd.	201 4	Fonksiyonel	KRK ilişkili
			419	$0,04$	Avrupa	Ghorbanoghli vd.	201 6	Genotiplendirme	KRK ilişkili
Rs10795668	10p14	GATA3	10731/ 10961	6.9×10^{-12}	Avrupa	Tomlinson vd.	200 8	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			489/781	$< 0,05$	Amerika	Burnett- Hartman vd.	201 4	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			37294/ 41037	$<0,001$	Avrupa, Amerika, Asya, Afrika	Hong vd.	201 6	Meta-Analiz	KRK ilişkili
Rs4444235	14q22.2	BMP4	20186/ 20855	8.1×10^{-10}	Avrupa	Houlston vd.	200 8	Meta-Analiz	KRK ilişkili
			4327	$0,0015$	Avrupa	Morris vd.	201 5	Genotiplendirme	CC aleli kötü hayatta kalımla ilişkili
			58626/ 88068	$<10^{-4}$	Beyaz ırk, Afrikan Amerikan, Doğu Asya	Zhou vd.	201 5	Meta-Analiz	KRK ilişkili (Avrupa ve Asya)
Rs961253	20p12.3	BMP2 (CAS20)	20186/ 20855	2.0×10^{-10}	Avrupa	Houlston vd.	200 8	Meta-Analiz	KRK ilişkili
			24910/ 26275	1.89×10^{-15}	Avrupa	Tomlinson vd.	201 1	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			641/ 1037 29859/ 29696	$<0,001$	Çin, Avrupa	Zheng vd.	201 2	Genotiplendirme / Metaanaliz	KRK ilişkili
			641/ 1037	2.0×10^{-10}	Çin, Avrupa	Khan vd.	201 3	Genotiplendirme / Metaanaliz	KRK ilişkili

rs1321311, p=2x10⁻⁴

rs1321311 G>T değişimi 6p21.2’de yer almaktadır ve p=2x10⁻⁴ değeri ile çalışma grubumuzda kolorektal kanser ile ilişkili bulunmuştur.

Literatüre baktığımızda ise rs1321311 değişimi farklı çalışmalarda kolorektal kanser ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (42,47,48). rs1321311 polimorfizmini taşıyanların yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, alkol tüketimi, sigara kullanımı, menopoz sonrası hormonlar, aspirin kullanımı, lifli gıda, kalsiyum, folat, kırmızı et, işlenmiş et, meyve sebze gibi beslenme alışkanlıkları olanların bağımsız olarak kolorektal kanser riski taşıdığını göstermiştir (48). Dunlop ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları metaanaliz çalışması sonucunda rs1321311 polimorfizminin kolorektal kanser prognozunda önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (42). Kang ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı bir çalışmada ise TT genotipinin kötü hayatta kalım sonuçlarına neden olduğu gösterilmiştir (47) (izelge 6-3).

Çizelge 6-3. rs1321311 polimorfizminin literatür taraması

Rs No	Kromozom	Gen	Hasta/ Kontrol	p Değeri	Popülasyon	Kaynak	Yıl	Analiz	Sonuç
Rs1321311	6p21.2	<i>CDKN1A</i>	21096/ 19555	1.14 × 10⁻¹⁰	Avrupa ve Japon	Dunlop vd.	2012	Meta-Analiz	KRK ilişkili
			1160/ 9180	4.2 × 10⁻³	Avrupa, Amerika	Kantor vd.	2014	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			776	p<0,05	Kore	Kang vd.	2015	Genotiplendirme	TT genotipi kötü hayatta kalımla ilişkili

rs1321311 polimorfizmi yaklaşık 21kb yakınındaki *CDKN1A* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A veya P21) geni ile kolorektal kanser ile ilişkilidir (şekil 6-1). *CDKN1A*, siklin bağımlı kinaz inhibitör ailesine ait korunmuş genidir. *CDKN1A*’nın kodladığı *p21* proteini siklin bağımlı kinaz 2 ve 4 (*CDK2*, *CDK4*)’e bağlanarak, G1 fazında hücre bölünmesini inhibe eder. *CDKN1A* hücre bölünmesinde, farklılaşmada, migrasyonda, senesens ve apoptoz gibi önemli hüresel yolaklarda rol alır. Bu genin ifadesi *p53* geni tarafından kontrol edilir. DNA hasarı gibi stres durumlarında *p53*-bağımlı hücre döngüsünün G1 fazında CDK’lara bağlanarak CDK substratlarının fosforilasyonunu inhibe edip hücre bölünmesini durdurur. *CDKN1A*, PCNA (proliferating cell nuclear antigen, DNA polimeraz

delta kofaktörü)'ya bağlanarak DNA replikasyonu ve DNA hasar tamirinde düzenleyici rol oynar. *CDKN1A* genini baskılayan herhangi bir gende meydana gelen mutasyon tümör gelişimine neden olmaktadır. *MYC* (proto-onkogen) geninin ifadesinin artması ile *CKN1A* geni baskılanır ve tümörigenez başlar (42,47,49). Azalan p21 ifadesinin kolonik mukozasında adenomalara sebep olduğu görülmüştür (42).

