

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMEL BİYOTEKNOLOJİ**  
**DOKTORA TEZİ**

**SPORADİK KOLOREKTAL KANSER VAKALARINDA GENOM EBADINDA  
KOPYA SAYISI DEĞİŞİMLERİNİN ve TRANSKRİPTOM PROFİLİNİN  
BELİRLENMESİ ile KANSERİN GELİŞMESİNDE ve İLERLEMESİNDE ETKEN  
YENİ GENLERİN TANIMLANMASI**

**Nevin BELDER**

**Danışman Öğretim Üyesi**

**Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ**

**ANKARA**

**Ağustos**

**2013**

## **ETİK BEYAN**

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

Nevin BELDER

İmza

Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ danışmanlığında, Nevin BELDER tarafından hazırlanan bu çalışma 25/08/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Ali O. GÜRE İmza:

Üye :Prof. Dr. Arzu ENSARİ İmza:

Üye :Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ İmza:

Üye :Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU İmza:

Üye :Yrd. Doç. Dr. Farid RAJABLİ İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut Özkul

Enstitü Müdürü

# ÖZET

Doktora Tezi

## SPORADİK KOLOREKTAL KANSER VAKALARINDA GENOM EBADINDA KOPYA SAYISI DEĞİŞİMLERİNİN ve TRANSKRİPTOM PROFİLİNİN BELİRLENMESİ ile KANSERİN GELİŞMESİNDE ve İLERLEMESİNDE ETKEN YENİ GENLERİN TANIMLANMASI

Nevin BELDER

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

Kanser, sık görülmesi ve mortalitesinin yüksek olması bakımından dünyanın en önemli halk sağlığı sorunlarının başında gelmektedir. Kolorektal kanser ise maligniteler içinde mortalitede akciğer ve meme kanserinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Kanser vakalarının büyük çoğunluğunda olduğu gibi kolorektal karsinomlarda da vakaların önemli bir kısmını (%85-90) sporadik olguların oluşturduğu bilinmektedir. Karsinogenez sürecine iyi bir model teşkil eden bu kanser, yaygın görülmesinin de etkisiyle araştırmalara sıklıkla konu olmuştur. Ancak heterojen yapısı, poligenik ve çok basamaklı doğası kanserin başlangıç, ilerleme ve yayılmasının altında yatan moleküler mekanizmalarda karanlıkta kalan pek çok nokta bırakmıştır. Ayrıca yaygın görülen bu kanser türünde prognostik ve terapötik hedeflere olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Bu noktadan yola çıkarak planladığımız çalışmada tümör hücrelerindeki bozulmuş gen ekspresyon paterninin ve tümörigenezis boyunca oluşan spesifik genomik değişikliklerin belirlenmesi ve entegre edilmesi kapsamında kanserin ortaya çıkış ve ilerleyiş mekanizmalarının altında yatan gerçeklerin tespit edilmesi, yeni prognostik ve terapötik hedeflerin tanımlanması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada 50 sporadik kolorektal kanser vakasının rezeksiyon materyellerinden alınan kesitlerden manuel mikrodisseksiyon ile ayrılmış tümör ve normal hücrelerinden (tümör/normal toplam 100 örnek) izole edilmiş DNA ve RNA örnekleri ile genom ebadında genom ve transkriptom profili çıkarılmış olup; gen ekspresyon profilleri ile array bazlı komparatif genomik hibridizasyon sonuçları biyoinformatik analizlerin ardından ortak gen bölgelerinin tespit edilebilmesi için entegre edilmiştir.

**Bu tez çalışması, öngörülen metodolojinin kapsamı ve entegre tasarım yaklaşımı ile birlikte sporadik kolorektal kanseri bir bütünlük içinde inceleyen ilk çalışmadır.** Genom ebadında gen ifade analizleri sonucunda tümör-kontrol karşılaştırmasında en az 2 kat değişim ile 346 genin ifadesinde artma gözlenirken 576 genin ifadesinde azalma olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.001$ ). Bu karşılaştırmada hücre döngüsü, kanser yolağı, fokal adezyon, ekstraselüler matriks reseptör ilişkisi, p53 sinyal yolağı, apoptozis, metabolizma ve MAPK sinyal yolakları ön plana çıkan yolaklar olmuştur. Sol kolon ve sağ kolon arasında gen ifade profiline göre anlamlı bir farklılık tespit edilemezken grade II ve III örnekleri gen ifade profillerine göre 2 gruba ayrılmıştır. Kopya sayısı değişikliklerinde  $2 \pm 0.35$  değişimi ile toplam 20.984 segment tanımlanmış olup yeni ve daha önce tanımlanmış bölgeler tespit edilmiştir. Bu iki kapsamlı verinin entegrasyonu sonucunda %20



sıklıkla görülen kopya sayısı değişikliklerinin toplam 69 bölgede 79 genin ifadesini etkilediği tespit edilmiştir. Özetle belirlenen genlerin arasında kolorektal kanserle daha önceden ilişkilendirilmiş ve ilişkilendirilmemiş olanlar bulunmaktadır. Bu genlerin tümör ve kontrol grupları ile grade II ve grade III gruplarını birbirlerinden net olarak ayırma gücüne sahip olmaları prognostik ve dyagnostik önemlerini belirlemektedir.

2013, 357 sayfa

**Anahtar Kelimeler:**Sporadik kolorektal kanser, mikrodizin, gen ifade analizi, kopya sayısı değişikliği, entegrasyon.

## **ABSTRACT**

Ph.D. Thesis

Thesis Title

### **IDENTIFICATION OF NEW GENE and GENE GROUPS INVOLVED IN CANCER DEVELOPMENT AND PROGRESSION THROUGH GENOME-WIDE COPY NUMBER VARIATION ANALYSIS AND TRANSCRIPTOME PROFILING IN SPORADIC COLORECTAL CANCER CASES**

Nevin BELDER

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

Cancer being a frequently seen disease with a high mortality rate is one of the most important public health problem. On the other hand colorectal cancer has the third highest mortality rate after lung and breast cancer. Most of the colorectal cancer cases (85-90%) are sporadic cases like most of other cancers. Colorectal cancer constituting a good model for carcinogenesis studies is thus a highly studied area. However its heterogenous, polygenic and multistep nature still leaves many dark spots in the molecular mechanisms underlying the initiation, progression and spreading of cancer. Besides for this common cancer type the need for novel prognostic and therapeutic targets is ever growing. Thus, in this dissertation, our strategy was to initially determine the gene expression profile and then specific genomic alterations in tumour cells followed by the integration of these two datasets. Our aim was to identify novel prognostic and therapeutic targets to determine the facts explaining the mechanism of cancer initiation and progression.

In this study the genome and transcriptome profile of manually microdissected normal and tumour cells of 50 sporadic colorectal cancer cases was determined. Following bioinformatics analyses gene expression profiles and array CGH analyses results were integrated to identify common gene loci.

This dissertation with its methodological strategy and integrated analysis scheme is the first study analyzing sporadic colorectal cancer as a whole. The gene expression profile analysis of tumour vs control 346 genes were found to be upregulated whereas 576 genes were found to be downregulated (min. 2 fold,  $p < 0.001$ ). The pathways that were highlighted in this comparison were cell cycle, cancer pathways, focal adhesion, extracellular matrix receptor, p53 signal pathway, apoptosis, metabolism, and MAPK signal pathway. Although we could not identify any gene expression difference between left and right colon, grade II and grade III samples were clustered in two separate groups. We identified a total of 20.984 copy number variations ( $2 \pm 0.35$ ) some of which were novel. The integration of the gene expression and aCGH datasets pointed 79 genes in 69 genomic loci in copy number variations seen with a frequency of minimum 20%. In summary some of the genes determined in this study contain genes previously linked to colorectal cancers and some were novel. The clustering between tumour and normal, grade II and grade III based on these genes underlines their prognostic and diagnostic potential.

2013, 357 pages

**Keywords:** Sporadic colorectal cancer, microarray, gene expression analysis, copy number variation, entegration.

## ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve doktora eğitimim boyunca engin bilgi, tecrübe ve kültürü ile bana yol gösteren, iyi bir bilim insanı olma konusunda beni yönlendiren, bilim eğitimime katkılarının yanında hayatta güçlü ve sağlam durmanında yolunu gösteren değerli hocam Prof. Dr. Hilal Özdağ'a,

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca beni finansal olarak destekleyip çalışmalarına devam etmemde önemli bir katkı sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB) ve değerli çalışanlarına,

Tez çalışmamın en önemli adımlarından biri olan materyal toplanmasında tümör ve normal hücrelerin ayırımında ve çalışmanın yönlendirilmesinde değerli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Arzu Ensari ve Doç.Dr. Berna Savaş'a,

Doktora çalışmalarımın başında tanıştığım, hayatımdan hiç çıkarmayı düşünmediğim, çalışma örneklerinin hazırlanmasında ve tüm çalışma boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, canım arkadaşım Blm. Uzm. Öznur Coşkun Erdoğan'a

Tez çalışması biyoinformatik analizlerinin gerçekleştirilmesinde emeğini ve tecrübesini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Farid Rajabli ve ayrıca sabrı için Blm. Uzm. Mehmet Korkmaz'a,

Doktora eğitimim sürecinde beraber çalışmaktan, beraber gülmekten, beraber ağlamaktan büyük mutluluk duyduğum, çalışmalarımda bana hep destek olan, canım arkadaşım Blm. Uzm. Hülya Sümer Çelebi'ye

Tez çalışmasının sıkıştığı bir noktada benden yardımlarını esiregemeyen süreç içinde arkadaşlığımı hep hissettiğim Bilm. Uzm. Seda Taşır Yılmaz'a

Doktora eğitimim sürecinde birlikte çalışmaktan hep mutlu olduğum benden arkadaşlığını ve tez çalışmam boyunca gerektiğinde yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Semih Dalkılıç'a,

Süreç içinde hep yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen Dr. Yeşim Doğan, Bilm. Uzm. Günseli Deniz, Bilm. Uzm. Nilgün Tekin, Bilm. Uzm. Özge Cumoğulları, Bilm. Uzm. Pelin Fidanoğulları ve şimdi aramızda olmayan tüm mezun genombilim ekip arkadaşlarıma,

Çalışmalarım süresince desteklerini hep hissettiğim, hep yanımda olan, benden sıcacık arkadaşlıklarını esirgemeyen melek yüzlüm Blm. Uzm. Funda Kaya Demirsoy ve Yrd. Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na ve ismini saymadığım bütün Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma,

İyi, kötü her zaman yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim, gerçek dostluğun verdiği sıcaklığı, huzuru ve mutluluğu birlikte sonuna kadar yaşadığım canım dostlarım Bilm Uzm. Gamze Turna ve Bilm. Uzm. Yasemin Işık Koç'a

Bugünlere gelmemde maddi manevi hiçbir desteği benden esirgemeyen, süreç içinde hep yanımda olan, sonsuz sevgileri ve sabırları için eşi benzeri bulunmayan aileme,

2005 yılının soğuk günlerinde hayatıma giren, sıcacık sevgisiyle ve bitmek tükenmek bilmeyen sabrıyla beni hep destekleyen,her zaman yanımda olan,bu hayattaki diğer yarım bitanecik, sevgili eşim Murat Belder'e

Tezimin tam ortasında dünyaya gelen, daha önce hiç yaşamadığım cümlelere dökemeyeceğim kadar yoğun ve güçlü bambaşka bir aşkı yaşatan, dünyanın en yakışıklısı, en sevimlisi, en bitanesi, en tatlısı herşeyim canım oğlum Ege Belder'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Nevin BELDER

Ağustos,2013

Not: Aşağıdaki cümleler, benim için çok zordaki geçse de her açıdan bana çoksey kattığını düşündüğüm bu tez çalışmasının yazımı sırasında yaşadığım duygu yoğunluklarının bir yansımasıdır☺

Bir işin sonuna gelmişken bütününi görememenin kaybolmuşluğunda tükendim ben...  
Tükenmişlik sendromunun dibindeki karanlık tüm ruhumu ele geçirmişken beynimin karıncalanmaları tüm bedenimi yok ederken teslim oldum ben...  
Kanserin altından üstünden derken kümелendim ama hiç bir grubun içine giremedim ben...  
Genlerin ifadesini ararken kendi ifademi kaybettim ben...  
Kopya sayılarında ne değişti de böyle oldu diye sorarken ben değiştim...  
Değiştim be hayat...  
Entegre bile olamadan kavram kargaşasında yok oldum gittim....

*Oğlum Ege BELDER'e*

## İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER DİZİNİ.....	xxiv
1.GİRİŞ.....	1
2.KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Omik Yaklaşımlar.....	5
2.1.1. Genom ve genomik.....	7
2.1.2. Transkriptom ve Transkriptomik.....	8
2.2.Omik'ten Kompleks Hastalıklara:Kanser ve Omik Yaklaşımlar.....	9
2.3.Kanser.....	13
2.3.1.Kanserin moleküler biyolojisi ve karsinogenez.....	15
2.3.1.1.Onkogenler.....	16
2.3.1.2. Tümör baskılayıcı genler.....	17
2.3.2.Hücre döngüsü, apoptozis ve kanser.....	18
2.3.3.Genom ebadında yüksek çözünürlüklü teknolojilerle kansere global bakış:Genomik ve transkriptomik değişiklikler ve kanser.....	26
2.3.3.1.İnsan genomundaki yapısal değişiklikler.....	27
2.3.3.1.1.Yeni bir bakış: Kopya sayısı değişiklikleri.....	30
2.3.3.1.1.1.Kopya sayısı değişikliklerinin potansiyel oluşum mekanizmaları.....	33
2.3.3.1.1.2.Kopya sayısı değişimlerinin gen ifadesi üzerindeki etkileri....	34
2.3.3.1.1.3.Kopya sayısı değişikliklerinin hastalıklarla ilişkisi, kanser için anlamı.....	35
2.3.3.1.1.4.Kanserde kopya sayısı değişikliklerin analizinde kullanılan yöntem ve stratejiler:CGH ve mikrodizin uygulamaları.....	39
2.3.3.1.1.4.1.Kanser, kopya sayısı değişiklikleri ve TNP mikrodizinlerinin bulunması.....	43



2.3.3.1.1.4.1. Bir TNP mikrodizin “Affymetrix SNP 6.0 array” ve kopya sayısı değişiklik analizi .....	44
2.3.3.2. Kanser genomunun ifade profili ve kanser biyolojisinde mikrodizin uygulamaları .....	48
2.3.3.2.1. Gen ifade çalışmalarında mikrodizin teknolojisi ve analizi .....	48
2.3.3.2.2. Mikrodizin teknolojileri ile kanserin moleküler profilinin çıkarılması .....	52
2.3.3.2.3. Mikrodizin gen ifade profili çalışmalarında arşiv materyallerinin kullanımı.....	54
2.3.3.3. Genomik yaklaşımların kullanımı ile genomik ve transkriptomik entegrasyon .....	54
2.4. Kolorektal Kanser .....	56
2.4.1. Kolorektal kanser etyolojisi ve epidemiyolojisi .....	56
2.4.2. Kolorektal karsinogenezis ve moleküler mekanizması: Kanser yol haritası .....	60
2.4.2.1. Kromozomal instabilite yolağı.....	61
2.4.2.2. Mikrosatellit instabilite (MSI) yolağı.....	63
2.4.2.3. CpG adacık metilasyon fenotip yolağı.....	64
2.4.3. Kolorektal kanserin patolojisi.....	64
2.4.3.1. Kolorektal kanserin histopatolojisi.....	65
2.4.3.2. Kolorektal karsinomlarda histolojik dereceleme (Grade).....	65
2.4.3.3. Kolorektal karsinomlarda evreleme (Stage) .....	66
2.4.4. Kolorektal kanser ve lokalizasyonu .....	67
2.4.5. Kolorektal kansere genomik ve transkriptomik bakış.....	68
2.4.5.1. Kolorektal kanserin gen ifade profili.....	68
2.4.5.2. Kolorektal kanserin genomik profili.....	73
2.4.5.3. Kolorektal kanser genomik ve transkriptomik entegrasyon çalışmaları ve önemi.....	74
3. GEREKÇE VE AMAÇ.....	76
4.1. MATERYAL VE YÖNTEM.....	81
4.1. MATERYAL.....	81
4.2. Yöntem.....	82
4.2.1. Tez çalışmasında kullanılan yöntemlerin özeti.....	82
4.2.1. Çalışmaya dahil edilen FFPE materyallerin histopatolojik değerlendirmesi.....	83
4.2.3. Mikrodiseksiyon ve deparafinizasyon.....	84

<b>4.2.4.Parafine gömülü dokulardan ayrıştırılan tümör ve normal hücrelerdenDNA izolasyonu</b> .....	85
<b>4.2.4.1.DNA'nın spektrofotometrik analizi ve miktar tayini</b> .....	87
<b>4.2.4.2. Mikrodizin reaksiyonları için DNA konsantrasyonun ayarlanması</b> ....	87
<b>4.2.4.3.Agaroz Jel Elektroforezi</b> .....	87
<b>4.2.4.4. Kopya Sayısı Değişikliği için Gerçekleştirilen Mikrodizin Reaksiyonları</b> .....	89
<b>4.2.4.1 SNP 6.0 Restriksiyon Enzimi ile Kesim</b> .....	90
<b>4.2.4.1.a STY Restriksiyon Enzim Kesimi</b> .....	90
<b>4.2.4.2.a SNP 6.0 LİGASYON</b> .....	91
<b>4.2.4.3.a PZR</b> .....	93
<b>4.2.4.4.a PZR Sonuçlarının Agaroz Jel Elektroforezi</b> .....	94
<b>4.2.4.1.b Nsp Restriksiyon Enzim Kesimi</b> .....	94
<b>4.2.4.2.b SNP 6.0 LİGASYON</b> .....	96
<b>4.2.4.3.b PZR</b> .....	97
<b>4.2.4.4.b PZR Sonuçlarının Agaroz Jel Elektroforezi</b> .....	99
<b>4.2.4.4.5 PZR Pürifikasyonu</b> .....	99
<b>4.2.4.4.6.Pürifiye Edilen PZR Ürünlerinin Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini</b> .....	100
<b>4.2.4.4.7. SNP 6.0 Fragmentasyon ve Fragmentasyon Sonrası Agaroz Jel Elektroforezi</b> .....	100
<b>4.2.4.4.8.SNP 6.0 Biotin ile İşaretleme</b> .....	103
<b>4.2.4.4.9.SNP 6.0 Hibridizasyon</b> .....	104
<b>4.2.4.4.10.SNP 6.0 Yıkama, Boyama ve Tarama</b> .....	106
<b>4.2.4.5. Eşli kopya sayısı değişikliği veri analizi için gerçekleştirilen biyoinformatik analizler</b> .....	109
<b>4.2.5.Parafine gömülü dokulardan ayrıştırılan tümör ve normal hücrelerden RNA izolasyonu</b> .....	110
<b>4.2.5.1.RNA'nın Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini</b> .....	112
<b>4.2.5.2.Mikrodizin Reaksiyonları için RNA Konsantrasyonunun Ayarlanması</b> .....	112
<b>4.2.5.3 İzole Edilen RNA Örneklerinin Bütünlük ve Kalite Analizi</b> .....	112
<b>4.2.5.4. Gen İfade Değişim Analizleri için Gerçekleştirilen Mikrodizin Reaksiyonları</b> .....	115
<b>4.2.5.5.Eşli mikrodizin gen ifade değişikliği veri analizi için gerçekleştirilen biyoinformatik analizler</b> .....	129

4.2.5.5.1.Önişleme.....	130
4.2.5.5.2.Farklı olarak ifade edilen genlerin tespit edilmesi.....	130
4.2.5.5.3.Kümeleme analizi.....	131
4.2.5.5.4.Gen ontoloji, zenginleşme ve yolak analizleri.....	132
<b>5.ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>134</b>
5.1.Histopatolojik Bulgular.....	134
5.2.Demografik Bulgular.....	135
5.2.1. Yaş.....	135
5.2.2. Cinsiyet.....	137
5.3.Klinikopatolojik Bulgular.....	138
5.3.1.Lokalizasyon.....	138
5.3.2. Grade.....	140
5.4.Moleküler Bulgular.....	141
5.4.1.Genom ebadında gen ifade analizi bulguları.....	142
5.4.1.1.Deparaffinizasyon, RNA izolasyonu ve mikrodizin optimizasyon uygulamaları.....	142
5.4.1.2. Mikrodizin optimizasyon uygulamaları.....	145
5.4.1.3. RNA izolasyonu, miktar, saflık analizleri.....	148
5.4.1.4. İzole edilen RNA örneklerinin bütünlük ve kalite analizi.....	149
5.4.1.5. Genom ebadında gen ifade analizi.....	150
5.4.1.5.1. SPIA cDNA pürifikasyonu, hibridizasyon ve tarama.....	150
5.4.1.5.2. Genom ebadında gen ifade analizi biyoinformatik bulgular.....	152
5.4.1.5.2.1.Tümör- Kontrol paired karşılaştırmasına ait bulgular.....	155
5.4.1.5.2.1.1.Tümör-Kontrol paired karşılaştırmasında ifadesinde artış görülen gen grubuna ait sonuçlar.....	157
5.4.1.5.2.1.2.Tümör-Kontrol paired karşılaştırmasında ifadesinde azalma görülen gen grubuna ait sonuçlar.....	161
5.4.1.5.2.1.3.Tümör-Kontrol paired karşılaştırmasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen gruplarının birlikte değerlendirilmesi.....	165
5.4.1.5.2.2.Tümör gradeleri arasında yapılan karşılaştırmalara ait bulgular.....	171
5.4.1.5.2.2.1. Unpaired karşılaştırmalara ait bulgular.....	171
5.4.1.5.2.2.2. Paired karşılaştırmalara ait bulgular.....	173
5.4.1.5.2.3. Tümör lokasyonu ile ilgili karşılaştırmaların gen ifade analizi verilerine ait bulgular.....	180

5.4.1.5.2.3.1. Unpaired tümörsol kolon-tümör sağ kolon karşılaştırmasına ait bulgular .....	180
5.4.1.5.2.3.2. Paired tümör-normal lokasyon karşılaştırması gen ifade analizi verilerine ait bulgular .....	183
5.4.2. Genom ebadında kopya sayısı değişikliği analiz bulguları.....	189
5.4.2.1. DNA izolasyonu optimizasyon uygulamaları.....	189
5.4.2.2. DNA izolasyonu, miktar, saflık tayini.....	194
5.4.2.3. DNA Bütünlük Tayini (% 1'lik Agaroz jel Görüntüleri) .....	195
5.4.2.4. Genom ebadında kopya sayısı değişikliği analiz bulguları.....	196
5.4.2.4.1. SNP 6.0 restriksiyon enzim kesimi, PZR, PZR pürifikasyon, hibridizasyon ve tarama bulguları.....	197
5.4.2.4.2. Genom ebadında kopya sayısı değişiklik analizi biyoinformatik bulguları .....	201
5.4.2.4.2.1. Kopya Sayısı Değişikliği Verisi Filtrasyonu.....	201
5.4.3. Genom ebadında gen ifade profili ve kopya sayısı değişiklikleri verilerinin entegrasyonu .....	211
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	217
6.1. Global Gen İfade Profili Çalışmaları.....	219
6.1.1. RNA izolasyon ve global gen ifade optimizasyon çalışmaları değerlendirmesi.....	219
6.1.2. Mikrodizin Gen İfade Analiz Çalışmaları Değerlendirmesi.....	221
6.1.2.1. Paired tümör-kontrol karşılaştırması analiz değerlendirmesi .....	221
6.1.2.2. Kolorektal kanserde grade'ler arası global gen ifade profili .....	231
6.1.2.2.1. Tümör örneklerinde grade'ler arası gen ifade profili.....	232
6.1.2.2.2. Farklı tümör gradeleri ve eşli normal karşılaştırmaları.....	235
6.1.2.3. Sağ ve sol yerleşimli tümörlerin gen ifade profili .....	237
6.2. Global Kopya Sayısı Değişiklik Analizi Çalışmaları .....	240
6.2.1. DNA izolasyonu optimizasyon çalışmaları değerlendirmesi.....	240
6.2.2. aCGH - kopya sayısı değişiklikleri analiz değerlendirmeleri.....	241
6.3. Sporadik kolorektal kanserde genomik ve transkriptomik profilin entegrasyon değerlendirmeleri.....	245

<b>7.SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>251</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>254</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>282</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>327</b>
<b>TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR.....</b>	<b>330</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Omik hiyerarşinin şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.2. Mendelyan hastalıklar .....	10
Şekil 2.3. Kompleks hastalıklar .....	10
Şekil 2.4. Normal ve kanserli hücre büyüme durumu .....	14
Şekil 2.5. Karsinogenez süreci .....	16
Şekil 2.6. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları .....	19
Şekil 2.7. Apoptozis ekstrinsik ve intrinsik yolları .....	23
Şekil 2.8. Karsinogenez ve apoptozisten kaçma sürecine katkıda bulunan mekanizmalar .....	25
Şekil 2.9. Yapısal genomik varyasyonlar .....	28
Şekil 2.10. Kopya sayısı değişikliği şematik gösterimi .....	31
Şekil 2.11. Kopya sayısı değişikliği ve hastalıklarla ilişkisine örnek çalışmalar .....	36
Şekil 2.12. Normal (A) ve kanserli hücrelerin (B) karyotip örneği.....	39
Şekil 2.13. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon tekniği şematik gösterimi.....	41
Şekil 2.14. Konvansiyonel CGH ve aCGH'in karşılaştırmalı şematik gösterimi .....	42
Şekil 2.15. Affymetrix TNP array dizaynı .....	45
Şekil 2.16. Affymetrix GeneChip yapısal şeması .....	49
Şekil 2.17. Affymetrix GeneChip prob dizaynı .....	50
Şekil 2.18. Mikrodizin veri analiz prosesi. ....	51
Şekil 2.19. Gen ifade profilinin medikal onkolojide potansiyel klinik uygulamaları..	52
Şekil 2.20. Cinsiyete göre en sık görülen 10 kanserin Amerika 2013 tahmini yeni vaka ve ölüm oranları.....	57
Şekil 2.21. Cinsiyete göre Türkiye'deki kanser insidansı .....	58
Şekil 2.22. Kolorektal kanserin sınıflandırılma şeması .....	59
Şekil 2.23. Kolorektal karsinogenezde moleküler ara yollar .....	61
Şekil 2.24. Kolorektal kanser adenoma-karsinoma sekansı yolları.....	62
Şekil 2.25. Kolon anatomisi.....	67
Şekil 4.2. Tez çalışması genel özet şeması.....	83
Şekil 4.3. Histopatolojik olgu grupları.....	84
Şekil 4.4. Mikrodiseksiyon öncesi ve sonrası tümör ve normal örnekler .....	85
Şekil 4.5. SNP 6.0 Affymetrix SNP 6.0 protokol akış şeması.....	90

Şekil 4.6. Nugen Ovation FFPE WTA System yöntemi .....	120
Şekil 5.1. Karsinom olgularında alt grupların dağılımı.....	134
Şekil 5.2. Tüm olguların yaş dağılım grafiği .....	135
Şekil 5.3.Cinsiyetler arasında yaş dağılımı.....	136
Şekil 5.4. Tümör alt tiplerinin yaş dağılım grafiği .....	136
Şekil 5.5. Tüm karsinom olgularında cinsiyet dağılımı.....	137
Şekil 5.6.Tümör tiplerinde cinsiyet dağılımı .....	137
Şekil 5.7.Tüm olgularda lokalizasyon dağılımı.....	138
Şekil 5.8. Cinsiyetler arasında tümör lokalizasyon dağılımı .....	138
Şekil 5.9.≤50 ve >50 yaş parametresi altında tümör lokalizasyon dağılımı .....	139
Şekil 5.10. Tümör tiplerinde lokalizasyon dağılımı.....	140
Şekil 5.11.Tüm olguların grade dağılımları .....	140
Şekil 5.12. Genom ebadında gen ifade analiz çalışmaları akış şeması.....	142
Şekil 5.13. RNA izolasyonu ve mikrodizin uygulamaları için gerçekleştirilen optimizasyon akış şeması .....	143
Şekil 5.14.3 farklı kit ile izole edilen RNA'lara ait elektroferogram görüntüleri.....	144
Şekil 5.15. Mikrodizin optimizasyon uygulamaları şeması .....	146
Şekil 5.16.Mikrodizin optimizasyon uygulamaları sonucunda elde edilen pozitif sinyal alınan prob yüzde değerleri .....	147
Şekil 5.17. İzole edilen RNA'lara ait temsili elektroferogram görüntüleri .....	149
Şekil 5.18. Genom ebadında gen ifade analizi kapsamında değerlendirilen tüm karşılaştırmalar .....	153
Şekil 5.19. Tümör vs Kontrol karşılaştırması kümeleme analizi .....	157
Şekil 5.20. Tümör-Kontrol karşılaştırmasında DAVID analizi sonrasında ifadesi artan genlerin kromozomlardaki dağılımı .....	158
Şekil 5.21.Tümör-kontrol karşılaştırmasında ifadesinde artış görülen genlerin DAVID analizi sonrasında gen sayısı $\geq 3$ olan yolların dağılımı.....	160
Şekil 5.22. Tümör-Kontrol karşılaştırmasında DAVID analizi sonrasında ifadesi azalan genlerin kromozomlardaki dağılımı .....	162
Şekil 5.23. Tümör-kontrol karşılaştırmasında ifadesinde azalış görülen genlerin DAVID analizi sonrasında gen sayısı $\geq 3$ olan yolların dağılımı.....	164
Şekil 5.24. Tümör vs Kontrol karşılaştırmasında “DAVID” analizi sonrasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen grupları için ortak yollar ve gen sayıları ...	168
Şekil 5.25. p53 sinyal yolağı üzerinde ifade düzeyinde artış ve azalış görülen genler	169

Şekil 5.26. Tümör grade unpaired karşılaştırmalar kümeleme analiz görüntüleri ..	172
Şekil 5.27. Tümör grade II-I, III-I ve III-II karşılaştırmalarında farklı ifade edilen ve ifadesinde artış ve azalış görülen genlere ait ven diyagramı .....	173
Şekil 5.28. Grade II,III Tümör-kontrol karşılaştırması kümeleme analiz görüntüleri .....	174
Şekil 5.29. Tümör grade II-normal grade II genlerin kromozomlardaki dağılımı ...	175
Şekil 5.30. Tümör grade III-normal grade III genlerin kromozomlardaki dağılımı	176
Şekil 5.31. Tümör grade II-normal grade II karşılaştırmasında “DAVID” analizi sonrasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen grupları için ortak yolaklar ve gen sayıları .....	177
Şekil 5.32. Tümör grade III-normal grade III karşılaştırmasında “DAVID” analizi sonrasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen grupları için ortak yolaklar ve gen sayıları .....	177
Şekil 5.33. Tümör grade II-normal grade II ve tümör grade III-normal grade III karşılaştırmalarında farklı ifade edilen ve ifadesinde artma ve azalma görülen genlere ait ven diyagramı.....	179
Şekil 5.34. Tümör sol kolon-tümör sağ kolon karşılaştırması hiyerarşik kümeleme grafiği.....	181
Şekil 5.35. Sol kolon, sağ kolon Tümör-normal eşli karşılaştırması kümeleme analiz görüntüleri.....	184
Şekil 5.36. Tümör sol kolon-normal sol kolon genlerin kromozomlardaki dağılımı..	185
Şekil 5.37. Tümör sağ kolon-normal sağ kolon genlerin kromozomlardaki dağılımı	185
Şekil 5.38. Tümör sol kolon-normal sol kolon karşılaştırmasında “DAVID” analizi sonrasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen grupları için ortak yolaklar ve gen sayıları .....	186
Şekil 5.39. Tümör sağ kolon-normal sağ kolon karşılaştırmasında “DAVID” analizi sonrasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen grupları için ortak yolaklar ve gen sayıları .....	186
Şekil 5.40. Tümör –normal sol kolon ve tümör-normal sağ kolon karşılaştırmalarında farklı ifade edilen genlere ait ven diyagramı .....	188
Şekil 5.41. Tümör –normal sol kolon ve tümör-normal sağ kolon karşılaştırmalarında ifadesinde artma /azalma gözlenen genlere ait ven diyagramı	188
Şekil 5.42. Genom ebadında kopya sayısı değişiklik analizi çalışmaları akış şeması	189
Şekil 5.43. DNA izolasyon optimizasyon uygulamaları.....	191



Şekil 5.44. Tüm metodlar için izole edilen DNA'lara ait agaroz jel elektroforez temsili görüntüsü.....	192
Şekil 5.45. Tüm metodlarla izole edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen BRAF geni amplifikasyonu (PZR) agaroz jel görüntüsü.....	193
Şekil 5.46. Tüm metodlarla izole edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen FV geni amplifikasyonu (PZR) agaroz jel görüntüsü.....	193
Şekil 5.47. İzole edilen DNA örneklerine ait temsili agaroz jel fotoğrafı .....	196
Şekil 5.48. Kesim, ligasyon ve PZR reaksiyonlarının kaliteli DNA ve degrade DNA arasındaki farkları.....	197
Şekil 5.49. SNP 6.0 Nsp ve Sty Restriksiyon enzim kesim reaksiyonuna ait temsili agaroz jel fotoğrafı.....	197
Şekil 5.50. SNP 6.0 PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü .....	198
Şekil 5.51. Fragmente edilen örneklere ait temsili %4'lük agaroz jel görüntüsü .....	199
Şekil 5.52. Bir örneğe ait bağıl kopya sayısı değişikliğinin (tümör-kontrol) kromozom 7 için segmente edilmiş veri görüntüsü.....	206
Şekil 5.53. > 3 kişi ve 500-1000 kb parametreleri kapsamındaki delesyon kopya sayısı değişiklik bölgelerinin içerdiği gen sayılarının kromozomlardaki dağılımı .....	207
Şekil 5.54. > 3 kişi ve 500-1000 kb parametreleri kapsamındaki amplifikasyon kopya sayısı değişiklik bölgelerinin içerdiği gen sayılarının kromozomlardaki dağılımı....	208
Şekil 5.55. Entegre edilen genomik ve transkriptomik veriler .....	211
Şekil 5.56. Entegre olan ekspresyon verisi genlerinin kromozomlardaki dağılımı ...	214

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hücre döngüsünün farklı noktalarında aktif olan siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksleri.....	20
Çizelge 2.2. Tümör vs kontrol karşılaştırması yapan çalışmalarda en çok rapor edilen ifadesinde artma görülen genler.....	71
Çizelge 2.3. Tümör vs kontrol karşılaştırması yapan çalışmalarda en çok rapor edilen ifadesinde azalma görülen genler.....	72
Çizelge 4.1. Tez çalışmasında kullanılan örneklerle ait demografik ve histolojik veriler.....	82
Çizelge 5.1. Grade I, II ve III tümörlerin demografik ve klinikopatolojik bilgileri.....	141
Çizelge 5.2. Üç farklı ticari kit (Qiagen RNeasy, Picopure, Trizol) ile izole edilen RNA'lara ait spektrofotometre sonuçları.....	144
Çizelge 5.3. Qiagen RNeasy FFPE kit için kit protokolü ve modifiye depraffinizasyon adımı eklenmiş protokol ile izole edilen RNA'lara ait spektrofotometre sonuçları..	145
Çizelge 5.4. İfade analiz deneyleri kit ve <i>array</i> denemelerinin pozitif sinyal alınan prob yüzde değeri açısından karşılaştırmaları .....	147
Çizelge 5.5. İzole edilen RNA'lara ait miktar ve saflık değer aralıkları .....	148
Çizelge 5.6. İzole edilen RNA'lara ait temsili spektrofotometre sonuçları .....	148
Çizelge 5.7. Pürifiye edilen amplifiye cDNA örneklerine ait temsili miktar ve kalite sonuçları .....	150
Çizelge 5.8. Çalışılan örnekler için “pozitif sinyal alınan prob yüzdesi” (number present ) değerleri temsili tablosu .....	151
Çizelge 5.9. Tümör vs Kontrol farklı kat değişimleri ve p değerleri ile birlikte farklı ifade edilen gen sayıları.....	155
Çizelge 5.10. Tümör vs Kontrol karşılaştırmasında artış/azalış gösteren gen sayıları .....	156
Çizelge 5.11. Tümör-Kontrol grubu ifadesi artan genler için gen sayısı $\geq 5$ olan DAVID anotasyon kümeleri .....	159
Çizelge 5.12. Tümör kontrol karşılaştırmasında ifadesinde artış görülen gen grubunda ön plana çıkan genler .....	161

Çizelge 5.13. Tümör-Kontrol grubu ifadesi azalan genler için gen sayısı $\geq 5$ olan DAVID anotasyon kümeleri .....	162
Çizelge 5.14. Tümör kontrol karşılaştırmasında ifadesinde azalış görülen gen grubunda ön plana çıkan genler .....	165
Çizelge 5.15. Tümör vs Kontrol karşılaştırmasında ifadesinde artış ve azalış gösteren genlere ait genel tablo.....	166
Çizelge 5.16. Tümör vs Kontrol karşılaştırmasında “DAVID” analizi sonrasında ifadesinde artış/azalış görülen gen grupları için ortak yolaklar ve gen sayıları.....	167
Çizelge 5.17. Tümör-kontrol karşılaştırmasına ait gen ontoloji, zenginleşme, yolak ve önemli genleri içeren özet değerlendirme.....	170
Çizelge 5.18 2 kat artış ile unpaired tümör grade karşılaştırmaları sonucu elde edilen farklı ifade edilen gen sayıları .....	172
Çizelge 5.19. 2 kat artış ile paired tümör–normal grade karşılaştırmaları sonucu elde edilen farklı ifade edilen gen sayıları.....	174
Çizelge 5.20. Grade II ve III tümör-kontrol karşılaştırmalarına ait gen ontoloji, zenginleşme, yolak ve önemli genleri içeren özet tablo .....	178
Çizelge 5.21. Tümör sol kolon-tümör sağ kolon karşılaştırmasında farklı kat değişimleri ve p değerleri ile birlikte farklı olarak ifade edilen gen sayıları .....	181
Çizelge 5.22. Tümör sol kolon-tümör sağ kolon karşılaştırmasında farklı olarak ifade edilen 16 gene ait genel tablo .....	182
Çizelge 5.23. 2 kat artış ile tüm tümör lokalizasyon karşılaştırmaları için farklı olarak ifade edilen gen sayıları.....	183
Çizelge 5.24. Sol kolon ve sağ kolon yerleşimli tümör örnekleri ile eşli normal örneklerin karşılaştırmalarına ait gen ontoloji,zenginleşme, yolak ve önemli genleri içeren özet çizelge.....	187
Çizelge 5.25. Bir örnek için tüm metodlarla ve modifikasyonlu/suz izole edilen DNA'lara ait temsili spektrofotometrik ölçümler .....	191
Çizelge 5.26. İzole edilen DNA'lara ait miktar ve saflık değer aralıkları .....	194
Çizelge 5.27. İzole edilen DNA'lara ait temsili spektrofotometre sonuçları .....	195
Çizelge 5.28. PZR pürüfikasyon aşaması temsili miktar ve kalite sonuçları.....	199
Çizelge 5.29. Çalışılan örnekler için genotiplendirilebilen SNP sayısını gösteren call rate oranlarının temsili gösterimi .....	200
Çizelge 5.30. Tümör kontrol karşılatırması kopya sayısı değişiklikleri temsili sonuç tablosu (1. Kromozom).....	205