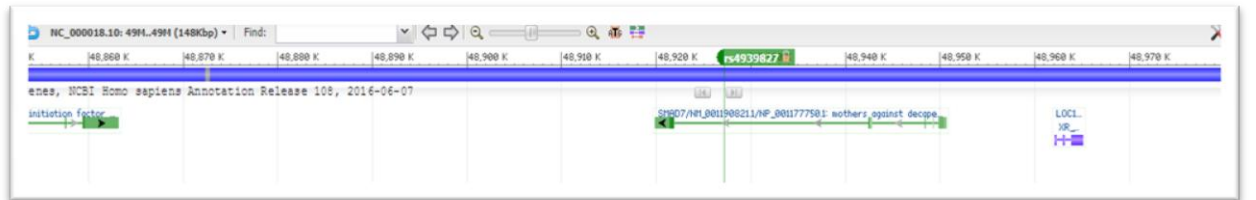


Şekil 6-1. rs1321311 G>T değişiminin genel görüntüsü

Literatürdeki bu verilere göre rs1321311 geni hücre döngüsünde önemli role sahip *CDKN1A* geni ile kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan GWAS ve metaanaliz sonuçlarına göre ise kolorektal kanser prognozunda biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Geniş çaptaki Türk popülasyonunda yapmış olduğumuz tez çalışmasından elde edilen p değeri ve hücre döngüsü ve kanser yollarında önemli rollere sahip olan *CDKN1A* geni düşünüldüğünde ise rs1321311 polimorfizmi kolorektal kanser risk artışına ve genetik yatkınlığa sebep olabilir.

rs4939827, p=7x10⁻³

rs4939827 T>C değişimi 18q21.2'de *SMAD7* geninin üçüncü intronunda lokalizedir (Şekil 6-2). Tez çalışma grubumuzda p=7x10⁻³ değeri ile kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiştir. Literatürde farklı çalışmalarda kolorektal kanser ile klinik olarak ilişkilendirilmiştir (41,44,46). OMIM veri tabanına bakıldığında ise rs1939827 T>C değişimi *SMAD7* genindeki değişimlerden kaynaklı olarak *CRCS3* (colorectal cancer, susceptibility to 3, #612229) ile risk faktörü olduğu bildirilmiştir.



Şekil 6-2. rs4939827 değişiminin genel görüntüsü

Broderick ve arkadaşlarının 2007 yılında, 7.473 hasta 5.984 kontrol üzerinde 550.163 işaretli TNP ile yaptıkları genom boyu asosiyasyon çalışması ile *SMAD7* geni 3. intronunda 3 TNP tanımlamışlardır. rs4939827 T>C değişimi $p=1 \times 10^{-12}$ değeri ile kolorektal kanser ile yüksek istatistiki derecede ilişkili bulunmuştur (41). Tomlinson ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları genom boyu asosiyasyon çalışması sonuçlarına göre rs4939827 yüksek istatistiki değerler ile kolorektal kanser risk haritasında *SMAD7* geni intron 3'te konumlanmıştır (46). Tenesa ve arkadaşlarının 2007 yılında 7 farklı popülasyondan 14.500 hasta 13.294 kontrol üzerinde yaptıkları genom boyu asosiyasyon çalışması ile rs4939827 değişimi kolorektal kanser ile ilişkili bulunmuştur. Rektal kanserdeki risk faktörü kolon kanserindeki risk faktöründen daha fazladır (44) (Çizelge 6-4).

Çizelge 6-4. rs4939827 polimorfizminin literatür taraması

Rs No	Kromozom	Gen	Hasta/ Kontrol	p Değeri	Popülasyon	Kaynak	Yıl	Analiz	Sonuç
Rs4939827	18q21.2	SMAD7	7,423/ 5,984	1.0×10^{-12}	Avrupa	Broderick vd.	2007	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			10,731/ 10,961	1.7×10^{-6}	Avrupa	Tomlinson vd.	2008	Genotiplendirme	KRK ilişkili
			17,457/ 16,353	7.8×10^{-28}	Avrupa, Kanada, Japonya İsrail	Tenesa vd.	2008	Genotiplendirme	KRK ilişkili

SMAD7, *TGβ* reseptör 1 (Transforming Growth Factor Receptor1, *TGβR1*)'e bağlanarak *TGβR1*'in degradasyonuna neden olur. *SMAD7* tarafından kodlanan nükleer protein, E3 ubikütin ligaz *SMURF2* proteinine bağlanır ve bu protein kompleksi sitoplazmaya geçerek *TGβR1* ile etkileşime girerek degradasyonuna neden olur. *SMAD7* geninin ifadesi *TGβR1* tarafından indüklenir. *SMAD7* ve *TGβ* antagonistik olarak çalışırlar. *TGβ* büyüme, farklılaşma, inflamasyon, immün ve immün olmayan hücrelerin membran reseptörleri ile etkileşimi aracılığı ile fonksiyonlarını düzenleyen bir sitokindir (50).

rs4939827 T>C değişimini literatürde kolorektal kanser ile güçlü bir risk faktörü olarak ilişkili olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir. rs4939827 polimorfizminin ilişkili olduğu *SMAD7* geni ve *TGβ* geni kansere sebep olabilecek yollarda birlikte rol almaktadırlar. Türk popülasyonunda yaptığımız bu tez çalışmasında ise $p=0,007$ değeri ile rs4939827

	927	1×10^{-3}	Avusturalya, Amerika, Kanada	Win vd.	2013	Genotiplendirme	KRK İlişkili
	34620/ 39296	$< 0,001$	Beyaz ırk, Afrika	Li vd.	2015	Meta-Analiz	KRK İlişkili

EIF3H geni, ökaryotik gen translasyonun başlaması için gerekli olan önemli bir moleküldür. Hücre döngüsü, farklılaşma, apoptoz gibi birçok biyolojik yolda önemli rollere sahiptir. 40S ribozoma bağlanarak stabilize eder ve mRNA'nın başlangıç kodonunu taramasıyla translasyonu başlatır. Fazla ifade edilmesi kanser hücrelerine büyüme avantajı sağlar.