Çizelge 5.31. Belirlenen kopya sayısı değişikliklerinin tümör örneklerindeki amplifikasyon ve delesyon frekans bilgileri .....	206
Çizelge 5.32. >3 bireyde bulunan kopya sayısı değişikliklerinin boyut dağılımı .....	207
Çizelge 5.33. Veri filtrasyonu sonucu elde edilen değişikliklerin farklı görülme sıklıklarında amplifikasyon ve delesyon bölgelerindeki gen sayıları.....	208
Çizelge 5.34. %20 sıklıkla amplifiye olan bölgelerdeki genler (temsili tablo) .....	209
Çizelge 5.35. %20 sıklıkla delesyona uğramış bölgelerdeki genler (temsili tablo) ....	210
Çizelge 5.36. Gen ifade verisi ve filtrelenmemiş kopya sayısı değişiklik verisi entegrasyonu .....	212
Çizelge 5.37. Etkilediği genlerin sayısı açısından ön plana çıkan değişiklik bölgeleri .....	213
Çizelge 5.38. Gen ifade analizinde ön plana çıkıp kopya sayısı değişimlerinden de etkilenen önemli genler .....	214
Çizelge 5.39. %20 sıklıkla kazanç görülen kopya sayısı değişimlerinin gen ifade verisi ile entegrasyon sonucu .....	215
Çizelge 5.40. %20 sıklıkla kayıp görülen kopya sayısı değişimlerinin gen ifade verisi ile entegrasyon sonucu .....	216

## SİMGELER DİZİNİ

aCGH	Array CGH
AIF	Apoptozis indükleyici faktör
AML	Akut myeloid lösemi
APC	Adenomatöz polipozis koli
BAC	Bakteriyel Yapay Kromozom
BCR	Breakpoint cluster region
CBS	Circular binary segmentation
CCL3L1	Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1
CCND1	Siklin D1
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDKI	Siklin bağımlı kinaz inhibitör
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonukleik asit
CDKN2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
cCFLAR	CASP8 ve FADD-benzeri apoptozis regulator
CGH	Comparative Genomic Hybridization(=Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CIN	Kromozomal instabilite
CNV	Copy Number Variation
CSE1L	Cellular apoptosis susceptibility
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DNA	Deoksiribonükleik asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ENCODE	The encyclopedia of DNA elements
FAK	Fokal adezyon
FAP	Ailesel adenomatöz polip
FFPE	Formalinle fikse edilmiş parafine gömülmüş
FISH	Florasın in situ hibridizasyon

FN1	Fibronektin1
GADD45B	Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible, Beta
GIST	Gastrointestinal stromal
GO	Gen ontoloji
GWAS	Genom boyu assosiyasyon alışmaları
H&E	Hematoksilen-eozin
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüs
HMM	Hidden-Markov model
HNPCC	Herediter nonpolipozis kolorektal kanser
HSF-1	Heat Shock Transcription Factor 1
IRAK-1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
KML	Kronik myeloid lösemi
KRK	Kolorektal kanser
KSD	Kopya sayısı değişikliği
LABTM4B	Lysosomal protein transmembrane 4 beta
LEF-1	Lenfoid hızlandırıcı faktör 1
LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MM	Mismatch
MSI	Mikrosatellit instabilitesi
PIK3CG	PI3K, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gama
PLA2G2A	Phospholipase A2, Group IIA
PM	Perfect match
PPARD	Peroxisome proliferator-activated receptor delta
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
REG4	Regenerating islet-derived family member
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism

RIPK2	Receptor-Interacting Serine-Threonine Kinase 2
RMA	Robust Multi-array Average
RNA	Ribonükleik asit
STR	Short tandem repeat
TGF-B	Transforme edici büyüme faktörü
THBS1	Trombospondin 1
THBS2	Trombospondin 2
TNF	Tümör nekroz faktör
TNP	Tekli nükleotid polimorfizmi
TRAD	TNF –reseptör ilişkili ölüm domain
WT1	Wilms Tümör geni
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
YAC	Maya yapay kromozomu
$\mu$ l	Mikrolitre

## 1.GİRİŞ

Resmi olarak 1990 yılında başlatılan “İnsan Genom Projesi” DNA’daki 3 milyar baz çiftinin dizilimi yanında genlerin sayısı, yerleri ve düzenleri konusunda insanın karmaşık yapısının anlaşılmasında en önemli basamaklarından biri olmasının yanısıra genomdaki tüm varyasyonların tespit edilmesi ve hastalıklara yakalanma riskinin tanımlanmasında da yeni ufuklar açmıştır. Bu proje, açığa çıkan bilgilerin daha detaylı incelenmesi için HapMap, ENCODE, 1000 genom projesi, Kanser Genom Projesi gibi değişik kapsamlı projelerin de öncüsü olmuştur.

İlk sonuçlarını 2005 yılı sonunda yayınlayan uluslararası “HapMap” projesinde dört farklı popülasyondan gelen 270 bireydeki genetik dizi farklılıklarını karşılaştırmak suretiyle genetik varyantların bulunduğu kromozom bölgelerini tanımlamak amaçlanmaktadır. “1000 Genom” Projesinde yaklaşık 1200 bireyde insan genetik varyasyonlarının bir kataloğunun çıkartılması hedeflenirken “Kanser Genom” Projesinde ise kanser sebebi olabilecek mutasyonlar, varyasyonlar ve genler araştırılmaktadır. “Kopya sayısı değişikliği” (CNV= copy number variation) projesinde HapMap projesinde kullanılan 270 bireyde insan genomunda kopya sayısı değişikliklerinin dağılımı, bunların hastalıklarla ilişkisi, gen ekspresyonu üzerindeki etkileri ve mutasyonlarla etkileşimleri irdelenmektedir. Bu süreçte ve genom bilgisinin ulaştığı noktada; geleneksel biyoloji prosesleri bütünü kapsayacak şekilde uygulama potansiyeli bulmuş olup ortaya “omik” yaklaşımlar çıkmıştır. “Omik” eki Yunanca’dan gelmekte olup “tümü” veya “hepsi” anlamına gelmektedir. Genomik, bir türün genomunda bulunan tüm genlerin belirlenmesi, dizi analizinin yapılarak haritasının hazırlanması işemini içermesinin yanısıra genomdaki bütün genlerin işlev ve etkileşimlerini de incelemektedir. Tanskriptomik ile DNA’da ifadelenen bölgelerin ürünlerinin analizi hedef alınmıştır. Belli şartlar altında belli dokularda genom tarafından sentezlenen tüm proteinlerin analiz edilmesi Proteomik başlığı altında incelenirken metabolomik yaklaşımda ise metabolitler incelenmektedir.

Omik yaklaşımlara geçiş sürecinde üretilen bilginin ivmesel artışı ile başa çıkacak teknolojilere ihtiyaç doğmuştur. Yüksek işlem hacimli teknolojiler öncelikle dizi analizlerinde kendisini göstermiş sonrasında ise DNA mikrodizin teknolojisi ile aynı anda incelenen gen sayısı onlu rakamlardan onbinli rakamlara yükselmiştir. DNA mikrodizin



teknolojisi ile bütün genomun ifade profili bir başka anlatım ile transkriptom profili çıkarılabildiği gibi genomda bulunan TNP (Tekli nükleotid Polimorfizmleri)'lerin de profili çıkarılabilmektedir (1). Mikrodizin teknolojisi sayesinde elde edilen veriler, yeni bilişim teknolojilerinden olan biyoinformatik yöntemlerle işlenerek veri tabanları oluşturulmaktadır. Biyoinformatik, biyolojik problemlerin çözümünde kullanılan bilişimsel ve analitik metotların uygulamaları olup, insan genomundaki genlerin dizi analizi ve haritalanmasından elde edilen yeni bilgilerin analizinde önem taşımaktadır. Biyoinformatik, biyoteknolojik uygulamalar için imkanların geliştirilmesinde ve biyolojik sistemlerin daha iyi anlaşılması için modellerin üretilmesinde kullanılmaktadır (2). Bu çerçevede biyoinformatiğin kapsamıyla klinik, genomik ve proteomik veriler bir araya getirilerek pek çok hastalığın önlenmesi, tedavi stratejilerinin ve ilaçların geliştirilmesinin yanısıra tanıda kullanılacak tarama testlerinin geliştirilmesinde de ilerlemeler mümkün olacaktır.

Yükselen teknoloji ve gelişen biyoinformatik yöntemler ışığında güçlü bir ivme yakalayan genom ebadındaki yaklaşımlar ile araştırma stratejileri de güçlenmiştir. Genom ebadında analizler de global transkriptom ve genom ebadında yapısal değişikliklerin analizi sıkça kullanılan yaklaşımlardır. Bu yaklaşımlar sayesinde hastalıklara genetik yatkınlık, mutasyon tanımlama, ilaç direnci, hastalık gelişim ve ilerlemesinde etkin genler ve ürünleri tespit edilmektedir. Bu bağlamda global yaklaşımlar ile hastalıkların genetik temelini daha iyi anlaşılması ile hastalıkların daha iyi karakterizasyonu yapılabileceği gibi mevcut tedavi yöntemlerinin iyileştirilmesi veya yeni tedavi stratejilerinin gelişmesine önemli katkı sağlayabilirler. Aynı zamanda tanıda kullanılacak tarama testlerinin oluşturulmasında kullanılacak bilgiler açığa çıkartılabilir.

Astım, kanser, diyabet, kalp hastalıkları, obezite, alzheimer gibi önemli pek çok hastalıkta genom ebadında analizler ile bu hastalıkların gelişmesinde ve ilerlemesinde etkin rol oynayan gen veya gen grupları tespit edilmiştir. Bu çerçevede genom ebadında yaklaşımlarda en çok çalışılan hastalıklardan birisi de kanserdir.

Kanser, hücrenin proliferasyonu ve hücre döngüsünü kontrol eden genler ile hücrenin hayat süresini belirleyen genlerdeki mutasyon ve anormal aktivasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu ortaya çıkış pek çok basamaktan geçerek ve bir çok faktörün etken olarak

kendini göstermesi ile gerçekleşmektedir. Bu etkenler çerçevesinde hastalık, heterojen bir görünüme sahiptir. Tümör oluşumunda rol oynayan genlerin belirlenmesi; aday gen yaklaşımları, moleküler ve fonksiyonel analizler gibi zaman alıcı ve uzun uğraşlar sonucunda gerçekleşmekteydi. Ancak teknolojideki son gelişmeler sonucunda yüksek çözünürlüklü sekanslama ve mutasyon belirleme teknikleri ile birlikte insan genomunun sekanslanması hatırı sayılır derecede çok sayıda genin hızlı bir şekilde analizine imkan tanımıştır (3). İnsan genom projesiyle başlayan süreçte bugün devam eden kanser genom projesi ile açığa çıkan bilgilerden de faydalanılarak hangi genlerin ve genetik yolların kanseri tetiklediğine ilişkin bir harita tasarlanmakta ve yeni ilaçların ve tedavilerin gelişimi için önemli adımlar atılacağı öngörülmektedir.

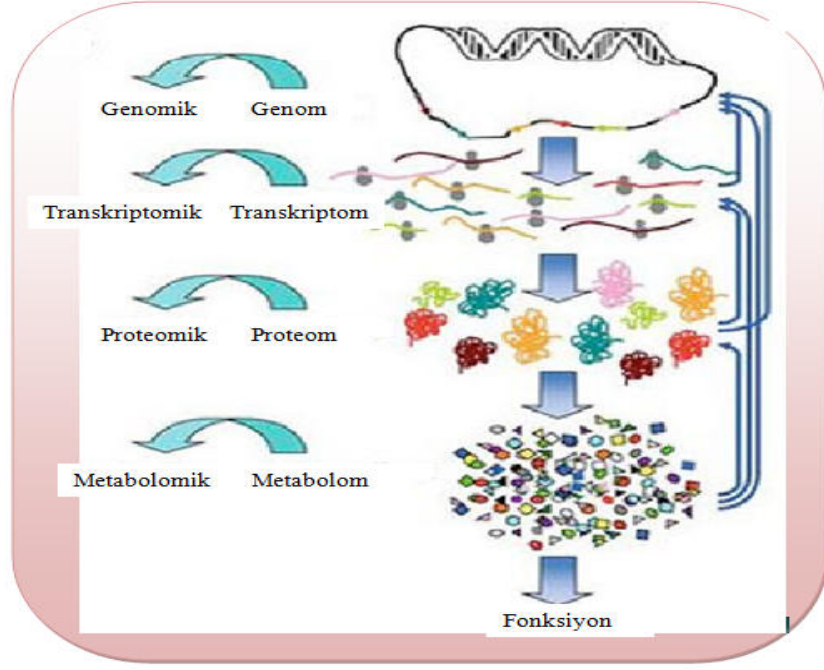
Kanser biyolojisindeki önemli sorulardan biri tümör hücrelerindeki bozulmuş gen ekspresyon paterninin belirlenmesi ve tümörigenezis boyunca oluşan spesifik genomik değişikliklerin bu patern ile ilişkisinin belirlenmesidir. Özellikle kanser hastalarında sık görülen bu geri dönüşümsüz yapısal genetik defektlerin karakterizasyonu bozuk olan resmin önemli parçalarının tanımlanması için gerekli bilgiyi sunmaktadır. Kompleks ve multifaktöriyel bir hastalık olan kanserin; ortaya çıkışı, ilerlemesi ve yatkınlık yaratan nedenlerinin ortaya konulmasında yapılacak entegre çalışmalar doğru teşhis ve tarama tekniklerinin uygulanması yanında doğru tedavi yaklaşımını öngörmeye önemli adımların atılmasını sağlayacaktır. Bu yaklaşımdan yola çıkılarak çizilecek resimde özellikle de bozuk gen ekspresyon paterni ve spesifik yapısal genomik değişikliklerin tüm genomda analizi bizlere doğru araçlarla tespit yapmamızı sağlayacaktır. Bu genomik ve transkriptomik analizler ile kanserin erken teşhisi ve tedavisinde etkin olan yeni aday genlerin tanımlanması gerçekleştirilebilmektedir. 2000'li yıllardan itibaren özellikle gelişmiş ülkelerde yoğun olarak yürütülmekte olan bu tip analizlerin ülkemiz popülasyonu için öncelikli olan kanserlerde geniş hasta gruplarında uygulanıp, popülasyonumuz için doğrulanmış gen ve gen gruplarının tanımlanması ülkemiz insanının sağlığı ve ülkemiz ekonomisi için büyük önem arz etmektedir. Sunulan bu tez çalışmasında dünyada ve ülkemizde en yaygın görülen kanser tiplerinden biri olan kolorektal kanser vakalarının %90'ını oluşturan sporadik vakalarda; kanserin tetiklenmesinde, oluşmasında ve ilerlemesinde etkin olabilecek yapısal değişiklikler ve global gen ifade farklılıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Zira kanser biyolojisine dair araştırmaların en önemli hedeflerinin başında tümör başlangıcı ve ilerlemesi ile ilgili tüm gen ve kromozomal değişikliklerinin spektrumunu görebilmek gelmektedir. Bu çerçevede çalışma kapsamında

global gen ekspresyon verileri ve kopya sayısı değişikliği verileri entegre edilmiş ve disregule olan gen listesi çıkarılmış aynı zamanda ilgili kromozom bölgeleri farklı ekspresyon değerleriyle birlikte analiz edilmiştir. Ayrıca moleküler bulgular ile demografik ve klinikopatolojik veriler ilişkilendirilerek, sonuçlar literatür eşliğinde değerlendirilmiştir. Kanseri vakaları ve aynı vakaların normal hücrelerinden elde edilen genomik ve transkriptomik veriler ışığında bulunan genler ve bu genlerin teşhis ve tedavide etki potansiyelleri literatür eşliğinde tartışılmıştır.

## 2.KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Omik Yaklaşımlar

Watson ve Crick'in DNA'nın çift sarmal yapısını bulmalarının (1953) ardından 50 yılı aşkın bir süre geçtikten sonra resmi olarak 1990 yılının ekim ayında başlatılan İnsan Genom Projesi (4,5), Nisan 2003'de tamamlanmıştır. İnsan genom projesi, genom dizisinin aydınlatılması yanında genlerin sayısı, yerleri ve düzenleri konusunda insanın karmaşık yapısının anlaşılmasında en önemli basamaklarından biri olmasının yanısıra genomdaki tüm varyasyonların tespit edilmesi ve hastalıklara yakalanma riskinin tanımlanmasında da yeni ufuklar açmıştır. İnsan genomunun tam dizisi belirlenmesi özellikle de genel ve kompleks hastalıkların genetik temeli ile ilgili olarak pek çok dikkat çekici soruyu da beraberinde getirmiştir (6,7). Bu soruların arkasındaki bilgilerin daha detaylı değerlendirilebilmesi için HapMap, ENCODE (the Encyclopedia of DNA Elements), 1000 Genom Projesi, Uluslararası kanser genom konsorsiyumu, Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) Epigenomik programı ve İnsan Mikrobiyom projesi gibi pek çok geniş kapsamlı proje başlatılmıştır. Bu projeler insan genetiğini ve genomunu anlamamıza önemli katkılar sağlamaktadır (8). Bu süreçte geleneksel biyoloji prosesleri de bütünü kapsayacak şekilde uygulama potansiyeli bulmuş olup ortaya "omik" yaklaşımlar çıkmıştır. "Omik" eki Yunanca'dan gelmekte olup "tümü" veya "hepsi" anlamına gelmektedir. Bu kelime etkileşimleri, yolları ve gen, transkript, protein, metabolit ve hücreler arasındaki interaktif ilişkiyi analiz etmekle birlikte biyolojik sistemdeki farklı bileşenler arasındaki dinamik etkileşimi de tanımlamaktadır (Şekil 2.1.). Omik teknolojilerin uygulamaları bakış açılarını değiştirmiş ve özellikle tıp alanında yeni görüşlerinin önünü açmış olup moleküler araştırma alanında yeni bir yaklaşım olmuştur. Omik teknolojileri temel olarak; Genomik, Transkriptomik, Proteomik ve Metabolik alanlarını içermektedir. Bir organizmanın genomu, karmaşık yapısı ve biyolojik fonksiyonu genomik başlığı altında incelenirken; binlerce genin ifade profili transkriptomik başlığı altında incelenmektedir. Proteomik; genlerin ürünleri proteinlerin ekspresyonu, protein modifikasyonu, hücresel fonksiyon ve gelişim, hastalık gibi pek çok biyolojik süreçte proteinlerin analizini kapsarken metabolomik ise hücre, doku, vücut sıvılarında bulunan metabolitlere ait kapsamlı çalışmaları içermektedir. Bu yaklaşımların kullanıldığı teknoloji platformları tespit edilecek genleri veya proteinlerin sayısını önemli ölçüde artıran yüksek işlem hacimli teknolojilerdir (9,10).



**Şekil 2. 1. Omik hiyerarşinin şematik gösterimi**

Genomik, epigenomik, proteomik, sitomik, metabolomik, interaktomik ve biyoinformatiği içeren ve gelişen omik teknolojilerinin pek çok hastalık türünde olduğu gibi kanser araştırmalarında ve kişiselleştirilmiş ilaç araştırmalarında da kullanımı hızla artmaktadır. Kanser; genetik mutasyonların (kalıtsal veya somatik) ve çevresel etkenlerin işe karıştığı çok faktörlü kompleks, genetik, proteomik ve hücrel bir hastalıktır. Yüksek işlem hacimli omik teknolojilerindeki son bulgular insan kanserlerinin moleküler analizlerinde beklenmeyen bir hızda ve detayda yeni fırsatlar sağlamıştır. Öngörüldüğü gibi omik teknolojileri kalitatif ve kantitatif patternde kanserin moleküler imzası hakkında bildiklerimizi hızlandıracaktır. Bu yeni omik teknolojileri, kanser hücrelerini; gen, transkript, protein, metabolit ve onların yeni ilaç hedefleri araştırmalarında etkileşimleri seviyesinde beklenmeyen yan etkiler için ilaç etkileşim mekanizmalarının tanımlanmasında, güncel ilaç hedeflerinin validasyonunda, yeni hedeflerin keşfinin hızlanmasında, yeni ilaçların potansiyel uygulamalarının araştırılmasında güçlü ve önemli bir potansiyel yaratmıştır (11). Bu potansiyel çerçevesinde genomik ve transkriptomik çalışmalarda kullanılan yaklaşımlar içinde kendilerine önemli bir yer bulmuşlardır.