Tez çalışmamızda rs16892766 A>C değişimi $p=1 \times 10^{-4}$ değeri ile Türk toplumu için anlamlı bulunmuştur. Literatürdeki veriler ve tez çalışmasındaki veriler göz önüne alındığında Türk toplumu için, rs16892766 değişimi ve *EIF3H* geni kolorektal kanser riskini artırıcı etki taşıyor olabilir.

rs3802842 $p=4 \times 10^{-3}$

rs3802842 A>C değişimi 11q23.1'de çakışan genler olan *COLCA1* ve *COLCA2* (Colorectal cancer associated 1,2) genlerinin intronik bölgesinde lokalize olan bir polimorfizmdir. rs3802842 100kb'lık çevresinde *COLCA1*, *COLCA2*, *POU2AF1* (POU Class 2 Associating Factor 1) ve *C11orf53* (Chromosome 11 Open Reading Frame 53) genlerine ait 4 farklı ORF (open reading frame) içeren zengin bir bölgede yer almaktadır (Şekil 6-4).



Şekil 6-4. rs3802842 A>C değişimi 11q23.1 genel görünümü

Çizelge 6-6. rs3802842 polimorfizminin literatür taraması

Rs No	Kromozom	Gen	Hasta/ Kontrol	p Değeri	Popülasyon	Kaynak	Yıl	Analiz	Sonuç
Rs3802842	11q23.1	COLCA1/ COLCA2	3311/ 4466	4×10^{-5}	Avrupa, Amerika, Japon, Afrika	He vd.	2011	Genotiplendirme	KRK ilişkili (Avrupalı Amerikan)
					Hücre Kültürü	Biancolella	2014	Fonksiyonel	KRK ilişkili
			1030/ 1061	$< 0,002$	Kanada	Peltekova vd.	2014	Fonksiyonel	KRK ilişkili
			419	$0,04$	Avrupa	Ghorbanoghli vd.	2016	Genotiplendirme	KRK ilişkili

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar rs3802842 polimorfizmini erken dönem (50 yaş öncesi) ve aile hikayesi olan bireylerde kolorektal kanser riski ile ilişkilendirmiştir. Lynch sendromlu ve bu polimorfizmi taşıyan bireylerde kolorektal kanser riski artışına neden olduğu görülmüştür. Açıklanamayan poliplerin olduğu hastalarda ise bu polimorfizm ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (54). Ghorbanoghli ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada 8q23.3 ve 11q23.3 lokasyonlarındaki risk varyantlarının birbirleri ile ve kolorektal kanser ile ilişkileri analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, 100'den fazla şiddetli adenomaya sahip kodominant kalıtım gösteren hastalar ve rs3802842 polimorfizmi arasında sınırda bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Dominant ve resesif kalıtım modeline ile kalıtım gösteren ve 100'den fazla adenomaya sahip hastalar ile rs3802842 polimorfizmi incelendiğinde kolorektal kanser riski ile risk aleli arasındaki ilişki eğiliminin daha fazla olduğu görülmüştür (54). Biancolella ve arkadaşlarının 2014 yılında 11q23.1 bölgesindeki risk varyantlarını tanımlamak ve karakterize etmek için yaptıkları çalışmada, rs3802842 polimorfizminin tek başına fonksiyonel bir TNP olmadığını ama fonksiyonel TNP'ler ile bağlantı dengesizliği içerisinde bulunduğunu göstermişlerdir. Bu TNP'ler yine aynı kromozomal bölgede genlerin promotor bölgelerindeki rs10891246 ve rs7130173 değişimleridir (55). Peltekova ve arkadaşlarının 2014 yılında Kanada'da 1.030 hasta 1.061 kontrol üzerinde yaptıkları çalışmada *COLCA1* ve *COLCA2* transkriptlerinin rs3802842 değişimi ile korelasyon içinde olduğu bildirilmiştir (56). He ve arkadaşlarının 2011 yılında

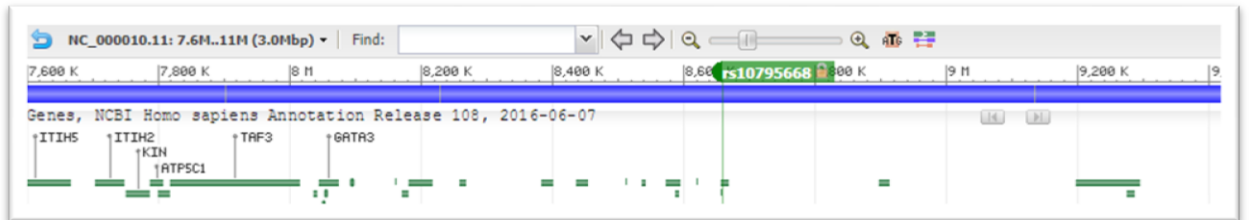
Avrupalı Amerikan, Afrikalı Amerikan, Havaii, Japon Amerikan ve Latinlerden oluşan 2.472 kolorektal kanser, 839 adenoma ve 4.466 kontrol olmak üzere bir çok farklı popülasyon üzerinde yapılan çalışmada farklı polimorfizmler çalışılmıştır. rs3802842 polimorfizmi Avrupalı Amerikan popülasyonunda anlamlı bulunmuştur (39) (Çizelge 6-6).