### 2.1.1. Genom ve genomik

Genom bir organizmaya ait DNA'daki tüm kalıtsal bilgiyi kapsamaktadır (12). Genomik ise bir organizmanın genomunu veya genetik materyalini çalışan moleküler biyoloji alanında hızla yükselişe geçmiş ve genomun karmaşık biyolojik fonksiyonunu anlamada yeni teknolojilerin kullanıldığı bir çalışma alanı olmuştur. Moleküler biyoloji alanında görülen hızlı gelişmeler ve genomik teknolojilerinin gelişi hücre ve doku fonksiyonlarının moleküler detaylarını anlamamızda önemli bir artış sağlamıştır. Genomik'in önemli bir branşı çeşitli organizmaların genomlarının dizilenmesini kapsamaktadır. 1972'de Walter Fiers ve ekibi (Ghent Üniversitesi, Belçika) ilk defa bir genin (MS2 bakteriyofajı protein kılıf geni) dizisini belirlemişlerdir. Aynı ekip 1976'da MS2 bakteriyofaj RNA'sına ait tüm nükleotid dizisini çıkarmışlardır. İlk tüm genom dizisinin çıkarılması ise Frederick Sanger tarafından 1977 yılında X174 (5,368 bp) bakteriyofajının DNA'sının dizilenmesi ile gerçekleştirilmiştir (13). 1990 yılında başlatılan insan genom projesi kapsamında 1995 yılında Haemophilus influenzae'nin genom dizisi (1,8 Mb) çıkarılırken bir taraftan insan genomu dizilenmeye devam ediyordu ve 2001 yılında insan genomunun taslak dizisi de tamalanmıştır. 2005 yılında 1000 adet virüs, 220 bakteri türü, 20 ökaryot organizmanın genom dizilerine ait bilgiye sahiptik (10). Genomik uygulamaları;

- Genomun yapısı ve fonksiyonunun anlaşılması
- Hastalık ve hastalığın fizyolojik sürecinde etkili genlerin tanımlanması
- Genler ve genler arasındaki yapısal-fonksiyonel ilişkilerin ortaya konması
- Genlerin gelişimdeki rolleri ve ifade profilleri ile ilişkisi
- Farklı organizmaların genetik tabanlı olarak karşılaştırılması gibi pek çok çalışma alanında karşımıza çıkmaktadır (14,15).

Genomik ve moleküler bilginin artışı; hücre, organizma gibi yüksek organizasyonlu biyolojik sistemlerin ve bunların çevreyle etkileşimlerini anlamamıza temel teşkil etmektedir (16). Genomik teknolojilerin gen dizi ve korunmuş dizi bilgileri ile kombinasyonu biyolojik durum ile genetik varyasyonun korelasyonu için bir belirteç olma potansiyeli yaratmakla birlikte genomik teknolojiler işlevsel yolların biyokimyasal karakterizasyonu, farklı hastalıklara yatkınlık belirteçlerinin tanımlanmasında ve spesifik

tedavi yanıtlarının değerlendirilmesinde de önemli bir yaklaşım olarak dikkat çekmektedir (10).

Son yıllardaki teknolojik gelişmeler genomik alanın ilerlemesini ve yenilenmesini katalizlemiştir. Mikrodizin ve biyoinformatik genomik çalışmalar için en önemli araçlardır. Kanser genom atlas ve uluslar arası kanser genom konsorsiyumu gibi çeşitli kanser genom projeleri ile çeşitli kanserlerin mutasyonel imzasının çıkarılması ile hedef tedavisinde ve tanıda yeni öngörüler ortaya koyacaktır. Ek olarak akut myeloid lösemi gibi belirli kanser türleri hastalığa sebep olabilecek mutasyonların tanımlanması için dizilendi ve normal genom ile karşılaştırıldı (17). Genomiğin en büyük amacı genomun yapısını ve fonksiyonunu anlamaktır. Bu açıdan genomik klasik olarak tüm genomun fiziksel karakterizasyonunu içeren yapısal genomik ve gen ifade paterninin tüm karakterizasyonunu içeren işlevsel genomik olarak iki temel alana ayrılmaktadır (18). Post-genomik alan olarak da adlandırılan işlevsel genomik; genomda yer alan bütün fonksiyonel elementleri tanımlar, karakterize eder, lokalize eder ve birbiriyle etkileşimlerini incelemektedir. Bu yaklaşımın amacı; protein kodlayan gen fonksiyonunu ortaya koymak, RNA kodlamayan DNA dizilerinin potansiyel işlevlerini (yapısal düzenleme, ekspresyonun düzenlenmesi ya da diğer hücre davranışları) araştırmaktır. Bu yaklaşımın global anlamı; DNA dizinleri ile gen ifade profilinin çıkarılması ve binlerce ifade edilmiş dizi etiketlerinin (=expressed sequence tags EST) genom üzerinde haritasının çıkarılmasını içermektedir. Yapısal Genomik ise genlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu yerlerin gösterilmesini sağlayan genom haritalaması ve DNA nükleotid dizisinin saptanmasını sağlayan DNA dizi analizi yöntemleri aracılığıyla organizmanın genetik bilgilerinin açıklanmasına aracılık etmektedir (18).

### **2.1.2. Transkriptom ve Transkriptomik**

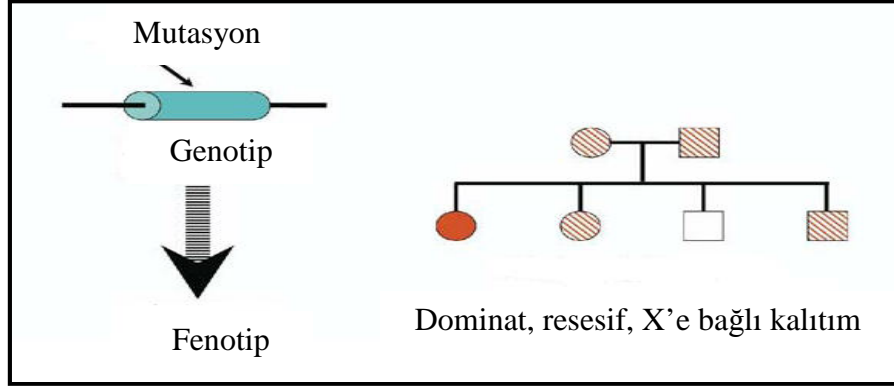
Transkriptom; hücrede bulunan tüm RNA moleküllerinin veya transkriptlerin toplamıdır. Transkriptomik ise hücre genomundan ifadesi gerçekleştirilen tüm mRNA transkriptlerinin kapsamlı olarak incelenmesi anlamına gelir. Genom hücreden hücreye sabit olmasına karşın gen ekspresyon profili dinamik bir yapıda olup hücrenin tipi ve içinde bulunduğu koşullara göre değişebilen bir karakter sergilemektedir ki her hücre gelişimleri sırasında ve farklı fizyolojik şartlar altında farklı zamanlarda farklı genleri kullanmaktadır. Genelde

dokular, kendilerine özgü herhangi bir bilgi olmadığında benzer gen setlerini eksprese ederler. Örneğin beyin bilinen genlerin % 30'unu eksprese eder ve beyine spesifik transkriptler kalpte ifade edilen genlerden farklıdır. Bu çerçevede ifade profiline özgü moleküler imzalar belirlenebilir ve bu profiller ile hücreler veya dokular doğru kategorilere ayrılabilir. Bu moleküler imzalar hastalıklar içinde kullanılmaktadır. Örneğin Alzheimer hastalığında nöronlar normal nöronlarla karşılaştırıldığında değişmiş gen ifade paternini sergilemektedir. Gen ifade analizi geniş kapsamlı ve yüksek işlem hacimli teknolojiler geliştene kadar tek tek yapılabiliyordu. Bu önemli gelişmeden önce northern blot ve kantitatif ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR), substraktif hibridizasyon, farklılık gösterimi (differential display) gibi teknikler kullanılmaktaydı. Şimdilerde ise aynı anda binlerce genin ifadesinin analiz edilebildiği farklı mikrodizin platformları bulunmaktadır (19). Bu kapsam çerçevesinde teknolojik gelişmeler eşliğinde tek seferde tek gen ifadesinin analizi yerine bütün tanımlanmış transkriptlerin çalışılabildiği geniş kapsamlı çalışmaları içeren transkriptomik alanı da omik yaklaşımlar içinde kendine önemli bir yer bulmuştur (10, 20, 21). Transkriptomik yaklaşımı alanında mikrodizin ve diğer yüksek işlem hacimli stratejilerin tek seferde binlerce genin analizine imkan verme özellikleri ile moleküler biyoloji alanındaki önemleri her geçen gün artmaktadır (22). Buradan çıkışla çok sayıda genin rol aldığı tümör oluşumunda mikrodizin teknolojisinin kullanımı da tek seferde binlerce geni tarayabilme imkanı ile ön plana çıkmıştır. Mikrodizin teknolojisi ile bir hücre populasyonundaki veya doku örneğindeki bütün genlerin ekspresyon paterninin geniş kapsamlı bir resmi çizilmektedir. Mikrodizinlerin sağladığı avantajlar arasında aynı anda birçok gen ile ilgili bilgi alınması, hızlı sonuç elde edilmesi, daha az sayıda deney yapılması, güvenilir olması sayılabilir. Mikrodizin teknolojisi kanser biyolojisinde TNP ve mutasyon tanımlanması, tümör sınıflandırması, tümör baskılayıcı hedef genleri tanımlanması, kanser biyobelirteç belirleme, ilaç direnci gibi pek çok sahada uygulama alanına sahiptir (23).

## **2.2.Omik'ten Kompleks Hastalıklara:Kanser ve Omik Yaklaşımlar**

Mendelyan hastalıklar, otozomal resesif, otozomal dominant, ya da X'e bağlı kalıtım gibi ailesel kalıtım paterni sergileyen bir veya birkaç mutasyondan kaynaklanan hastalıklardır (Şekil 2.2.).

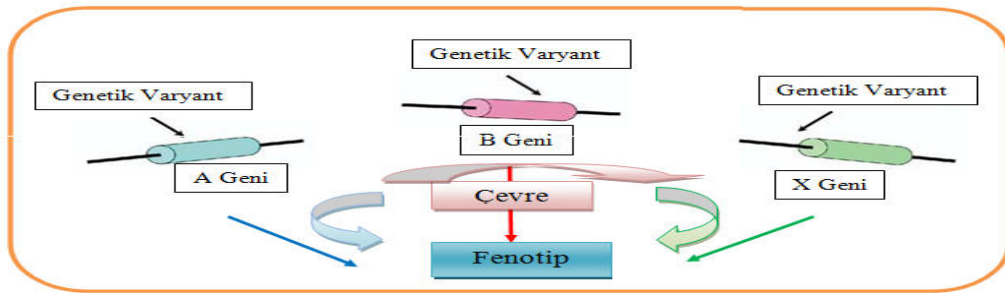




Şekil 2.2. Mendelyan hastalıklar (Lazaridis ve Juran, 2005'den alıntıdır)

Mendelyan hastalıklar toplumda genel görülen hastalıklar değildir. Mendelyan hastalıkların doğrudan genotipin fenotipe karşılığı olduğu için daha basit olarak nitelendirilmektedir. Günümüze kadar 1000'den fazla mendelyan hastalık tanımlanmıştır ve bu hastalıklarla ilişkilendirilmiş genler “Online Mendelian Inheritance in Man” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) adresinde kataloglanmıştır (18).

Kanser, diyabet, obezite gibi kompleks hastalıklara çok faktörlü hastalıklar olarak tanımlanmaktadır ki bu hastalıklar çok sayıda genin ve genetik varyasyonun yanı sıra çevresel faktörlerin de rol oynadığı yaygın görülen hastalıklardır (Şekil 2.3.). Mendelyan hastalıklarda görülen genotipin doğrudan fenotipteki etkisi kompleks hastalıklarda görülmemektedir. Bu sonuç kompleks hastalıklardaki heterojenliğin de bir yansımasıdır ki bu durum ilgili hastalıkların ilerlemesi, tedaviye verdikleri yanıt gibi pek çok parametreyi de etkilemektedir (18).



Şekil 2. 3. Kompleks hastalıklar (Lazaridis ve Juran, 2005)

Geçtiğimiz on yılda insan genom projesinin tamamlanması biyoloji ve tıp alanında bir temel taşı olmuştur. Geline süreçte elde edilen bilgilerin ivmesel artışı mikrodizin gibi yüksek işlem hacimli platformları da beraberinde getirmiştir. Bu metodoloji ile kanser gibi

çok sayıda genin işe karıştığı kompleks hastalıklarda transkriptom profilinin çalışılabilmesi bu alana önemli bir boyut katmakla birlikte bu yaklaşımın diğer konvansiyonel metodlar ile kombinasyonu tanı ve tedavide yeni potansiyeli yüksek imkanların da önünü açmıştır. Bununla birlikte proteomiks ile bireysel hasta seviyesinde hastalıkla doğrudan temas kurulabilmektedir. Bunun altında proteinlerin hastalıklar için önemli bir biyomoleküler hedef olması önemli bir yer tutmaktadır ki bu noktada tek belirteç yerine tüm proteom profilinin çıkarılması ilgili hastalık için tanı ve tedavide kayda değer bilgiler sunabilmektedir (24).

Astım, kanser, diyabet, kalp hastalıkları, obezite, alzheimer gibi önemli pek çok kompleks hastalıkta genom ebadında global analizler ile bu hastalıkların gelişmesinde ve ilerlemesinde etkin pek çok nokta için önemli bilgiler elde edilmiştir. Bu çerçevede kanser de genom ebadında yaklaşımlarda en çok çalışılan hastalıklardan; birisi olarak kendine önemli bir yer bulmuştur. Bu noktada kanser araştırmalarında yüksek işlem hacimli teknolojilerle gerçekleştirilen global analizler ile erken tanı ve etkili tedavi için biyobelirteç geliştirme, anahtar sinyal yollarının karakterizasyonu ve ilaç hedefi olabilecek genlerin tespiti gibi hedefler karşımıza çıkmaktadır. Ortaya çıkan kapsamlı bilgilerin işlenmesinde biyoinformatik devreye girmekte ve analizlerden çıkacak bilgiyi daha iyi değerlendirmemize fırsat yaratmaktadır. Ayrıca çalışmalarda omik yaklaşımların kombinasyonlarının kullanılması kanser ve diğer kompleks hastalıkların araştırılmasında beklentileri de üst düzeylere taşımaktadır. Özellikle kanser araştırmalarında bu yaklaşımların kombinasyonları ile:

- Kansere yatkınlık etkenlerinin tanımlanması
- Kanser sebebi mutasyonel imzaların tanımlanması
- Yeni bağımsız diyagnostik ve prognostik biyobelirteç tanımlanması
- Tedaviye yanıt farklılıklarının değerlendirilmesi
- Tedavide kullanılacak yeni hedeflerin geliştirilmesi en çok üzerinde durulan noktalardır (24).

Kanser omik çalışmaları tümörün, global gen ifade profili, DNA kopya sayısı, DNA metilasyonu ve genom ebadında dizilenmesi gibi farklı stratejilerle çalışılmasını kapsamaktadır. Kanser omik çalışmalarının amacı kanserde düzenlenmesi bozulan gen ve yolakların tanımlanmasıdır ki bu bilgi hastalığın profilinin çıkarılması ve yönlendirilmesinde önemli ipuçları sağlayabilmektedir. İki büyük uluslararası araştırma projesi pek çok kanser tipine ait omik verileri üretmiştir. Uluslararası kanser genom konsorsiyumu (ICGC) ve kanser genom atlas (TCGA) projelerinin amacı omik verilerini derlemek ve kanserin altında yatan moleküler mekanizma hakkında bildiklerimizi artırmaktır. ICGC her biri 50 farklı kanser tipi ve alt tipinden alınmış 500 tümörün geniş kapsamlı genom çalışmalarını koordine etmektedir. Bu projeile onkogenik mutasyonların büyük bir repertuarı çıkarılmakla birlikte klinikle ilişkili alt tiplerin ortaya konması ve yeni kanser tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi öngörülmektedir (25,26). Erken tanı ve tedavinin yanısıra özellikle meme, akciğer, kolorektal, prostat, servikal kanserler için hedef tedaviler milyonlarca kanser hastasının yaşam ömrünü uzatma potansiyeli için çok önemlidir (27). Günümüzde pek çok kanser türü için hedef tedaviler mevcuttur. Bu alanda öncülük eden çalışmalarda ilk olarak onkogenler tedaviler için hedef olmuşlardır. Bunlardan ilki ERBB2-pozitif meme kanserli hastalar için geliştirilmiş ERBB2 (HER2) reseptör antagonisti trastuzumabdır (Herceptin). Bunu kronik myeloid lösemi (KML) hastalarında görülen BCR-ABL1 füzyon genini hedef alan imatinib (gleevec) izlemiştir. Kronik myeloid lösemi (KML) hastalarının neredeyse tamamında saptanan BCR/ABL translokasyonuna bağlı artmış tirozin kinaz aktivitesi gözlenir. İmatinib bir tirozin kinaz inhibitörü olup KML hastalarında erken aşamada kullanılması durumunda çok etkilidir. Ayrıca bazı ilaçlar başka kanser tiplerinde de kullanılabilir. Bunun bir örneğini Gleevec sunar. Bu ilaç gastrointestinal stromal tümörlerde (GIST) bir mutasyon tarafından aktive edilen KIT gibi ek tirozin kinazları da inhibe ettiği keşfedilmiştir. Şimdilerde hedef keşfi genom abadındaki analizlerde de yerini almış ve yeni hedefler tanımlama da oldukça değerli bilgiler sunmuştur (25, 26). Örneğin; binlerce genin taranmasıyla ortaya konan ekspresyon imzası meme kanserinde prognoz için kullanılmaktadır (28). Ayrıca genomik çalışmalarda kliniğe aktarılmaya başlanmıştır. Translasyonel kanser genominiğinin çoğu başarısı genellikle tek genetik değişiklikler üzerinedir. Bununla birlikte genetik olarak kompleks tümörler pek çok değişiklikle karakterizedir ve bu çerçevede benzer tümörlerde dahi karşımıza çıkan moleküler heterojenite, farklı pek çok yolakta görülen değişiklikler, aynı yolak üzerinde farklı komponentlerin bozulması gibi çeşitli problemler tedaviye yanıtın değerlendirilmesi gibi pek çok önemli konuda birer engel teşkil etmektedir.

Örneğin bazı akciğer kanserleri EGFR onkogenindeki mutasyon ile karakterize iken bazıları KRAS mutasyonları sergilemektedir. Bu doğrultuda bu tümörler benzer histolojik görüntüye sahip olsalar bile EGFR inhibitörlerine farklı terapötik yanıtlar sergilemektedirler. Bu noktada ilgili tedavi yaklaşımında moleküler heterojenite önemli bir rol oynamaktadır (25). Kanser omik çalışmaları genetik olarak heterojen tümörler alt tiplere ayrılabilir ve bu bilgiler kliniğe kullanışlı bir bilgi olarak yansıyabilir. Örneğin meme kanserinin 5 alt tipi global moleküler profillemeye çalışmaları ile belirlenmiştir ve her biri tedavi yanıtı, prognoz gibi farklı klinik ölçümlerle ilişkilidir (29).

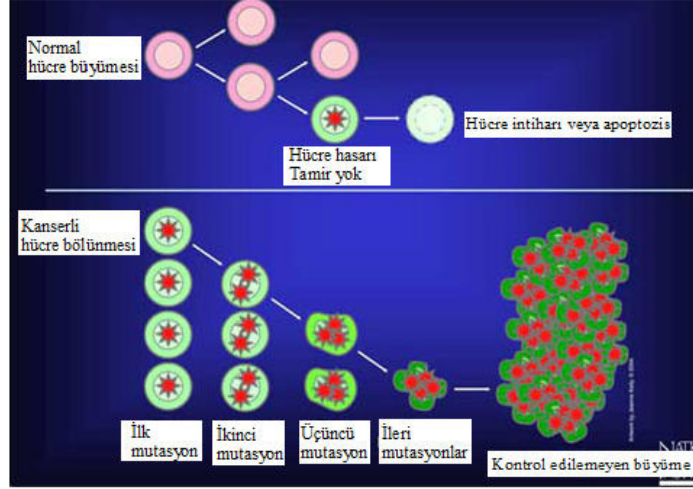
Omik araştırmalarındaki temel ortak görüş bu çalışmaların yeni keşiflerin kapılarını aralayacak olmasıdır. İyi tanımlanmış olgulardan elde edilen entegre edilmiş omik ve epidemiyolojik veriler genetik değişiklikler, çevresel etki ve spesifik klinik fenotip ilişkisini ve kanser biyolojisini daha iyi anlamamıza yardımcı olmaktadır (25). Tek tek komponentleri çalışmak kanserin karmaşık resminin çözümünde etkili bir yol olmayacaktır. Omik yaklaşımlar ve bu yaklaşımların kendi içlerinde kombinlenerek gerçekleştirilen çalışmalar bu karmaşık resmin çözümünde daha etkili olacağı düşünülmektedir (26). Kanser ve sahip olduğu karmaşık hikayenin başlıklarının iyi anlaşılması doğru analiz ve değerlendirmeler için büyük önem arz etmektedir.

### **2.3.Kanser**

Kanser, hücrenin proliferasyonu, hücre döngüsünü, hücre ölümünü kontrol eden genler ile hücrenin stabilitesini belirleyen genlerdeki mutasyon ve anormal aktivasyon sonucu ortaya çıkmaktadır ki bu ortaya çıkış pek çok basamaktan geçerek ve bir çok faktörün etken olarak kendini göstermesi ile gerçekleşmektedir (30).

Normal hücre büyümesinde büyümenin ilerlemesi ile sınırlandırılması sinyalleri arasında iyi kontrol edilen bir denge mevcuttur. Bir yara iyileşme süreci ve normal doku yenilenmesi gibi durumlarda bu denge hücre sayısını artırma yönüne eğilimli olmaktadır ve bu süreçte hücre farklılaşması belirli bir düzen içinde gerçekleşirken ihtiyaç ortadan kalktığında ise çoğalma durmaktadır. Oysa tümör hücrelerinde bu düzen ve kontrol bozulmuş olup sürekli bir hücre çoğalması görülürken farklılaşma kaybolmuş; normal programlı hücre ölümü prosesi de artık işlemiyordur. Kanser, mutasyonlu tek bir hücreden

doğabilir ve bu mutasyonlar diğerlerine göre kanser hücrelerine büyüme avantajı kazandırdıkları gibi onları normal proliferasyon kontrolünden de kaçmalarına imkan tanımaktadır.



Şekil 2. 4. Normal ve kanserli hücre büyüme durumu (www.cancer.gov adresinden alıntıdır)

İlk mutasyon hücrelerin genetik olarak homojen kopyalarını oluşturmak için bölünmelerine sebep olmaktadır. Daha sonra sırasıyla hücrenin çoğalma kapasitesini artıran ek mutasyonlar oluşur. Bu mutasyonlar her biri farklı alt klonların oluşumunu hızlandırdıkları gibi tümörlerin heterojen yapısına da önemli katkı yapmaktadırlar ve kanserin çok adımlı doğasını oluştururlar.

Tümörler benign ve malign olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadırlar. Bening tümörler; boyutlarını sınırlayan bir kapsül içinde büyürler, hücresel orjinin karakterlerini muhafaza ederler ve genellikle iyi diferansiyedirler. Malign tümörler farklı alanlara yayılma eğilimlidirler ve etraflarında büyümelerini sınırlandıran bir kapsül yoktur. Tümör içindeki farklı klonlar metastaz için farklı özelliklere sahiptirler.

Tümör hücreleri normal hücrelerden ayıran özellikler vardır:

- 1) Büyüme faktörlerine bağlı değildirler. Çünkü kendi çoğalmalarını yönlendirecek büyüme faktörlerini salgılama (otokrin uyarma) yetileri vardır ya da hücre yüzeyindeki büyüme faktör reseptörleri değişmiştir.
- 2) Tümör hücrelerinde büyümeyi durduran sinyallere duyarsızlık ve programlı hücre ölümünden kaçabilme yetisi vardır

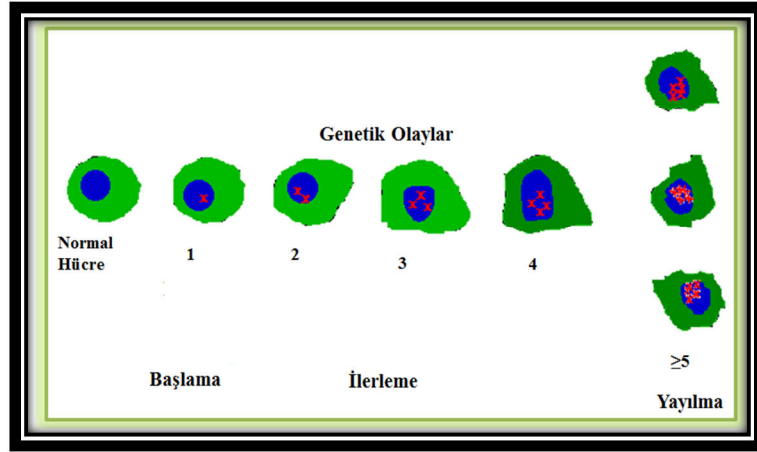
- 3) Normal hücreler büyümelerin sırasında hücrelerarası çevrede kontakt kurma ihtiyacı duyarken tümör hücreleri bu bağlantıdan bağımsız hareket etmektedir. Normal hücreler diğer hücrelerden sorumludur. kültürde, normal hücreler komşu hücrelere yapışarak ilişkilerini devam ettirirler ve “kontakt inhibisyon” kapsamında tek tabaka oluşturur ve daha fazla çoğalmak için tümör hücrelerinde kontak inhibisyon kaybı yaşandığı için sürekli çoğalarak birkaç tabakalı düzensiz kitleler oluştururlar.
- 4) Tümör hücreleri normal hücrelere göre daha adhesivdir.
- 5) Normal hücreleri belli bir yoğunluğa ulaştıklarında çoğalmalarını durduruken tümör hücreleri çoğalmaya devam etmektedirler, sınırsız bölünme ve çoğalma ve yetisine sahiptirler (31).

Bu çerçevede tümörün oluşumunun ve gelişiminin hikayesini anlamada kanserin moleküler biyolojisi önemli bir yer tutmaktadır.

### **2.3.1.Kanserin moleküler biyolojisi ve karsinogenez**

Karsinogenez; normal bir hücrenin tümör hücresine dönüşmesi ve çoğalarak bir kitle oluşturması sürecini tanımlamaktadır ki bu süreç çok adımlı bir yapıda ilerlemektedir. Bu çok adımlı karsinogenez konsepti ilk kez Berenblum and Schubik tarafından 1948 de tanımlanmıştır ve daha sonraki çalışmalar da bu çerçevenin destekleyicisi olmuştur (32). Bu konseptte seçici hücre büyüme avantajı ve farklı seviyelerde büyümenin kontrolünün bozulmasını sağlayan genlerdeki mutasyonlar rol almaktadır. Bu noktada karsinogenezde süreç başlama, ilerleme ve yayılma olmak üzere 3 ana aşama ile ifadelendirilmektedir. Başlama; tersinir olmayan genetik değişiklikleri kapsamaktadır ki genellikle de başlangıç bir gendeki bir mutasyondur. İlerleme; başlangıç hücrelerinin sayısını artıran hızlanmış proliferasyonu ifade ederken yayılma ise malign veya invazif fenotipe yol açan daha fazla genetik mutasyonun birikmesi anlamına gelmektedir (Şekil 2.5) (32, 33). Bu kapsamda değerlendirildiğinde kanserler genetik orjinlidir ve tümör gelişiminde itici güç genetik mutasyonlardır. Bir tümör yalnızca somatik orjinli mutasyonların birikimi ile ya da kalıtılan bir mutasyonla gelişebilir ve bunları yeni mutasyonların varlığı takip etmektedir. Bu 2 genetik tavır da sırasıyla somatik ve kalıtsal kanserleri ayırmaktadır. Neoplastik fenotip; genomik değişiklikler, gen ifade düzeyindeki değişiklikler, epigenetik değişiklikler ve kanserle ilişkili genlerdeki dizisel mutasyonlardan türemekle birlikte bunların sonraki

seçimleri ve bir hücrenin klonal popülasyonundaki birikimleri tümörün gelişip gelişmeyeceği ve gelişmesi ve ilerlemesinde gerekli zaman ile ilgili belirleyici faktörlerdir. Bu kapsamda neoplastik fenotipin temelinde “tümör baskılayıcılar” ve “onkogenler” olmak üzere 2 ana kanser gen ailesi ön plana çıkmaktadır (34).



Şekil 2. 5. Karsinogenez süreci

### 2.3.1.1. Onkogenler

Normal hücre büyüme ve farklılaşmasını destekleyen genler olan protoonkogenler herhangi bir nedenle mutasyona uğrarlarsa **onkogenlere** dönüşürler. Genelde proto-onkogenler büyüme, çoğalmayı ve hayatta kalmayı kontrol eden genlerdir. Aktive onkogenler de yalnızca bir allelde gelişen mutasyonun etkisiyle hücre neoplastik fenotipe doğru çağalma ve ilerleme eğiliminde olur ki bu durum onkogenlerin hücre seviyede dominant etkiye sahip olduklarının da bir göstergesidir. Bu gen sınıfı retroviral tümörigenez çalışmalarında keşfedilmiştir. Viral transduksiyonla uyarımın dışında nokta mutasyonları, translokasyonlar ve gen amplifikasyonları gibi çeşitli mekanizmalarla proto-onkogenler onkogenlere dönüşmektedirler (34, 35, 36). Bu genler:

- Büyüme faktörleri
- Tirozin kinaz aktivitesine sahip büyüme faktör reseptörleri
- Sinyal iletiminde görevli düzenleyici proteinler
- Reseptör olmayan tirozin kinazlar
- Serin-threonin kinazlar
- Transkripsiyon faktörleri gibi proteinleri kodlarlar.

Bu proteinler; büyüme, farklılaşma ve programlı hücre ölümü gibi pek çok önemli hücresel olayda önemli rollere sahip moleküllerdir. Örneğin Ras gen ailesi pek çok tümörün gelişimde rol oynayan en bilinen onkogenlerdendirler. Bu onkogen p21 isimli hücre proliferasyonunda görev alan bir proteini kodlamaktadır. Ras proto-onkogeninin belirli ekzonlarında meydana gelen mutasyonlar sonucunda bu protein sürekli bir aktivite kazanmaktadır ki bu da hücreyi sürekli proliferasyon yönünde uyaran bir sinyal yolunun açık kalması anlamına gelmektedir (36). İşlev kazancı sağlayan bu mutasyonların yanında kromozomal translokasyonlar da onkogen aktivasyonu ile sonuçlanabilmektedir. Buna en iyi örnek Philadelphia kromozomudur. Kronik myeloid lösemide (KML) kromozom 9 ve 22 arasında gelişen t(9;22) translokasyonunda, 9. kromozomda bulunan ve tirozin kinaz aktivitesi olan ABL geni, kromozom 22q'da bulunan "breakpoint cluster region" (BCR) geniyle birleşmektedir. Oluşan bu füzyon geni tirozin kinaz aktivitesi yüksek bir proteini sentezlenmektedir ki KML gelişiminde artmış bu protein kinaz aktivitesinin anlamı çok büyüktür (37).

### **2.3.1.2. Tümör baskılayıcı genler**

Tümör baskılayıcı genler hücre büyümesini baskılayan ve programlı hücre ölümünde görev alan proteinleri kodlamaktadırlar. Bu genlerin işlev kaybına neden olan mutasyonlarla inaktive edilmeleri kontrolsüz hücre çoğalması ile sonuçlanmaktadır (34). Epidemiyolojist Alfred Knudson retinoblastoma ile ilk tümör baskılayıcı genin tanımlanmasını sağlayan çalışmaya imza atmıştır. Retinoblastoma, çocukluk çağına özgü son derece nadir bir göz tümörüdür ve tümör ailesel olgularda sporadiklere göre daha erken yaşta ortaya çıkmakta ve bilateral (ya da çok odaklı) olabilmektedir. Bu olgular 13. kromozomlarında bulunan RB1 geninde mutasyon taşımaktadırlar. Bunun üzerine Knudson ailesel ve sporadik retinoblastomaya ait epidemiyolojik verilere dayanarak ortaya attığı "iki vuruş" hipotezini geliştirmiş olup tümör baskılayıcı aktivitenin kaybı için iki inaktive edici mutasyonel olayın gerçekleşmesi gerektiğini vurgulamıştır yani tümör süpressör geninin her iki kopyası "iki vuruş"la inaktive olmaktadır. Kalıtsal olanın farkı, ilk vuruşun vücudun tüm hücrelerinde doğumsal olarak varlığıdır ki bu durum herhangi bir retina hücresinde ikinci bir vuruşun gerçekleşmesiyle tümörün yaşamın daha erken döneminde gelişebilmesi anlamına gelmektedir. Sporadik kanserlerde ise aynı retina hücresinde doğumdan sonra



RB1 geninin iki kopyasında da iki vuruşla mutasyon oluşup işlev kaybı yaşanması gerekmektedir (38).

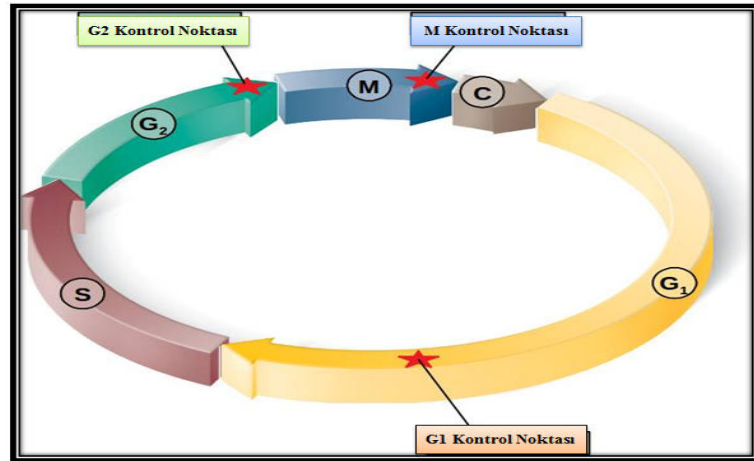
Tümör baskılayıcı genlerde görülen en yaygın mutasyonlar; nokta mutasyonları, inversiyon, mikrolelesyon veya makro delesyonlar ve translokasyonlardır. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyon şekillerinden birisi de heterozigotluk kaybı (loss of heterozygosity; LOH) olarak belirtilmektedir. Genellikle tümör baskılayıcı genlerin bulunduğu kromozomal bölgelerin delesyonu, mitotik rekombinasyon esnasında veya mitotik ayrılmama kaynaklı olarak oluşabilmektedir. Bu durumun örneği yine retinoblastoma üzerinden verilmektedir. Ailesel retinoblastomada bireyler normal dokularından RB1 geni açısından heterozigot iken; bu bireylerin tümör dokusunda yalnızca mutant RB1 allelini taşıdıkları ve normal alleli taşımadıkları saptanmıştır ki bu heterozigotluk kaybı sporadiklerde dahil pek çok tümör tipinde görülmektedir (34). Geline noktada tümör protein 53 (TP53 veya p53), siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A), PTEN, Wilms Tümör geni (WT1), adenomatöz polipozis koli (APC) geni gibi hücre için pek çok önemli işlevde rolleri olan tümör baskılayıcı genler tanımlanmış olup bir çok farklı yolakda görev alan bu genler bekçi (gatekeeper) ve bakıcı (caretaker) olmak üzere 2 sınıfa ayrılmıştır. Bekçi genler Tp53, APC, CDKN2A gibi hücre döngüsünde görev alan, hücreyi apoptozise yönlendiren ve doğrudan proliferasyonda etkili genlerdir. Bakıcı genler ise kanser gelişimi için gerekli olmamakla birlikte dolaylı etkiye sahiptirler ve genomik bütünlükten sorumlu DNA tamir genleri bu grupta yer almaktadır. Bu genlerde bir mutasyon geliştiğinde genom diğer gelişebilecek mutasyonlara daha açık hale gelmektedir ve genomik instabilite ortaya çıkmaktadır ki bu durumda bekçi genlerde mutasyon olma olasılığı artmaktadır (39).

### **2.3.2.Hücre döngüsü, apoptozis ve kanser**

Proliferasyon bir çok alt programı olan karmaşık bir süreçtir ve bu sürecin kalbinde hücre döngüsü bulunmaktadır. Normal şartlarda bir seri kontrol noktası içeren bu döngü; büyüme, beslenme durumu, hücre boyutu, büyüme faktörlerinin varlığı ya da yokluğu ve genomun bütünlüğü gibi parametreler çerçevesinde denge durumunu gözetmektedir. Başka bir deyişle bir hücre popülasyonundaki homeostasis hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasında önemli bir denge ve iletişim ile sürdürülmektedir. Hücre büyümesi ve hücre

ölümü arasındaki bu dengenin bozulması ve çoğalma yönünde kayması tümör gelişimine neden olabilmektedir (33, 34,40).

Hücre döngüsü birbiriyile koordineli 4 ana fazdan oluşmaktadır. Bunlar; G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> ve M fazlarıdır. Genel olarak, bir proliferasyon uyarısı almayan hücreler hücre döngüsünün aktif (G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, S ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı denilen G<sub>0</sub> fazında beklerler. G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> kısaltmaları “gap” (ara, boşluk) sözcüğünden gelmektedir. S ise DNA sentezi (replikasyonu) fazını ifade ederken M mitozis aşamasını tanımlamaktadır. Hücreler bölünme uyarısı aldıkları zaman bu fazdan ayrılıp G<sub>1</sub> fazına yani siklusun ilk fazına girmiş olurlar. Bu fazda hücre boyutu artar, protein sentezi meydana gelir ve DNA sentezi için hazırlıklar yapılır. DNA replikasyonu S fazında gerçekleşirken G<sub>2</sub> fazında DNA sentezi durur, hücre büyümeye devam eder ve yeni proteinler sentezlenerek M fazına hazırlıklar yapılır. Mitoz fazında ise hücre birbirinin benzeri iki hücreye ayrılır. Mitozu takiben oluşan yeni hücreler şartlara göre G<sub>0</sub> ya da G<sub>1</sub> dönemine girmektedir (Şekil 2.6) (33,34,41).



Şekil 2. 6. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları

Hücre proliferasyonu, hücre döngüsü içinde yer alan bazı kontrol noktaları tarafından kontrol edilmektedir. Hücre siklusunda G<sub>1</sub>-S geçişinde, G<sub>2</sub>-M geçişinde ve M evresinde metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır. Bu kontrol noktalarında hücrenin siklusa devam edip etmeyeceği kararı verilir ve gerekli olan durumlarda apoptozis (programlı hücre ölümü) de aktive edilir. Bu önemli kontrol mekanizmasında siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (cyclin dependent kinases, CDKs) olmak üzere 2 hücre döngüsü protein sınıfı rol almaktadır (33). Siklin bağımlı kinazlar tek başlarına inaktif formda bulunurken

siklinlere bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Bu komplekslerde siklinler düzenleyici (regulator) alt ünite rolünü üstlenirken; siklin bağımlı kinazlar ise katalitik alt ünite olarak görev yaparlar. Şimdiye kadar 9 tane siklin bağımlı kinaz tanımlanmış olup bunlardan 5 tanesi hücre döngüsünde aktiftir. Siklinler hücre döngüsünün farklı fazlarında etkin olup çizelge 2.1.'de özetlenmiştir.