COLCA1 ve onunla çakışan *COLCA2* geni kolorektal kanser yakınlık lokusu içermektedir. Son yıllarda karakterize edilmiş olan *COLCA1* ve *COLCA2* genleri, karşı zincirlerden transkribe olan, birlikte düzenlenen genlerdir. İfade seviyeleri rs3802842 polimorfizmi ile korelasyon içindedir. Kolon dokusunda, *COLCA1*, eozinofiller, mast hücreleri, nötrofiller, makrofajlar, dendritik hücrelerin kristaloid granüllerine bağlanan transmembran proteinleri kodlar. *COLCA2*, normal epitel hücreleri, immün hücreler ve diğer hücre kökenlerinde ve tümör hücrelerinde bulunur (56).

Literatürdeki veriler rs3802842 polimorfizminin kolorektal kanser ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Türk toplumunun genetik yatkınlığı ve risk faktörlerini belirlemek amacıyla yaptığımız tez çalışmada rs3802842 polimorfizmi p=0,004 değeri ile anlamlı çıkmıştır. Tüm bu veriler göz önüne alındığında ise rs3802842 ve kolorektal kanser arasında Türk toplumu için bir ilişki olduğu söylenebilir.

rs10795668, p=0,0179

rs10795668 A>G değişimi 10p14 konumunda yer almaktadır. Karakterize edilmemiş kodlamayan uzun RNA (LOC105376400) içerisinde bulunmaktadır. Yakın çevresinde kodlayan herhangi bir gen bulunmamaktadır. rs10795668'e en yakın *GATA3* geni bulunmaktadır (Şekil 6-5).



Şekil 6-5. rs10795668 A>G değişimi 10p14 genel görünümü

Tomlinson ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada rs10795668 değişiminin tek başına anlamlı olmadığını rs16892766 polimorfizmi ile bağlantı dengesizliği ile kolorektal

kanser riski oluşturduğunu bildirmiştir (46). Hong ve arkadaşlarının 2016 yılında Çin’de yaptıkları çalışmada rs10795668 polimorfizminin Tomlison’un verilerinden farklı olarak kolorektal kanser riski oluşturduğunu belirtmiştir. Çalışmalar arasındaki farklı sonuçların nedenlerini, rs10795668 polimorfizminin Avrupa, Afrika ve Asya popülasyonları arasında farklılık göstermesi ve yapılan çalışmalarda kullanılan örneklerin yeterliliği ile açıklamıştır (35). Burnette-Hartman ve arkadaşlarının Amerikan popülasyonunda 2014 yılında yaptıkları çalışmada rs10795668 polimorfizmi ile adenoma ve ilerlemiş adenoma arasında ilişki olduğunu göstermiştir (57) (Çizelge 6-7).

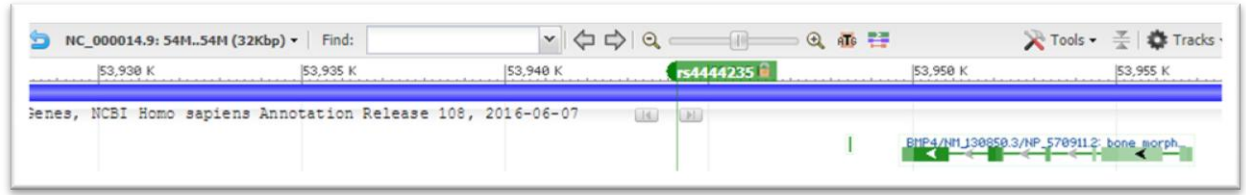
Çizelge 6-7. rs10795668 polimorfizminin literatür taraması

Rs No	Kromozom	Gen	Hasta/ Kontrol	p Değeri	Popülasyon	Kaynak	Yıl	Analiz	Sonuç
Rs10795668	10p14	GATA3	10731/ 10961	6.9×10^{-12}	Avrupa	Tomlinson vd.	2008	Genotiplendirme	KRK İlişkili
			489/781	$< 0,05$	Amerika	Burnett- Hartman vd.	2014	Genotiplendirme	KRK İlişkili
			37294/ 41037	$< 0,001$	Avrupa, Amerika, Asya, Afrika	Hong vd.	2016	Meta-Analiz	KRK İlişkili

Tez çalışmamızda rs10795668 A>G değişimi p=0,0179 ile anlamlı bulunmuştur. Literatürdeki veriler ve polimorfizmlerin popülasyonlar arası farklılık gösterebileceği göz önüne alındığında rs10795668 değişimi Türk popülasyonu için kolorektal kanser riskine ve genetik yatkınlığa neden olabileceği düşünülmektedir.

rs4444235, p=0,0162

rs4444235 T>C değişimi 14q22.2 konumunda *BMP4* (Bone Morphogenetic protein 4) transkripsiyon başlangıç bölgesine yakın bölgede bulunmaktadır. rs4444235 değişimi *BMP4* geni ile kolorektal kanser risk varyantı olarak literatüre geçmiştir (Şekil 6-6).



Şekil 6-6. rs4444235 T>C 14q22.2 değişimi genel görünümü

Houlston ve arkadaşlarının 2008 yılında Avrupa popülasyonunda yaptıkları çalışmada rs4444235 değişimi kolorektal kanser ile yüksek oranda ilişkili bulunmuştur (43). Morris ve arkadaşlarının 2015 yılında Avrupa’da yaptıkları çalışmada rs4444235 değişiminin mikrosatellit stabil kolorektal kanser ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (58). Zhou ve arkadaşlarının 2015 yılında toplam 15 yayından 58,626 kolorektal kanser ve kolorektal adenoma ve 88,098 kontrolü kapsayan meta-analiz çalışmasında 14q22.2’de lokalize rs4444235 değişimi Avrupa ve Doğu Asya popülasyonu için kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiştir (59) (Çizelge 6-8).

Çizelge 6-8. rs4444235 polimorfizminin literatür taraması

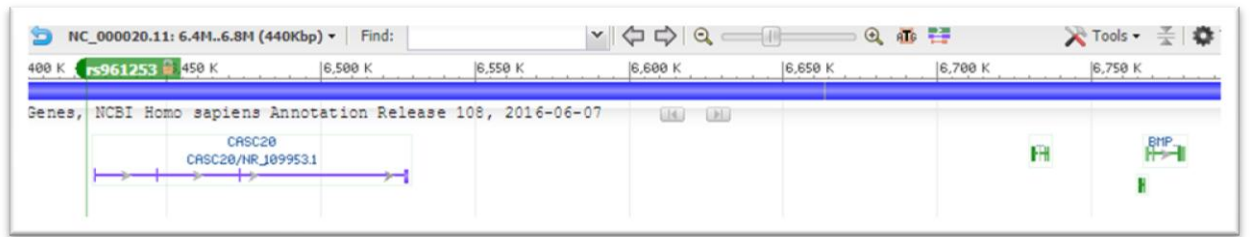
rs Numarası	Kromozom	Gen	Hasta/Kontrol	p Değeri	Popülasyon	Kaynak	Yıl	Analiz	Sonuç
Rs4444235	14q22.2	BMP4	20186/20855	8.1×10^{-10}	Avrupa	Houlston vd.	2008	Meta-Analiz	KRK İlişkili
			4,327	0,0015	Avrupa	Morris vd.	2015	Genotiplendirme	CC aleli kötü hayatta kalımla ilişkili
			58,626/88,068	$<10^{-4}$	Beyaz ırk, Afrikan Amerikan, Doğu Asya	Zhou vd.	2015	Meta-Analiz	KRK İlişkili (Avrupa ve Asya)

BMP4 geni *TGFβ* ailesinin ligandı olan proteini kodlar. Bu proteinin *TGFβ*’ya bağlanması ile *SMAD* ailesi transkripsiyon faktörleri gelir ve aktive olarak gen ifadesini düzenler. Kalp gelişimi ve adipogenezde rol alır. *BMP4* genindeki mutasyonlar *Wnt* sinyal yolağının sürekli aktive olmasına neden olarak proliferasyonun sürekli devam etmesine ve tümörigenezin başlamasına neden olur.

Yapılan çalışmalar ve tez çalışmamız dikkate alındığında rs4444235 değişimi popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Ancak, Avrupa popülasyonunda kolorektal kanser riski ile ilişkilendirilmiştir. Türk toplumunda yaptığımız çalışmada p=0,0162 değeri ile istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

rs961253, p=8x10⁻⁴

rs961253 A>C değişimi 20p12.3'te *BMP2* geninin (Bone Morphogenetic Protein 2) 5' ucu yakınında lokalizedir. Ayrıca rs961253 yakınında protein kodlamayan gen *CASC20* (cancer susceptibility 20) de bulunmaktadır (Şekil 6-7)



Şekil 6-7. rs961253 A>C 20p12.3 değişimi genel görünümü

Houlston ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada rs961253 A>C değişimi kolorektal kanserini artırıcı etki göstermektedir. C alelinin homozigot olduğu durumlar heterozigot olduğu durumlara göre daha fazla risk oluşturmaktadır (43). Tomlinson ve arkadaşlarının 2011'de yaptıkları çalışmada rs961253 değişiminin kolorektal kanser risk varyantı olduğu ve BMP yollarındaki genetik değişikliklerin kolorektal kanser yatkınlığının belirlenmesindeki önemi göstermiştir (45). Khan ve arkadaşları 2013 yılında rs961253 değişiminin kolorektal kanser ile ilişkisini fonksiyonel ve yapısal olarak gösteren ilk çalışmayı yayınlamışlardır (60). Zheng ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışma ve meta-analizde rs961253 polimorfizminin Avrupa ve Asya popülasyonları için kolorektal kanserde risk artışına neden olduğu gösterilmiştir (61) (Çizelge 6-9).

Çizelge 6-9. rs961253 polimorfizminin literatür taraması

Rs No	Kromozom	Gen	Hasta/ Kontrol	p Değeri	Popülasyon	Kaynak	Yıl	Analiz	Sonuç
Rs961253	20p12.3	<i>BMP2</i> (<i>CAS20</i>)	20186/ 20855	2.0×10^{-10}	Avrupa	Houlston vd.	2008	Meta-Analiz	KRK İlişkili
			24910/ 26275	1.89×10^{-15}	Avrupa	Tomlinson vd.	2011	Genotiplendirme	KRK İlişkili

	641/ 1037 29859/ 29696	<0,001	Çin, Avrupa	Zheng vd.	2012	Genotiplendirme / Metaanaliz	KRK ilişkili
	641/ 1037	2.0×10^{-10}	Çin, Avrupa	Khan vd.	2013	Genotiplendirme / Metaanaliz	KRK ilişkili

BMP2 geni *TGFβ* süper-ailesinin ligand proteinini kodlar. Bu proteinin *TGFβ*'ya bağlanması ile *SMAD* ailesi transkripsiyon faktörleri gelir ve aktive olarak gen ifadesini düzenler. Kodlanan protein proteolitik olarak işlenir ve disülfid bağıyla bağlı homodimer alt üniteleri kemik ve kıkırdak gelişiminde rol oynar. *BMP2*'de meydana gelen mutasyonlar tümör oluşumuna neden olmaktadır.

rs961253 A>C değişimi tez çalışmamızda $p=8 \times 10^{-4}$ değeri ile Türk toplumunda anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçları literatürdeki veriler ile değerlendirdiğimizde rs961253, Türk popülasyonu için kolorektal kanser risk varyantı ve genetik yatkınlığa sebep olabilir şeklinde yorumlanabilir.