**Çizelge 2.1. Hücre döngüsünün farklı noktalarında aktif olan siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksleri**

Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK)	Siklinler	Hücre Döngüsü Fazları
CDK4	Cyclin D1, D2, D3	G1 fazı
CDK6	Cyclin D1, D2, D3	G1 fazı
CDK2	Cyclin E	G1/S faz geçişi
CDK2	Cyclin A	S faz
CDK1	Cyclin A	G2/M faz geçişi
CDK1	Cyclin B	Mitoz
CDK7	Cyclin H	Bütün fazlar

Siklin bağımlı kinazların protein seviyeleri hücre döngüsü boyunca sabit iken siklinlerin protein seviyesi artıp azalarak siklin bağımlı kinazları aktive ederler (42). Siklin bağımlı kinaz aktivitesi siklinlere ek olarak korunmuş treonin ve tirozin rezidülerinin fosforilasyonu ile de düzenlenmektedir. Bu fosforilasyonlar konformasyonel değişikliği indükleyip siklinlerin bağlanma kapasitesini artırır (43). Siklin bağımlı kinaz aktivitesi aynı zamanda siklin bağımlı kinaz inhibitörlerince (CKI) de düzenlenmektedir. Bu düzenlenme yalnızca siklin bağımlı kinazlara ya da siklin komplekslerine bağlanarak gerçekleştirilmektedir. INK4 ailesi (p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18(INK4c), p19 (INK4d)) ve Cip/Kip ailesi (p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2)) olmak üzere 2 ayrı siklin bağımlı kinaz inhibitör ailesi tanımlanmıştır (42).

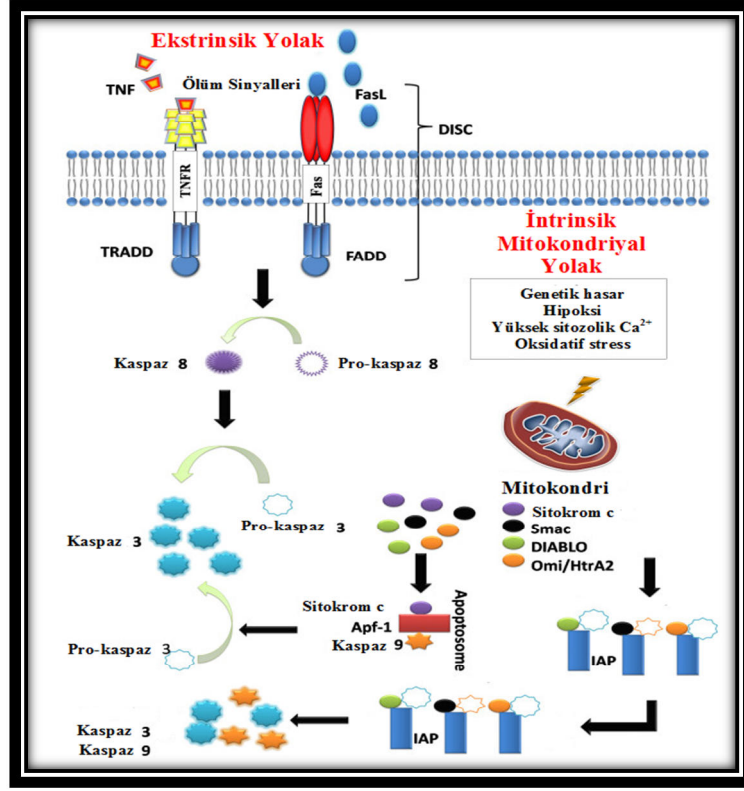
Hücre döngüsü ve kontrol mekanizmaları ile kanseri ifade eden kontrolsüz çoğalma tanımını yanyana getirdiğimizde hücre döngüsünün kanserin oluşumu ve ilerlemesi hikayesinde önemli karakterlerden biri olduğu anlaşılmaktadır. Hücre döngüsünün

kontrolünün bozulması kanserle sonuçlanır ki bu da hücre döngüsünde farklı seviyelerde görev alan proteinlerdeki mutasyon, gen ifade değişimleri gibi genetik değişimlerle ilişkilidir. Bu noktada proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde sıklıkla mutasyon gözlenmektedir. Proto-onkogenlerin mutasyonlu versiyonları yani onkogenler tümör büyümesini yönlendirmektedirler. Rb ve p53 gibi tümör baskılayıcıların inaktivasyonu hücre döngüsünün ilerlemesini inhibe eden proteinlerin fonksiyonlarının bozulmasıyla sonuçlanmaktadır. Hücre döngüsünde bu değişimler sıklıkla siklinler, siklin bağımlı kinazlar, inhibitörleri ve kontrol noktasındaki diğer proteinlerde görülmektedir (42). Gerçekten siklin D1'in artmış ifadesi insan kanserlerinde en sık karşılaşılan anormalliklerden bir tanesi olup siklin D1'deki bu değişim meme kanserinde ~%60, kolorektal kanserde %40, skuamöz hücreli kanserde % 40 ve prostat kanserinde % 20 sıklıkla etkin olduğu belirtilmektedir (44-46). Leach ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada siklin D2 ve siklin E'nin kolorektal kanserde vakalarında amplifikasyonu gösterilmiş olup kolorektal tümörigenezdeki önemi vurgulanmıştır (47). Ayrıca S fazındaki aktivasyonda rol oynayan Cdc25B'nin primer meme kanserin % 32'sinde ifadesinde artış olduğu belirtilmektedir (42). Hücre döngüsünde görev alan genler ve kanserdeki etkileri üzerine olan bu bulgular daha da çoğaltılabilir. İnsan kanserlerinde hücre döngüsü kontrolünün kaybı olası tedavi önlemleri için önemli bir potansiyel arz etmektedir. Eğer kanser hücrelerinde yeni sınırlayıcı kontrol noktaları dizayn edilebilirse tümör hücrelerindeki kontrolsüz çoğalmanın önüne geçilebileceği düşünülmektedir. Bu noktada siklin bağımlı kinazlar önemli birer potansiyel hedefdir. Siklin bağımlı kinazların aktivitelerini durdurabilecek inhibitörlerin dizaynı doğrudan etkili bir strateji olarak ön plana çıkmaktadır. Siklin bağımlı kinaz inhibitörlerini anti-tümör ajanları yapan 3 önemli özellik mevcuttur. Birincisi potansiyel anti-proliferatif ajanlardır, ikincisi tek başlarına ya da başka hedeflerle kombinasyonları ile apoptozisi tetikleyebilirler ve son olarak siklin bağımlı kinazların inhibisyonu hücrelerin farklılaşmasına katkı sağlayabilir. Bu aşamada yalnızca flavopiridol ve UCN01 (7-hydroxystaurosporine)'in klinik denemeleri mevcut olmakla birlikte siklin bağımlı kinaz inhibitörleri üzerinde araştırmalar devam etmektedir (42).

Hücrenin çoğalması ve farklılaşması kadar ölümünde bir hücrenin yaşam döngüsünün temel unsurlarındandır. Hücre ölümünde, **nekroz** ya da **apoptoz** süreçleri etkilidir. Birçok canlı türü apoptoz yolu ile yaşlı, hasarlı ya da anormal hücreleri belirli bir program çerçevesinde kontrollü olarak ortadan kaldırarak homeostazın sürdürülmesini sağlamaktadırlar. Bu

durum apoptozu nekrozdan ayıran noktadır. Nekrozda hücreler belirli bir kontrol olmaksızın lizise uğramaktadırlar (48).

Apoptozis mekanizması, uyarıcı molekül ve hücre tipine göre bazı değişiklikler gösterebilmektedir. Bu mekanizmada genel olarak büyüme faktörleri, onkogenler, tümör baskılayıcı genler önemli rollere sahip olup büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, tümör nekroz faktör (TNF), Fas ligand, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktive olması, TGF-B (Transforming Growth Factor), viral-bakteriyal enfeksiyonlar, seramid ve kemoterapötik ilaçlar gibi çeşitli sinyallerle tetiklenmektedir (49). Bu sinyaller çerçevesinde çekirdek, sitoplazma ve hücre zarında programlı hücre ölümüne spesifik biyokimyasal ve morfolojik bazı olaylar gerçekleşmektedir. Bu kapsamda apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, hacimce küçülmeye başlayıp büzülürler. Apoptotik uyarı alan hücre komşu hücrelerle bağlantısını keser ve normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidilserin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yüzeyine transfer edilir. Böylece apoptotik hücreler makrofajlar tarafından fagosite edilmek için tanınır hale gelir. Plazma ve çekirdekte kondensasyon yaşanırken genetik materyal de kümelenmeye başlar. Ayrıca elektroforez yapıldığında 'ladder patern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşturan DNA'nın endonükleaz enzimiyle 180-200 baz çifti büyüklüğünde parçalara ayrılması apoptozisin en önemli karakteristik özelliklerindedir. Program, hücrenin parçalanması ve apoptotik cisimciklerin fagosite edilmesi ile son bulmaktadır (48, 49). Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, Bcl-2 ailesi ,p53, kaspazlar, ölüm reseptörleri, sitokrom-c, seramid gibi proteinler ve mitokondri rol oynamaktadır. Bu moleküller çerçevesinde apoptozis mekanizması intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörleri) olmak üzere 2 ayrı tablo şeklinde değerlendirilmektedir (Şekil 2.7.) (48).



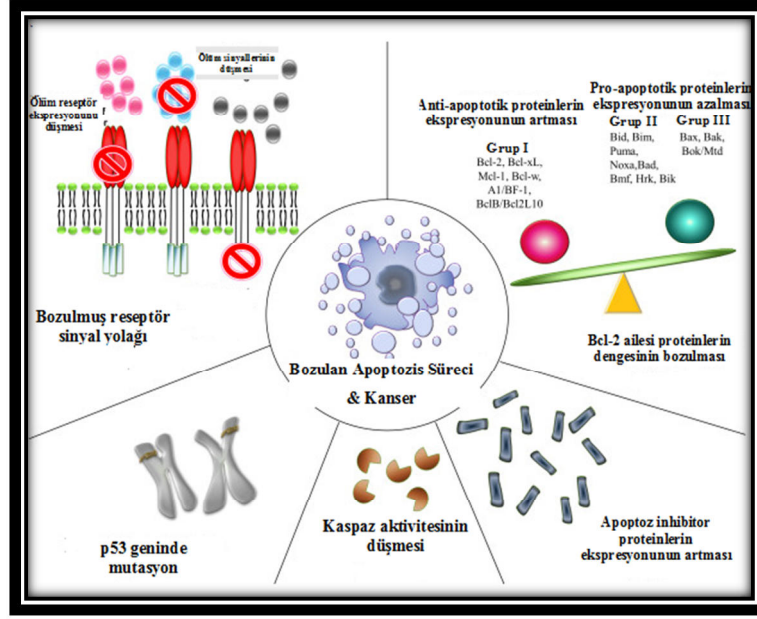
Şekil 2.7. Apoptozis ekstrinsik ve intrinsik yolları (Wong RS 2011'den değiştirilerek alınmıştır.)

Ekstrinsik ölüm reseptör yolağında ismiyle eş olarak ölüm ligandlarının ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlamaktadır. Pek çok ölüm reseptörü tanımlanmış olmakla birlikte en bilinenleri TNF reseptör tip 1 (TNFR1), Fas (CD95) ve onların ligandları TNF ve Fas ligand (FasL) dır(51). Bu reseptörler TRADD (TNF receptor-associated death domain) ve FADD (Fas-associated death domain) gibi hücre içi domainlere sahiptirler. Ölüm ligandı reseptöre bağlanınca bu domainler ve sonrasında kaspaz 8 aktifleşir. Bu noktada ligandın reseptöre bağlanması ile adaptor protein için bağlanabileceği bir formasyon oluşur ve böylece “death-inducing signalling complex (DISC)” adı verilen ligand,reseptör adaptör protein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks daha sonra pro-kaspaz 8’in aktifleşmesini sağlamaktadır. Bu enzimin aktif formu kaspaz 8 başlatıcı kaspaz olarak süreci başlatmaktadır (48,52). İntrinsik yani mitokondriyal yolak ise ismiyle eş olarak hücre içinde başlamaktadır. Genetik hasar, hipoksi, yüksek sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu ve oksidatif stress gibi tetikleyiciler intrinsik mitokondriyal yolak ile apoptoz sürecini başlatmaktadır (52). Apoptotik uyarı ile birlikte mitokondride geçirgenlik artar ve sitokrom c ve apoptosis indükleyici factor (AIF), gibi pro-apoptotik moleküller sitoplazmaya salınır.

Bu yolak Bcl-2 ailesinden bir grup protein tarafından regüle edilmektedir. Bu gen ailesi pro-apoptotik (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk) anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1) olmak üzere 2 ana gruba ayrılmıştır. Antiapoptotik proteinler sitokrom c'nin mitokondriden salınımını durdurma yönünde çalışırken pro-apoptotik proteinler bu salınımı yönlendirmek üzere çalışmaktadırlar. Bu 2 grup protein arasında apoptozisin başlayıp başlamasının kararının verildiği bir denge mevcuttur. Bu yolakda sitokrom c, bir sitoplazma proteini olan Apaf-1' in aktivatörüdür. Sitokrom c'nin Apaf-1 'e bağlanması ile prokaspaz-9 aktive olur ve "apoptosom" kompleksi oluşur. Bu mekanizma bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır ve hücre apoptoza yönelir (48).

Hücre ölümü ile yine bu bölüm kapsamında değerlendirilen hücre çoğalmasında pek çok bağlantı bulunmaktadır. İlk olarak apoptozis hemen hemen bütün çoğalan hücrelerde mevcuttur; ikincisi geç G1 fazında etkili moleküller apoptozis içinde gereklidir. Üçüncüsü geç G1'den S fazına geçişte p53 ve siklin bağımlı kinazlar gibi ortak pek çok molekül mevcuttur (50). Bu ilişkiden yola çıktığımızda hücre döngüsünde kanserleşme yönündeki değişiklikler (kontrolsüz çoğalma) ile apoptozis mekanizmasında olabilecek genetik değişimler de tümörigenezis sürecinde etkili olmaktadır. 1970'lerin başında Kerr ve arkadaşları apoptozis ile hiperplazi ve tümör gelişiminde potansiyel malignat hücrelerin eliminasyonu arasında bağlantı kurmuştur (53). Bununla birlikte apoptozis mekanizmasında inhibisyon veya direnç karsinogenez sürecinde önemli rol oynamaktadır. Malign bir hücrede apoptozisin düşmesinde veya direnç oluşmasında etkili pek çok yol vardır. Genel olarak:

- 1) Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengenin bozulması
- 2) Kaspaz aktivitesinin düşmesi
- 3) Bozulan ölüm reseptör sinyal yolağı
- 4) Apoptoz inhibitor proteinlerin ekspresyonunun artması etken faktörlerdir (48). Şekil 2.8'de apoptozisten kaçma ve karsinogenez sürecine katkılar özetlenmiştir.



**Şekil 2.8. Karsinogenez ve apoptozisten kaçma sürecine katkıda bulunan mekanizmalar (Wong RS 2011’den değiştirilerek alınmıştır.)**

Bu mekanizmalar çerçevesinde kanser ilişkili genlerin apoptozis üzerinde negatif etkisi olduğu aşikardır. Örneğin; p53 apoptozis ile ilişkisi kurulan ilk tümör baskılayıcı genidir. P53’ün apoptozis ile ilişkisi tamir edilemeyen DNA hasarları olduğu gibi hipoksi ve mutajenik onkogenlerde apoptozisi yönlendirmesi için p53’ü uyarmaktadır. Bu noktada pek çok insan kanser tipinde p53 mutasyonu gözlenmiştir ve bu mutasyon sıklıkla ilerlemiş tümör evresi ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Bir başka örnek vermek gerekirse Fas/CD95 reseptörü immun sistemde apoptozis ile hücre sayısını kontrol etmekte olup bu yolağın bozulması lenfoproliferatif hastalıkların ve kanserlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (54). Şimdilerde anti-kanser ilaçlarının çoğu tümör hücrelerini öldürme yönünde seçilmekte olup pek çok ajanın apoptozisi indüklediği belirlenmiştir. Bu noktada pek çok yeni ve önemli çalışma bu kapsamda anti-kanser ilaç adayı olma yönünde kapıları aralamıştır (48).

“Kanser, hücrenin proliferasyonu ve hücre döngüsünü kontrol eden genler ile hücrenin hayat süresini belirleyen genlerdeki mutasyon ve anormal aktivasyon gibi genetik değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır ki bu ortaya çıkış pek çok basamaktan geçerek ve bir çok faktörün etken olarak kendini göstermesi ile gerçekleşmektedir” ifadelerinden yola çıkarak kanserin moleküler biyolojisinin önemli parçalarını oluşturan hücre döngüsü,



apoptozis ve onkogen-tümör baskılayıcı genler başlıkları altında bu karmaşık mekanizmanın önemli basamakları değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bahsi geçen tüm bu olaylar ve etkenler çerçevesinde hastalık, heterojen bir görünüme sahip olmaktadır. Tümör oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynayan genlerin belirlenmesi; aday gen yaklaşımları, moleküler ve fonksiyonel analizler ile zaman alıcı ve uzun uğraşlar sonucunda gerçekleşmekteydi. Ancak teknolojiye son gelişmeler sonucunda yüksek çözünürlüklü sekanslama mutasyon belirleme teknikleri ile birlikte insan genomunun sekanslanması hatırı sayılır derecede çok sayıda genin hızlı bir şekilde analizine imkan tanımıştır (3). İnsan genom projesiyle başlayan süreçte bugün devam eden kanser genom projesi ile açığa çıkan bilgilerden de faydalanılarak hangi genlerin ve genetik yolların kanseri tetiklediğine ilişkin bir harita tasarlanmakta ve yeni ilaçların ve tedavilerin gelişimi için fırsat yaratılmaktadır. **İşte bu noktada ilgili haritanın çıkarılmasında sorulacak ve cevapları aranacak en önemli sorulardan birisi de tümör hücrelerindeki bozulmuş gen ekspresyon paterninin belirlenmesi ve tümörigenezis boyunca oluşan spesifik genomik değişikliklerin bu patern ile ilişkisinin belirlenmesidir (67).** Özellikle kanser hastalarında sık görülen bu geri dönüşümsüz yapısal genetik defektlerin karakterizasyonu bozuk olan resmin önemli parçalarının tanımlanması için gerekli bilgiyi sunacaktır.

### **2.3.3.Genom ebadında yüksek çözünürlüklü teknolojilerle kansere global bakış:Genomik ve transkriptomik değişiklikler ve kanser**

Tümör hücreleri; DNA kopya sayısı değişiklikleri, mutasyon, gen ifade değişiklikleri ve metilasyon gibi pek çok genetik defekt barındırmaktadırlar ve mikrodizin teknolojisinin ortaya çıkışı bu moleküler değişikliklerin DNA ve RNA seviyesinde genom ebadında görüntülenmesine imkan tanımıştır. Bu noktada yüksek işlem hacimli teknolojilerle gerçekleştirilen global analizlerde erken tanı ve etkili tedavi için biyobelirteç geliştirme, anahtar sinyal yollarının karakterizasyonu ve ilaç hedefi olabilecek genlerin tespiti gibi ana hedefler ön plana çıkmaktadır. Ortaya çıkan kapsamlı bilgilerin işlenmesinde biyoinformatik devreye girmekte ve analizlerden çıkacak bilgiyi daha iyi değerlendirmemize fırsat yaratmaktadır. Bu noktada gen ifade çalışmaları kanserin biyolojik ve klinik olarak farklı kategorilere sınıflandırılmasını hızlandırmışken yüksek çözünürlüklü array bazlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (arrayCGH=aCGH) ile tümörde yinelenen kopya sayısı değişikliklerinin kapsamlı resmi çizilebilmektedir. Gen

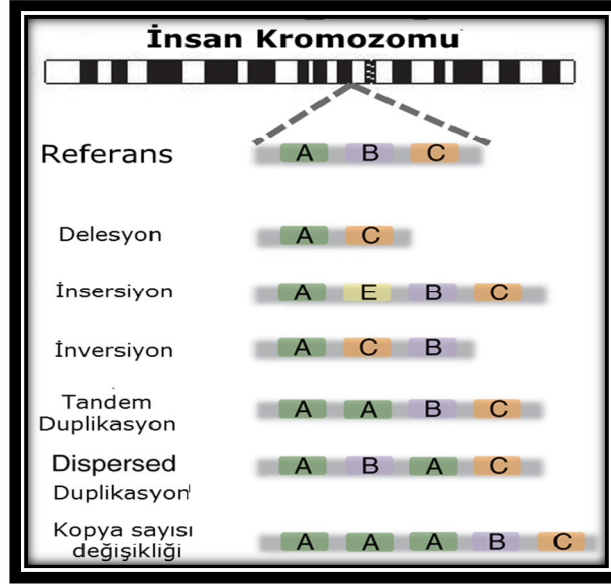
dozaj değişiklikleri tümör gelişiminde önemli bir rol oynarken; onkogen oluşumu DNA amplifikasyonu ile hızlanmış, tümör baskılayıcı genler ise fiziksel delesyonlarla inhibe edilmişlerdir. Böylece kopya sayısı değişikliklerinin ve gen ifade değişikliklerinin global verilerinin entegrasyonu kanser gelişiminin karmaşık hikayesinde önemli sorulara cevap olabilecek bilgiler açığa çıkaracaktır (24, 68). Bu çerçevede ve yukarıda altı çizilen soru eşliğinde kanserin moleküler biyolojisini anlamada; kopya sayısı değişiklikleri baz alınarak genomdaki yapısal değişiklikler ve gen ifade profil değişikliklerinden bahsetmek tez çalışmasının kapsamı açısından önemli olacaktır.