Sonuç ve öneriler;

- ✓ Yapmış olduğumuz derin literatür taramaları sonucunda Avrupa'da geniş çaplı popülasyonlar yapılmış kolorektal kanser riski ile yüksek istatistiki güç ve anlamlılık ile ilişkilendirilmiş 25 tekli nükleotit polimorfizmi belirlenmiştir.
- ✓ 25 TNP'den 7 tanesi daha önce çalışma grubumuz tarafından analiz edilmiştir. Yalnızca rs6983267 G>T değişimi 8q24.21'de lokalize olan 1 TNP, Türk popülasyonunda kolorektal kanser ile $p=0.0018$ anlamlılık değeri ile ilişkilendirilmiştir. Diğer 6 TNP kolorektal kanser ile ilişkili bulunmamıştır.
- ✓ Bu tez çalışmasında ise, 9 TNP seçilmiş ve Türk popülasyonu için analiz edilmiştir.
- ✓ Analiz sonucunda bu 9 TNP'nin 7'si Türk toplumunda görülen KRK için en düşük $p=1 \times 10^{-4}$ ve en yüksek $p=0.0179$ değerleri ile anlamlı bulunmuştur.
- ✓ Anlamlı bulunan 7 TNP'nin tez çalışmamızdaki verileri ve literatürdeki veriler ile karşılaştırılması sonucu; TNP ve bu noktalarda bulunan kodlama yapan veya yapmayan genlerin kolorektal kanser riskini artırıcı etkisi ve genetik yatkınlığa sebep olabileceği gösterilmiştir.
- ✓ Çalışma sonuçları birleştirildiğinde, Avrupa'da sporadik kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiş 25 TNP içinden 16 tanesi Türk popülasyonunda analiz edilmiştir.
- ✓ Toplamda analiz edilen 16 TNP içinden 8 tanesi Türk popülasyonunda anlamlı bulunmuştur.
- ✓ Tez çalışmamız Türkiye'de böylesine geniş çapta bir örneklem grubunda sporadik kolorektal kanser ile ilgili yapılan genom boyu asosiyasyon çalışmalarının ilkidir.
- ✓ Elde edilen veriler popülasyonlar arasında çeşitlilik gösteren TNP'ler ile doğrulama çalışmaları yapılmasının, hastalıkla ilgili genetik yatkınlıkların belirlenmesindeki önemini göstermiştir.
- ✓ Tez çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler, çalışma ekibimizin Türk popülasyonunda daha önce yürütmüş olduğu iki aşamalı GBAÇ çalışması ile doğrulanmış olduğu 5 TNP ile beraber ileride Türk popülasyonunda kolorektal kansere genetik yatkınlığa sebep olan bölgelerin haritalanmasında, teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılmasında literatüre önemli katkılar sağlamıştır.
- ✓ Tez çalışması sonucu elde edilen verilerin gelecekte ileri analizleri yapılarak genetik yatkınlığa neden olan faktörlerin belirlenmesi sağlanmalıdır.

- ✓ Şuana kadar elde ettiğimiz ve yapılacak ileri analizler doğrultusunda elde edilecek olan veriler, Türk popülasyonunun sporadik kolorektal kanser ile ilişkili olan ve genetik yatkınlığa sebep olabilecek gen bölgelerinin haritalanması için literatüre önemli katkılarda bulunacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:479-507.
2. Stigliano V, Sanchez-Mete L, Martayan A, Anti M. Early-onset colorectal cancer: a sporadic or inherited disease? *World J Gastroenterol.* 2014;20(35):12420-12430.
3. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2015;149(5):1177-1190 e1173.
4. Tatar M, Tatar F. Colorectal cancer in Turkey: current situation and challenges for the future. *Eur J Health Econ.* 2010;10 Suppl 1:S99-105.
5. singleton a. Genomewide Association Studies and Human Disease.
6. Yi Hong GW, Wei Li, Dahai Liu, Kan He. A comprehensive meta-analysis of genetic associations between five key SNPs and colorectal cancer risk. 2016.
7. Hanahan; D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
9. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013;339(6127):1546-1558.
10. Bakanlığı TCS. Türkiye Kanser İstatistikleri. 2017; <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/2106-2014-y%C4%B1%C4%B1-t%C3%BCrkiye-kanser-istatistikleri.html>.
11. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004;10(8):789-799.
12. Russo A, Migliavacca M, Zanna I, Macaluso M, Gebbia N, Bazan V. Caretakers and Gatekeepers. 2006.
13. Kinzler KWV, B. Gatekeeper and caretakers. *Nature.* 1997;386.
14. Kinzler KWV, B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell.* 1996;87:159-170.
15. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut.* 2011;60(1):116-129.
16. Frayling IM. Colorectal Cancer: Genetics. 2006.
17. Geurts van Kessel A, Venkatachalam R, Kuiper RP. Colorectal Cancer. 2013:722-732.
18. Kudryavtseva AV, Lipatova AV, Zaretsky AR, et al. Important molecular genetic markers of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016;7(33):53959-53983.
19. Obuch JC, Ahnen DJ. Colorectal Cancer: Genetics is Changing Everything. *Gastroenterol Clin North Am.* 2016;45(3):459-476.
20. Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1).
21. Wright M, Beaty JS, Ternent CA. Molecular Markers for Colorectal Cancer. *Surg Clin North Am.* 2017;97(3):683-701.
22. Aghagolzadeh P, Radpour R. New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(25):5678-5693.
23. Dubey AP, Vishwanath S, Nikhil P, Rathore A, Pathak A. Microsatellite instability in stage II colorectal cancer: An Indian perspective. *Indian J Cancer.* 2016;53(4):513-517.

24. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-337.
25. Talseth-Palmer BA. The genetic basis of colonic adenomatous polyposis syndromes. *Hered Cancer Clin Pract*. 2017;15:5.
26. Cruz-Bustillo Clarens D. Molecular genetics of colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig*. 2004;96(1):48-59.
27. Eshghifar N, Farrokhi N, Najj T, Zali M. Tumor suppressor genes in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2017;10(1):3-13.
28. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *The Lancet*. 2014;383(9927):1490-1502.
29. Lynch HT, Watson P, Smyrk TC, et al. Colon cancer genetics. *Cancer*. 1992;70(5 Suppl):1300-1312.
30. Peters U, Bien S, Zubair N. Genetic architecture of colorectal cancer. *Gut*. 2015;64(10):1623-1636.
31. Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, Hiraishi H. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer*. 2016;35:4.
32. Kury S, Buecher B, Robiou-du-Pont S, et al. Low-penetrance alleles predisposing to sporadic colorectal cancers: a French case-controlled genetic association study. *BMC Cancer*. 2008;8:326.
33. Hardy J, Singleton A. Genomewide association studies and human disease. *N Engl J Med*. 2009;360(17):1759-1768.
34. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(12):e1002822.
35. Hong Y, Wu G, Li W, Liu D, He K. A comprehensive meta-analysis of genetic associations between five key SNPs and colorectal cancer risk. *Oncotarget*. 2016;7(45):73945-73959.
36. Ott J, Wang J, Leal SM. Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet*. 2015;16(5):275-284.
37. Pulst SM. Genetic linkage analysis. *Arch Neurol*. 1999;56(6):667-672.
38. Cumaogulları Ö. *Özge Cumaogulları Doktora Tezi*, Ankara University; 2017.
39. He J, Wilkens LR, Stram DO, et al. Generalizability and epidemiologic characterization of eleven colorectal cancer GWAS hits in multiple populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(1):70-81.
40. Alkan C, Kavak P, Somel M, et al. Whole genome sequencing of Turkish genomes reveals functional private alleles and impact of genetic interactions with Europe, Asia and Africa. *BMC Genomics*. 2014;15:963.
41. Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM, et al. A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet*. 2007;39(11):1315-1317.
42. Dunlop MG, Dobbins SE, Farrington SM, et al. Common variation near CDKN1A, POLD3 and SHROOM2 influences colorectal cancer risk. *Nat Genet*. 2012;44(7):770-776.
43. Study C, Houlston RS, Webb E, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet*. 2008;40(12):1426-1435.
44. Tenesa A, Farrington SM, Prendergast JG, et al. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. *Nat Genet*. 2008;40(5):631-637.

45. Tomlinson IP, Carvajal-Carmona LG, Dobbins SE, et al. Multiple common susceptibility variants near BMP pathway loci GREM1, BMP4, and BMP2 explain part of the missing heritability of colorectal cancer. *PLoS Genet.* 2011;7(6):e1002105.
46. Tomlinson IP, Webb E, Carvajal-Carmona L, et al. A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat Genet.* 2008;40(5):623-630.
47. Kang BW, Jeon HS, Chae YS, et al. Association between GWAS-identified genetic variations and disease prognosis for patients with colorectal cancer. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119649.
48. Kantor ED, Hutter CM, Minnier J, et al. Gene-environment interaction involving recently identified colorectal cancer susceptibility Loci. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(9):1824-1833.
49. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(6):400-414.
50. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30(3):293-298.
51. Li L, Lv L, Liang Y, et al. Association of 8q23-24 region (8q23.3 loci and 8q24.21 loci) with susceptibility to colorectal cancer: a systematic and updated meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(11):21001-21013.
52. Talseth-Palmer BA, Brenne IS, Ashton KA, et al. Colorectal cancer susceptibility loci on chromosome 8q23.3 and 11q23.1 as modifiers for disease expression in Lynch syndrome. *J Med Genet.* 2011;48(4):279-284.
53. Win AK, Hopper JL, Buchanan DD, et al. Are the common genetic variants associated with colorectal cancer risk for DNA mismatch repair gene mutation carriers? *Eur J Cancer.* 2013;49(7):1578-1587.
54. Ghorbanoghli Z, Nieuwenhuis MH, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Colorectal cancer risk variants at 8q23.3 and 11q23.1 are associated with disease phenotype in APC mutation carriers. *Fam Cancer.* 2016;15(4):563-570.
55. Biancolella M, Fortini BK, Tring S, et al. Identification and characterization of functional risk variants for colorectal cancer mapping to chromosome 11q23.1. *Hum Mol Genet.* 2014;23(8):2198-2209.
56. Peltekova VD, Lemire M, Qazi AM, et al. Identification of genes expressed by immune cells of the colon that are regulated by colorectal cancer-associated variants. *Int J Cancer.* 2014;134(10):2330-2341.
57. Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Hutter CM, et al. Variation in the association between colorectal cancer susceptibility loci and colorectal polyps by polyp type. *Am J Epidemiol.* 2014;180(2):223-232.
58. Morris EJ, Penegar S, Whiffin N, et al. A retrospective observational study of the relationship between single nucleotide polymorphisms associated with the risk of developing colorectal cancer and survival. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117816.
59. Zhou L, Xie J, Gu EL, et al. Common genetic variant on BMP4 contributes to colorectal adenoma and cancer: A meta-analysis based on 15 studies. *Cytokine.* 2015;72(2):154-159.
60. Khan W, Abduljaleel Z, Alanazi M, Elrobh M. Evidence of colorectal cancer risk associated variant Lys25Ser in the proximity of human bone morphogenetic protein 2. *Gene.* 2013;522(1):75-83.