### **2.3.3.1.İnsan genomundaki yapısal değişiklikler**

İnsan genom projesinden çıkan dikkat çeken bir sonuç dünyada bireyler arasında DNA dizi benzerliğinin büyüklüğüdür ki iki insan birbirine yaklaşık %99.9 benzerdir (4,5,69). Yaklaşık 10 yıl önce insan genom projesiyle çıkılan yolda bireyler arasındaki ayırımında ve belirli özelliklerden (Trait) sorumlu genetik farklılığı anlamada önemli bir yol katedilmiştir. İnsanda genom boyu assosiyasyon çalışmaları (GWAS) ile genel DNA varyasyonları; diyabet, kalp hastalıkları gibi pek çok kompleks hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda kanser genom dizileme çalışmaları ile kanser progresyonunda önemli rol alan somatik mutasyonlarının katalogu çıkarılmıştır. Birkaç mutasyon bazı kanser tiplerinde çok sayıda kanser hastasında ortak görülmekle birlikte kanser genomundaki somatik mutasyonlar heterojendir (70).

Hastalıkların genetik temelini araştıran kapsamlı çalışmalar genomların farklılığına katkıda bulunan bütün varyasyonların ölçümüne ihtiyaç duymaktadır. Şimdiye kadar GWAS çalışmaları TNP'lere odaklanmıştır. Geçtiğimiz 5-6 yılda germline varyasyonların tekli nükleotit polimorfizminden geniş yapısal varyasyonlara (duplikasyon, delesyon, inversiyon ve translokasyon >100 nt) kadar geniş bir skalada oluştuğu tespit edilmiştir (70). Yapısal varyasyonlar genomik varyasyona önemli katkıda bulunan değişkenler olmakla birlikte genomdaki yapısal dengesizlikler kanser oluşumunda da önemli birer etkidir. Kanser araştırmalarında genomik profile ilginin yoğunlaşmasında; bu genomik dengesizliğin kanserin başlangıcına, ilerlemesine ve kemoterapötik ajanlara cevabında önemli roller üstlenmesi ilkin sebepler arasında gösterilmektedir (71). Yapısal varyasyonlar kromozomal yapıyı değiştiren delesyon, amplifikasyon, insersiyon,

translokasyon, kopya sayısı değişiklikleri gibi genetik varyantları içeren kapsamlı bir terimdir ( Şekil 2.9.) (73). Genom, tek baz değişikliğinden tüm kromozom anöploidilerine kadar boyutsal açıdan bir süreklilik arz eden genomik değişiklikleri barındırmakla birlikte yapısal varyasyon terimi daha çok 1000 baz ve daha büyük değişiklikleri kapsamaktadır (74).



**Şekil 2.9.Yapısal genomik varyasyonlar (Baker 2012'den değiştirilerek alınmıştır.)**

Yapısal varyasyonların fenotipik etkisi yaklaşık 70 yıl önce ilk kez sirke sineği'nde (*Drosophila melanogaster*) gözlenmiştir. Bu canlıda tandem kromozomal duplikasyon gözün küçük kalmasına neden olan bar hali şeklinde ifade edilen bir değişiklikle sonuçlanmaktadır (75). Daha sonrasında insanlardaki yapısal varyasyonlara ait bilgiler pek çok gelişimsel hastalıkta geniş kromozomal yeniden düzenlenmelerin rollerinin etkileri çerçevesinde sitogenetik çalışmalarla ortaya çıkmıştır (74).

Zaman içinde birer genetik belirteç olarak kullanılan bu değişiklikleri; mikrosatellitler, restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), değişken sayıda ardarda tekrarlayan DNA dizileri (Variable Number of Tandem Repeat, VNTR), kısa tekrarlayan DNA dizileri (short tandem repeat, STR), tek nükleotid polimorfizmleri (Single-Nucleotide Polymorphism, SNP) ve kopya sayısı değişiklikleri (copy number variation, CNV) şeklinde betimleyebiliriz. Bu varyasyon ve polimorfizmler insan genomunun yapısal resminin bir parçası olup bireyler arasındaki farklılığın,

hastalıklara yatkınlıkların ve ilaç cevabı gibi pek çok hikayenin altında yatan etkenlerin DNA seviyesindeki karşılığıdır (77).

Geçtiğimiz 25 yılda genetik belirteçlerin varlığı ile ilgili olarak; mendelyan hastalıkların ve özelliklerin moleküler genetik temellerinin de değerlendirilmesini içeren; çok hızlı ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu süreç kendi içinde pek çok dönüm noktası barındırmaktadır. Bunlardan bazıları; 1960 yılında protein dizilerinin analizinde oldukça büyükve beklenmeyen seviyede varyasyon tespit edilmiştir (76). 1978 yılında ilk defa Kan ve Dozy  $\beta$ -globin geninin HpaI restriksiyon bölgesinde tek nükleotit varyantlarının varlığını göstermişlerdir (78). 1980 yılında ise Wyman ve White yüksek derecede polimorfik RFLP'leri tanımlamış (79); 1985'de ise Jeffrey ve arkadaşları minisatellitleri rapor etmişler (80) arkasından VNTR'lerin tanımlanması bu gelişmeleri takip etmiştir (81). 1990 yılında bazı belirteçler kullanılarak kromozomların bağlantı haritaları çıkarılmıştır (76). Bu multialelik belirteçler kullanılarak dünyaçapında 2000'den fazla gendeki hastalık sebebi mutasyonlar haritlanmıştır. HapMAP projesi eşliğinde yaklaşık 12 milyon TNP'in bilgisi veritabanlarına girilmiştir. Günümüzde TNP'ler asosisyasyon çalışmalarında kompleks hastalıkların yatkınlık etkenlerinin çalışılmasında en çok tercih edilen belirteçlerdir. Bu konvansiyonel genetik belirteçlerin yanında 1 kb ve daha büyük boyutlarda insersiyon, delesyon, inversiyon gibi genomun daha kompleks yeniden düzenlenmeleri de dikkat çekmektedir. Örneğin Rhesus kan grubu geni RHD büyük bir delesyon polimorfizmi içermektedir (82).

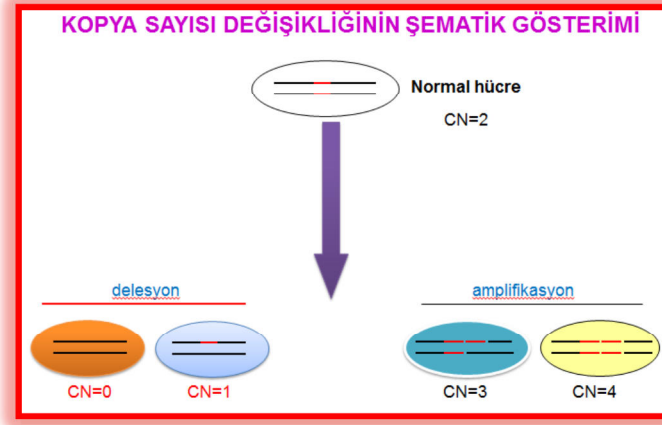
Mikroskobik varyantlar, 5 Mb ve daha büyük boyuttaki değişimler 1959'dan bu yana klasik sitogenetik ile tanımlanmaktadır. Ancak bu seviyedeki bir analizle 10-20 Mb ve altındaki dengesizlikler ise tespit edilememektedir. Zaman içinde floresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi moleküler sitogenetikteki ilerlemelerle birlikte submikroskobik genomik değişkenler de tespit edilir hale gelmiştir. Diğer taraftan genotiplendirme teknolojilerinin spektrumunun artması ile TNP gibi daha küçük ve bol bulunan genomik değişikliklerinde tespiti mümkün hale gelmiştir. Genom projeleri ışığında tüm-genom tarama tekniklerinin de gelişimi ile birlikte yeni submikroskobik genomik dengesizlikler tanımlanmıştır. 2004 yılında aCGH tekniği ile genomik değişikliklerin sorgulandığı birbirinden bağımsız iki çalışmada yeni bir varyasyonun kopya sayısı değişikliklerinin (KSD, copy number variation, CNV) varlığı açıkça gösterilmiştir (83,84).Tez kapsamı

içerisinde çalışılan 1 kb'dan daha uzun DNA segmentlerini içeren genomik değişiklikler olarak tarif edilen kopya sayısı değişikliklerine daha yakından bakalım.

### **2.3.3.1.1.Yeni bir bakış: Kopya sayısı değişiklikleri**

Genom projesinin tamamlanmasıyla ve yeni teknolojilerin gelişmesiyle birlikte genomik değişikliklerin boyutunun ve pozisyonlarının belirlenmesi tekli nükleotid polimorfizmlerine ilaveten genomik segmentlerdeki kopya sayısı değişikliklerinin de insanlardaki genomik çeşitliliğe önemli derece de katkı sağladığı ortaya çıkmıştır.

Yeni araştırmalar bir insan genomunun diğerine ne kadar benzediği konusunda TNP'lerin bu alanda tek başına etkin olmadığını işaret etmektedir. Şu ana kadar ki yaygın görüş benzerliğin %99,9 olduğu yönündeydi. Ancak Redon ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma, insan genomunda kişiden kişiye değişebilen, şaşırtıcı derecede büyük parçaların varlığını göstermiştir (85). Kopya sayısı değişiklikleri adı verilen bu farklılıklar 1 kb dan daha uzun DNA segmentlerini içeren genomik değişiklikler olarak tarif edilmiştir (Şekil 2.10.). Bir başka deyişle kopya sayısı değişikliği, genlerin kopya sayılarındaki farklılıklardan ileri gelen genetik profil özelliklerini ifade etmektedir. İnsanlarda geniş çaplı kopya sayısı değişikliklerinin tekli nükleotid polimorfizmleri kadar DNA'yı kapsadığını ve benzer şekilde fenotipik çeşitlilikten, pek çok hastalık ve hastalık duyarlılığından sorumlu olabileceği belirtilmiştir. Redon ve arkadaşlarının çalışmalarında, tüm genomdaki kopya sayısı değişikliklerini gösteren ilk genomik varyasyon haritası oluşturulmuştur. Bu harita ile geniş duplikasyon ve delesyon kaynaklı büyük yapısal varyasyonlar tespit edilmiş olup 1447 KSD bölgesini tanımlanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda daha önce %99,9 olarak belirlenmiş olan benzerlik oranı kaba bir hesapla % 99,5'e çekilmiştir (83, 84, 85).



**Şekil 2.10. Kopya sayısı değişikliği şematik gösterimi**

Mikrodizin teknolojisindeki gelişmeler ve tüm insan genom dizisi bilgisi ile kopya sayısı değişikliklerinin genom ebadında lokasyonlarının ve sıklıklarının haritalanması mümkün hale gelmiştir. Kopya sayısı değişikliklerinin ortaya çıkışı ilgili olarak 3 çalışma; Sebat ve ark., 2004, Iafrate ve ark., 2004 ve yukarıda ifade edilen Redon ve ark., 2006 temel taşları niteliğindedir.

Sebat ve arkadaşlarının çalışmasında 20 birey ROMA (representational oligonucleotide microarray analysis) tekniği ile çalışılmış olup 221 kopya sayı değişikliği tespit edilmiştir. Her bireyde 11 kopya sayısı değişikliği ve ortalama 465 kb'lik bölgeleri kapsadığı belirtilmekte olup 70 genin bu değişiklikten etkilendiği ifade edilmektedir. İlgili genlerin çoğu nörolojik fonksiyonlar ve metabolizma ile ilişkilidir (83). Iafrate ve arkadaşlarının çalışmasında ise birbiriyle akraba olmayan bireylerde insan genomunda genomik dengesizlik (kayıp ve kazanç) içeren 255 lokus tanımlanmıştır. 24 varyant bireylerin %10'undan fazlasında tespit edilmiştir. Bu bölgelerin yarısı genleri overlap atmekte ve çoğu segmental duplikasyonla çakışır veya insan genomundaki boşluklardır. Daha önceden hesaba katılmayan bu heterojenite belirli insan fenotipik varyasyonunun ve hastalıklara yatkınlık ayrıca daha dinamik insan genom yapısının temelini oluşturabileceği öne sürülmektedir. İnsan genomundaki varyasyonlar daha önce de ifade edildiği üzere; tekli nükleotid polimorfizmleri (TNP), küçük insersiyon delesyon polimorfizmleri, tekrarlayıcı dizilerin değişken sayıları ve genomik yapısal değişkenlikler gibi pek çok farklı formda bulunmaktadır. İnsan genomundaki pek çok varyasyon moleküler ve sitogenetik analizlerle kataloglanmıştır; fakat fenotipik olarak normal bireyler arasında birkaç kilobazdan

yüzlerce kilobaz büyüklükteki kayıp ve kazançları içeren geniş skaldaki kopya sayısı değişikliklerinin çok az bir kısmı bilinmektedir. Bu çalışmada 255 lokusun %56'sı yani 142 polimorfik klonun kodlayıcı bölgeyi kapladığı ve 67 klonun ise bir veya daha fazla genin tamamını kapsadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç bu geniş ölçekli bu kopya sayısı değişikliklerinin intergenik veya intronik bölgelerle sınırlı olmadığını önermektedir. Çalışmada ayrıca 14 geniş ölçekli kopya sayısı değişikliğinin insan genetik sendromları ve kanserle ilişkili lokusların yakınında lokalize olduğu belirtilmektedir. Fenotipik olarak normal bireylerde de var olan bu varyantlar genetik hastalığa direkt sebep olmamakla birlikte; kromozomal yeniden düzenlenmeye yol açarak veya spesifik bir genin ifadesini etkileyerek hastalıklara yakalanma riskini artırmaktadır (84).

Bu üç çalışmayı karşılaştırsak: Sebat ve arkadaşları 35 kb aralıklı oligonükleotid içeren mikrodizin platformu kullandı ve 20 birey arasında 76 CNV belirlemiştir (83). Iafrate ve arkadaşları ise yaklaşık 1Mb aralıkla klon içeren bakteri yapay kromozom bazlı array (BAC- array) kullanarak 39 sağlıklı bireyde 200'den fazla farklı lokus tanımlanmıştır (84). Bununla birlikte her iki çalışma çok az farklı yaklaşım kullanmışlar ve benzer sonuçlara ulaşmışlardır. Fenotipik olarak normal bireylerin beklenmeyen bir şekilde genomlarında yüksek sayıda genomik dengesizlik tespit edilmiştir. Bununla birlikte çalışılan birey sayısının küçüklüğü ve her iki çalışmada da kullanılan platformların çözünürlüğünün getirdiği sınırlamalar insan genomundaki kopya sayısı değişikliklerinin kapsamlı bir şekilde çalışılabilmesine imkan vermemiştir. İki çalışmada da tanımlanan kopya sayısı değişikliği insandaki kopya sayısı değişikliklerinin gerçek sayısına göre beklentilerin altında gibi olduğu düşünülmektedir (86). Birkaç yıl sonra Redon ve arkadaşları insan genomuna ait daha kapsamlı bir kopya sayısı değişiklik haritası yayınlamıştır. Bu çalışmada farklı atalardan gelen dört popülasyondan (Hap Map koleksiyonu) 270 sağlıklı bireyin DNA'sı 2 farklı array platformu ile (Affymetrix 500K EA SNP array ve Whole genom etile path (WGPT BAC array) ile KSD'lerin genom boyu özellikleri analiz edilmiş olup KSD'ler kompleksliklerine ve kayıp ya da kazanç durumlarına göre farklı tiplere sınıflandırılmışlardır. İki metod da bu değişiklikleri belirleyebilmiş ve bir çok yönden birbirini tamamlamıştır. SNP arrayler ilgili bölgelerdeki daha küçük kopya sayısı değişikliklerini belirlemeye daha eğilimli iken WGTP platformu daha geniş ve daha kompleks kopya sayısı değişikliklerini belirlemede daha kullanışlıdır. İki platform ile toplam 1447 farklı KSD bölgesi (KSDB) tanımlanmıştır. Bu çalışmada tanımlanan KSD

bölgeleri insan genomunun %12'sini (360 Mb) kapsamaktadır. KSDB'lerin dağılımın tüm genom görüntüsüne bakıldığında genom boyunca her yerde olabildikleri ve genom boyunca heterojen dağıldığı gözlenmiştir. Bazı KSD bölgeleri yan yana sıralanmış iki veya daha fazla KSD içermektedir. Örneğin bir bireyde küçük bir delesyon başka bir bireyde geniş bir duplikasyonla içiçe olabilir bunlar iki farklı olay olmakla birlikte bunlar tek bir KSD bölgesinde birleşmiştir. Tanımlanan bu KSD'lerin yaklaşık %24'ü önceden tanımlı segmental duplikasyonların yakınında lokalize olduğu görülmüştür. Bu segmental duplikasyon bölgelerinin yakınındaki KSD'lerin non-alelik homolog rekombinasyon ile mekanizması ile oluşabileceği düşünülmektedir. Redon ve ark. **KSD**'leri beş sınıfta sınıflandırmışlardır.

- 1) Delesyonlar
- 2) Duplikasyonlar
- 3) Aynı lokustaki delesyon ve duplikasyonlar
- 4) Multialelik lokus
- 5) Doğası net belli olmayan ayırması güç kompleks lokuslar

KSD'ler genellikle genin dışında bulunmayı tercih etselerde KSD'lerin yaklaşık %40' ı genlerdedir. Bu 1447 CNV bölgesinin GO analizleri sonucunda kapsadığı genler en çok (most enriched) hücre adezyonu ile ilgilidir. Nörofizyolojik proses de yüksek derecede zenginleşmiş GO kategorisinde yer almaktadır. Redon ve arkadaşları 2908 refseq (NCBI) gen ve 285 OMIM geni insan hastalıkları ile ilişkisini tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçların insan genomunda KSD'lerin ilk kapsamlı haritasını oluşturduğunu ileri sürmüşler ve genom yapısı ve hastalıkları çalışmalarında önemli bir kaynak olacağını düşünmektedirler (85).

#### **2.3.3.1.1.1.Kopya sayısı değişikliklerinin potansiyel oluşum mekanizmaları**

Kopya sayısı değişikliklerinin oluşumu ile ilgili birkaç mekanizma önerilmekle birlikte açık olmayan pek çok nokta barındırmaktadır ve hala yeni bilgilere ihtiyaç duymaktadır. KSD'lerin segmental duplikasyon bölgelerinin yakınında veya içinde oluşmayı tercih ettikleri gösterilmiştir (87). Segmental duplikasyon DNA dizilerinin ardışık tekrarları



aracılığı ile ortaya çıkmaktadır ve sonraki yeniden düzenlenmelerle farklı kromozomal pozisyonlarda duplike diziler oluşmaktadır (88). Hücresel mitozun metafaz safhası boyunca anne ve babadan gelen kromozomlar dizi homolojisi ile eşleşir ve kromozom çiftleri arasında homolog rekombinasyon gerçekleşmekle birlikte segmental duplikasyon varsa orda normalde olmayacak “crossover” başlatır bu da non alelik homolog rekombinasyon olarak ifade edilmektedir. Sonuç olarak bu bölgede delesyonlar veya daha ileri duplikasyonlar meydana gelir. Böylece normal DNA kopya sayısı değişmekte ve ilgili lokustaki değişiklik ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte KSD oluşumunda NHAR (Nonhomolog Allelic Recombination) ve NHEJ (Nonhomolog End Joining Mechanism) mekanizmalarında etkili olduğu belirtilmektedir. KSD’lerin oluşumu kalıtsal olabildiği gibi de novo mutasyonlar ile de gerçekleşebilmektedir (88).