61. Zheng X, Wang L, Zhu Y, et al. The SNP rs961253 in 20p12.3 is associated with colorectal cancer risk: a case-control study and a meta-analysis of the published literature. *PLoS One*. 2012;7(4):e34625.

8. EKLER

EK-1: Örnek Akışının Sağlandığı Merkezler

İç Anadolu	
Ankara	Ankara Üniversitesi İBİNİ SİNA Hastanesi
Ankara	Ankara Üniversitesi Cebeci Hastanesi
Ankara	Akay Hastanesi
Ankara	Gata Hastanesi
Ankara	Ank üniv Onkoloji Hastanesi
Ankara	TOBB ETU Hastanesi
Ankara	Abdulrahman Yurtalan Hastanesi
Ankara	Ankara Dışkapı Hastanesi
Ankara	Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Ankara	Ankara Numune Hastanesi
Kayseri	Kayseri EAH
Eskişehir	ESOGÜ Tıp Fakültesi Hastanesi
Akdeniz	
Adana	Ç.Ü.T.F Hastanesi
Adana	Adana Numune Hastanesi
Hatay	Hatay Devlet Hastanesi
Hatay	İskenderun Devlet Hastanesi
Hatay	Özel Antakya Akademi Hastanesi
Antalya	Antalya Eğitim Ve Araştırma Hastanesi
K.Maraş	Kahraman Maraş Sütçü İmam Üniversitesi Hastanesi
Ege	
Denizli	Pamukkale Üni. Tıp Fakültesi Hastanesi
İzmir	Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Hastanesi
İzmir	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Aydın	Aydın Atatürk Devlet Hastanesi Hastanesi

Karadeniz	
Trabzon	KTÜ Farabi Hastanesi
Bolu	A.İ.B.U Tıp Fakültesi Genel Cerrahi
Zonguldak	Zonguldak Atatürk Devlet Hastanesi
Zonguldak	Özel Level Hospital Hastanesi
Zonguldak	B.E.Ü. Genel Cerrahi
Tokat	G.O.P Üniversitesi Hastanesi
Ordu	Ordu Kumru Hastanesi
Samsun	Samsun Eğitim Araştırma Hastanesi
Marmara	
İstanbul	İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi
İstanbul	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi
İstanbul	Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi
İstanbul	Acıbadem Fulya Hastanesi
İstanbul	Acıbadem Maslak Hastanesi
İstanbul	LIV Hastanesi
İstanbul	İstanbul Özel Hastanesi
Bursa	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
İstanbul	Ümraniye EAH
Doğu Anadolu	
Erzurum	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Van	Muradiye Devlet Hastanesi
Güneydoğu Anadolu	
Diyarbakır	Diyarbakır Memorial Hastanesi
Diyarbakır	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
G.Antep	Şehit Kamil Devlet Hastanesi

Ek 3: Tez çalışmasında KASP ile Analiz Edilen TNP Bilgileri

NO	TNP No	TNP rs numarası	FAM>HEX ALLEL (DEĞİŞİM)
1	TNP1	Rs1321311	G>T
2	TNP2	Rs4779584	T>C
3	TNP3	Rs4939827	T>C
4	TNP4	Rs16892766	A>C
5	TNP5	Rs3802842	A>C
6	TNP6	Rs10795668	A>G
7	TNP7	Rs4444235	T>C
8	TNP8	Rs9929218	A>G
9	TNP9	Rs961253	A>C

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Zülal Bilici

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 26.05.1991

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi Giresun (2005-2009)

Lisans: Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü / Moleküler Biyoloji ve Genetik (2010-2014)

Derecesi: 3,34/4,00

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Derecesi: 3,88/4,00

Deneyimler

- Hücre Kültürü
- RNA izolasyonu
- DNA izolasyonu
- cDNA Sentezi
- Real Time qPCR
- PCR
- KASP (Kompetatif Allel Spesifik PCR)
- DNA Dizileme
- Western Blot
- *C. elegans* deneyleri
- İmmunohistokimya

Sertifikalar

- Denev Hayvanları Kullanım Sertifikası, 2015
- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı PCR Temelli Genetik Yaklaşımlar Kursu, Uygulama Eğitmeni, 2017

Katıldığı Seminerler

- Boğaziçi Üniversitesi Türkiye Genom Projesi - Ocak,2012
- İstanbul Üniversitesi İÜGEN Kış Okulu - Şubat,2012
- Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi – 22-23 Kasım 2013
- Boğaziçi Üniversitesi Evrim Bilim ve Eğitim Sempozyumu - 21-22 Aralık 2013
- Moleküler Biyoloji Derneği Winter Retreat – 16-17 Ocak 2015
- 11. Ankara Biyoteknoloji Günleri (20-21 Mayıs 2015)
- Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi – 27-29 Kasım 2015
- Sağlık Alanında Proje Yazımı ve Hücre Ölümü Araştırmalarında Yeni Teknikler Çalıştayı 9-11 Şubat 2017

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Poster Sunumları

Zülal Bilici, Özge Cumaoğulları, Özlem İlk, Türk Sporadik Kolorektal Kanser Grubu, Ayhan Kuzu, Hilal Özdağ, **Sporadik Kolorektal Kanser İle İlişkilendirilmiş Aday Tekli Nükleotit Polimorfizmlerinin Türk Popülasyonu İçin Değerlendirilmesi**. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye, Muğla, Türkiye, 26 - 29 Ekim 2017.