#### **2.3.3.1.1.2.Kopya sayısı değişimlerinin gen ifadesi üzerindeki etkileri**

İnsan popülasyonunda fenotipik varyasyonun genetik temelini anlamak insan genetiğinin en önemli hedeflerinden bir tanesidir ve bu noktada gen regülasyonundaki varyasyonun temelini anlaşılmasında gen ifadesi sorgulanmıştır (86). Sabit bir durumda aynı türün bireyleri arasındaki mRNA seviyelerinin doğrudan analiz bireyler arasında mRNA miktarının farklı olduğunu göstermiştir ki bu da genetik varyasyonun bir hücrede mRNA miktarı üzerinde etkisi olduğunu düşündürmüştür (89). Gen ifade seviyelerindeki değişiklikte düzenleyici ağın etkili olduğu düşünülmeyle beraber genetik varyantların doğasının anlaşılmasıyla birlikte gen ifade seviyelerini de etkiledikleri öne sürülmektedir. Kopya sayısı değişikliklerinin keşfi ve zaman içinde artan bilgiler genomda yaygın olduklarını göstermiş olmakla birlikte kodlayıcı bölgenin dizisini değiştirerek ve regülasyonunu bozarak gen dozajını değiştirmektedirler (86). Bir başka ifadeyle KSD’ler iki şekilde gen ekspresyonunu etkilemektedir:

- 1) Belirli bir genin kopya sayısını değiştirerek gen ifade seviyesini doğrudan etkileyebilir.
- 2) KSD ‘ler transkripsiyonel elementleri indirekt olarak etkileyerek pozisyonel etki ile gen ekspresyon miktarının değişmesine neden olabilirler. Örneğin repressör elementteki bir delesyon, ilgili gendeki ekspresyon seviyesini artırabilir (90).

Stranger ve arkadaşları 210 bireyin lenfoblastoid hücre hatlarında RNA bazında çalışmışlar ve KSD etkisine dayandırılan yaklaşık 15000 genin %18'inde gen ekspresyonu farklılığı gözlemişlerdir. Bu çalışma TNP ve KSD'lerin gen ifadesine etkisini gösteren ilk çalışmadır(86). 2013 yılında Yang ve arkadaşlarının çalışmasında WWOX genindeki kopya sayısı değişiminin (CNV-67048) gen ifadesindeki değişiklikte etkili olduğu belirtilmektedir (91). Yine Li ve arkadaşlarının çalışmalarında sporadik Alzheimer hastalığında CREB1 geninin ifadesinin kopya sayısı değişikliğinden etkilendiği tespit edilmiştir (92).

### **2.3.3.1.1.3.Kopya sayısı değişikliklerinin hastalıklarla ilişkisi, kanser için anlamı**

Son zamanlarda kopya sayısı değişiklikleri tanımlanmış olup bunların bir kısmı polimorfizm olarak kendini gösterirken yapılan pek çok çalışmada da kanser ilişkisi saptanmış bir çok gen, hastalık bağlantılı ve hastalık yatkınlık genlerinde de KSD sergileyen bölgeler bulunmuştur (Şekil 2.11.). Örneğin kopya sayısı değişikliklerinin nörolojik hastalıklar ve lösemi (83,84), otizm, romatoid artrit, şizofreni (93,94) gibi pek çok kompleks hastalıkla ilişkisi rapor edilmiştir. Bununla birlikte EGFR kopya sayısının küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde normalden fazla olabildiği ve bunun gefitinib duyarlılığı ile anlamlı ilişkisinin olduğu ortaya konmuş olup EGFR kopya sayısının hastalardaki gefitinib duyarlılığında etkili bir moleküler belirteç olabileceği vurgulanmıştır; ayrıca HIV enfeksiyonuna yakalanmada CCL3L1 geninin yüksek kopya sayısının bu hastalık için insanları daha duyarlı kıldığı gösterilmiştir (95,96).

Hastalık	İlişkili Gen(ler)	Lokalizasyon	Kopya Sayısı Değişikliği	Referanslar
<b>Nörolojik Hastalıklar</b>				
Parkinson	<i>SNCA</i>	4q21	Duplikasyon/Triplikasyon	Singleton ve ark., 2003
Alzheimer	<i>APP</i>	21q21	Kopya sayısı kazancı	Rovet ve ark., 2006 Cabejo ve ark., 2006
Mental retardasyon	Multiple genes	15q13.3, 17q21.31, Xp11.22	Delesyon ve Duplikasyon	Froyen ve ark., Basten ve ark., 2008, VanEsch ve ark., 2005
Otizm	Multiple genes	3q24, 15q11- 13, 16p11.2	Delesyon/Duplikasyon	Sebat ve ark., 2007, Wass ve ark., 2008
Şizofreni	<i>MYT1L, CTNND2, ASTN2</i>	1q21.1, 15q11.2, 15q13.3, 22q11.2	Delesyon	Vrijenhoek ve ark., Stefansson ve ark., 2008
Bipolar disorder	<i>GSK3β</i>	3q13.3	Duplikasyon	Lachman ve ark., 2007
<b>Çeşitli Hastalıklara yatkınlık</b>				
HIV/AIDS	<i>CCL3L1</i>	17q21.1		Gonzalez ve ark., 2005
Crohn's Hastalığı	<i>HBD-2, LCE3B, LCE3C, DEFB4, IRGM</i>	Çoklu	Delesyon ve Duplikasyon	McCarroll ve ark., 2008, Hollox ve ark., de Cid ve ark., 2009
Pankreatit	<i>PRSS1</i>	7q35	Triplikasyon	LeMarchal ve ark., 2006
SLE	<i>FCGR3B</i>	1q23	Kopya sayısı kaybı veya kazancı	Aitman ve ark., 2006
Astım	<i>GSTM1 ve GSTT1</i>	1p13.3 ve 22q11.23	Delesyon	Ivashchenko ve ark., 2002
<b>Kardiyovasküler hastalıklar</b>				
Ateroskleroz	<i>LPA</i>	6q26	Kopya sayısı kazancı	Pollak ve ark., 2007
Ailesel hiperkolesterolemi	<i>LDLR</i>	19p13.3	Delesyon/Duplikasyon	Lanktree ve ark., 2005
<b>Metabolik hastalıklar</b>				
Tip 2 Diyabet	<i>LEPR</i>	1p31	Kopya sayısı kazancı	Jeon ve ark., 2005
Obezite	<i>SH2B1, PPYR1</i>	16p11.2, 10q11.2-q21.2	Delesyon ve Duplikasyon	Ogden ve ark., 2006
Bağırsak hastalığı	<i>AMY1</i>	1p21	Kopya sayısı kazancı	Perry ve ark., 2007
<b>İlaç Metabolizması</b>				
Nikotin metabolizması ve sigara ilişkili hastalıklara	<i>CYP2A6</i>	19q13.2	Delesyon/Duplikasyon	Fukami ve ark., 2006
Sülfat konjügasyonu	<i>SULT1A1</i>	16p12.1	Delesyon ve Duplikasyon	Hebbink ve ark., 2007
Karsinogen metabolizması	<i>GSTM1, GSTP1 ve GSTT1</i>	1p13.3, 11q13 ve 22q11.23	Delesyon	Huang ve ark., 2009, Spudis ve ark., 2001
<b>Kanser</b>				
Ailesel meme kanseri	<i>MTUS1</i>	8p22	Exon-specific Delesyon	Jakobsson ve ark., 2005

Şekil 2.11. Kopya sayısı değişikliği ve hastalıklarla ilişkisine örnek çalışmalar (Almal, 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

Kopya sayısı değişikliklerinin hastalıklar üzerindeki etkileri birkaç yolla olmaktadır:

1. Kopya sayısı değişiklikleri delesyon veya insersiyon yoluyla gen dozajını doğrudan etkileyebilirler ki gen ifadesindeki değişimle sonuçlanan bu durum genetik hastalıkların potansiyel bir sebebi olabilmektedir. Örneğin amplifikasyonlar yüzünden onkogenlerin kopya sayısında artış olabileceği gibi tümör baskılayıcı genlerde delesyonlar nedeniyle fonksiyon kaybı görülebilmektedir.
2. Değişiklikler regülatör elementleri etkileyerek gen ifadesini dolaylı yoldan etkileyerek hastalık oluşumunda katkı sahibi olabilirler.

3. Normalde tek başına bir etken olamayan değişiklik başka bir değişiklikle kombinasyon oluşturup bir kompleks hastalık etkeni olarak karşımıza çıkabilir.
4. Kopya sayısı değişiklikleri hastalıklar için yatkınlık parametresi olabilir ve diğer genetik ve çevresel faktörlerle birlikte hastalıkların görülmesinde etken olabilir.

Gen kopya sayı değişimleri kanser hücrelerinde de sıklıkla karşımıza çıkmakta olup. kromozomal anomaliler kanserin ilerlemesinde ve patogenezisinde önemli bir rol oynamaktadır. Amplifikasyonlar yüzünden onkogenlerin kopya sayısında artış olabileceği gibi tümör baskılayıcı genlerde delesyonlar nedeniyle fonksiyon kaybı görülebilmektedir. Bu durum KSD'lerin genom boyu düzenlenişinin kompleks olduğunu ve keşfedilecek pek çok işlevinin olabileceğine yönelik sorular ortaya koymaktadır ki bu noktada gerçekleştirilecek çalışmalar tanı ve tedaviye yansıyacak önemli bilgiler ortaya koyabilecektir (97).

Shlien ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 770 sağlıklı bireyin genomunda 49 kanser geninin bir KSD ile çakıştığı gösterilmiştir. Aynı zamanda genomik varyasyonlar veritabanına (Database of Genomic Variations, DGV) göre kanser ile ilişkili genlerin %40'ı KSD'ler tarafından kesintiye uğramaktadır. Bu veritabanında şubat 2008'de girilen son 10 çalışma değerlendirilmiş olup; apoptozis, hücre döngüsü kontrolü ve DNA onarımı işlevleri ve çok sayıda translokasyon ve füzyon geni ortaklarını içeren pek çok tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin bulunduğu gözlenmiştir. Bu noktada genlerin hangilerinin gen dozajına duyarlı oldukları ve bu kopya sayısı değişikliklerini içeren dokuların hangilerinin malign dönüşüme yatkın olacağını tanımlanması önem kazanmaktadır. MLLT4 geninde saptanan bir kanser KSD'si Li-Fraumeni (LFS) sendromu ile ilişkili bulunmuş olup bu KSD'nin sıklığı LFS olgularında sağlıklı populasyondan daha yüksek bulunması bu kapsama örnek teşkil etmektedir (98). Frank ve arkadaşlarının 593 meme kanseri olgularıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarında mitokondriyal tümör baskılayıcı (Mtus1) genindeki küçük bir delesyonun ailesel meme kanseri ile ilişkisi tespit edilmiştir (99). Cheng ve arkadaşlarının 25 çift mide kanserinde aCGH yöntemi ile gerçekleştirdikleri çalışmada kanserle ilişkili 11 kayda değer lokus olduğu belirtilmektedir (100). Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) amplifiye ve HER2 negatif meme kanserli olgularda yapılan bir çalışmada ise kopya sayısı kayıp ve kazancından etkilenmiş 36 bölge tanımlanmış olup tümör alttipleri ile ilişkilendirilmiştir (101). Yine

Park ve arkadaşlarının mide kanseri ile gerçekleştirdikleri çalışmada 8 tanesi yeni toplam 20 kopya sayısı değişikliği kanserle ilişkilendirilmiş olup bu yeni KSD'lerin karşılaştırmalı genomik analizlerde mide kanseri spesifik genlerin seçiminde kullanılabilecekleri ifade edilmiştir (102). Bir başka çalışmada ise meme kanserinde kopya sayısı değişikliklerin gen ifade profilini etkilediği ve bu durumun kanser gelişimi ve ilerlemesine katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (58). Weir ve arkadaşlarının akciğer adenokarsinom örneği ile gerçekleştirdikleri çalışmada kanserle ilişkili 7 delesyon, 24 amplifasyon bulunmakla birlikte en anlamlı amplifikasyonun NKX2-1 isimli yeni bir onkogenin bulunduğu 14q13.3 bölgesinde yer aldığı gösterilmiştir (103). Glioblastoma örneklerinde kopya sayısı değişikliği, metilasyon profili ve gen ekspresyon versinin entegre edildiği çalışmada retinoblastomada p53 sinyal yolağı ve reseptör tirozin kinaz yolağının değiştiği gözlenmiş olup bu değişikliklerin kanserle ilgili olduğu vurgulanmıştır (104).

Kopya sayısı değişimlerinin tespiti ve günümüze kadar yapılan çalışmalar bu değişimlerin hastalığa yatkınlık, hastalığa sebep, ilaçlara cevap gibi pek çok önemli başlık için etkili bir parametre olduğu ortaya konmuş olması bu değişikliklerin varyasyonların önemli bir parçası olduğunu göstermiştir (105). Bu değişikliklerin öneminin gösterildiği hastalıklardan bir tanesi de yukarıda ifade edildiği gibi kanserdir. Kanserin temelinin anlaşılmasında barındırdığı genetik defektlerin karakterizasyonunun bir ihtiyaç olduğu noktada bu değişikliklerin bu temelde ne anlam ifade ettiğinin çözümlemesi için :

1. Kansere yatkınlıkta kopya sayısı değişikliklerinin rolleri nelerdir? Risk oluşumunda bu varyasyon tipi nasıl kullanılabilir?
2. Hangi kanser ilişkili genler kopya sayısı değişikliklerinden etkilenmektedir?
3. Neoplastik gelişimde gen ifadesi ve diğer genetik mekanizmalarla beraber nasıl bir etkileşim içindedirler?
4. Henüz başlangıç aşamasındaki kanser hücreleri bu delesyon ve insersiyonları tümörigenezisin ve tümör çoğalmasının indüklenmesi veya hızlanmasında kullanmakta mıdır?

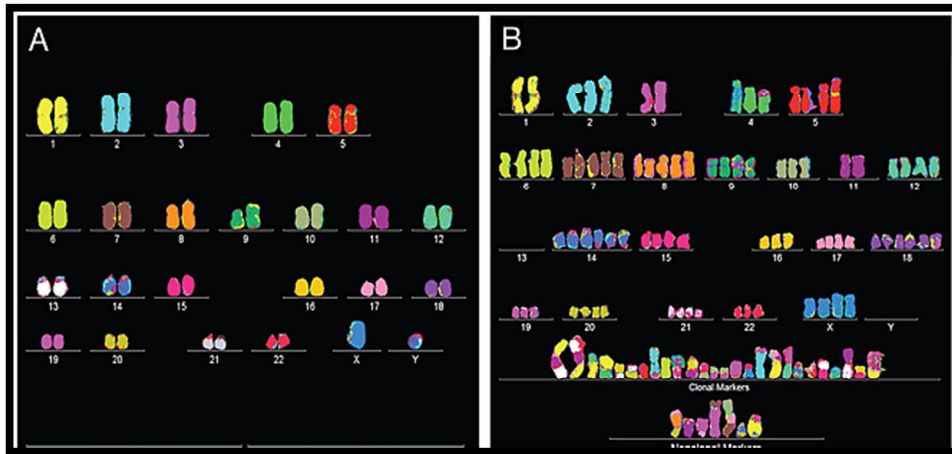
gibi soruların tam anlamıyla cevaplanması gerekmektedir. Bu noktada kopya sayı değişimleri kansere yatkınlıkta, başlangıcında ilerlemesi ve yayılmasında bir belirteç

olarak kullanım alanı yaratabildiği gibi kanser kopya sayısı değişikliklerinin içinde yer aldığı ya da etkilediği genler tedavi için yeni ilaç hedefleri olabilir (98). Bu soruların çözümlenmesi adına gerçekleştirilecek çalışmalar büyük önem arz etmektedir.

#### 2.3.3.1.1.4.Kanserde kopya sayısı değişikliklerin analizinde kullanılan yöntem ve stratejiler:CGH ve mikrodizin uygulamaları

Moleküler sitogenetik, klasik sitogenetik ile modern moleküler biyoloji arasındaki boşluğa köprü olmayı amaçlamaktadır. Genelde dengesiz kromozom materyalinin analizinde *FISH*, *BAC array*, array *CGH* (aCGH) gibi teknikler kullanılmaktadır (106).Bu bölümde analizlerde kullanılan bu tekniklerin gelişim hikayeleri ve kopya sayısı değişiklik tespitinde hangi yöntemin ve stratejinin ne derece etkin olduğu tartışılmıştır.

Genomdaki kopya sayısı değişiklikler gibi yapısal değişiklikler (kromozomal anomaliler, amplifikasyon ve delesyonlar...) solid tümörlerin karakteristik özelliklerindedir (Şekil 2.12). Bu genetik anomalilerin tanımlanması son yıllardakanserin oluşumundaki mekanizmaların daha iyi anlaşılmasında araştırmalardaki merkezi noktardan bir tanesini oluşturmaktadır (107).

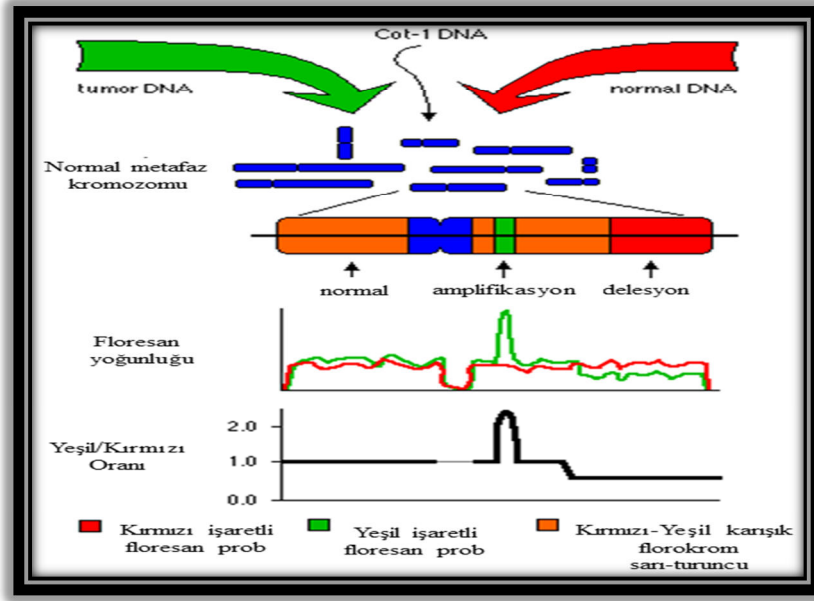


Şekil 2.12. Normal (A) ve kanserli hücrelerin (B) karyotip örneği (newscenter.berkeley.edu adresinden alıntıdır).

Bundan yaklaşık 50 yıl önce insan sitogenetiği ile birlikte kromozomal defektlerin tanımlanması mümkün hale gelmiştir. Bu amaç doğrultusunda geliştirilen en eski teknik

1950'lerin sonlarında tanıştığımız karyotiplendirme olup kanser ve konjenital hastalıklar gibi pek çok hastalıkta spesifik kromozomal anomaliler tespit edilmiştir. Ancak bu teknik çözünürlükle ilgili önemli sınırlamalar barındırmakta küçük anomaliler tespit edilememektedir (108,109). Süreç içinde bu durumun üstesinden gelmek için floresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi yeni sitogenetik teknikler geliştirilmiştir. Kromozom bölgesi spesifik floresan işaretli problemlerin kullanımına dayanan bu teknik beklenen anomalilere ait tip ve lokasyon için ön bilgi ihtiyacı duymakta olup tek seferde çalışılabilir kromozom lokus sayısı sınırlıdır (108). 1992 yılında kallioniemi ve arkadaşları karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (comperative genomic hybridization=CGH) verdikleri yeni bir kromozom analiz tekniği geliştirmişlerdir (110).

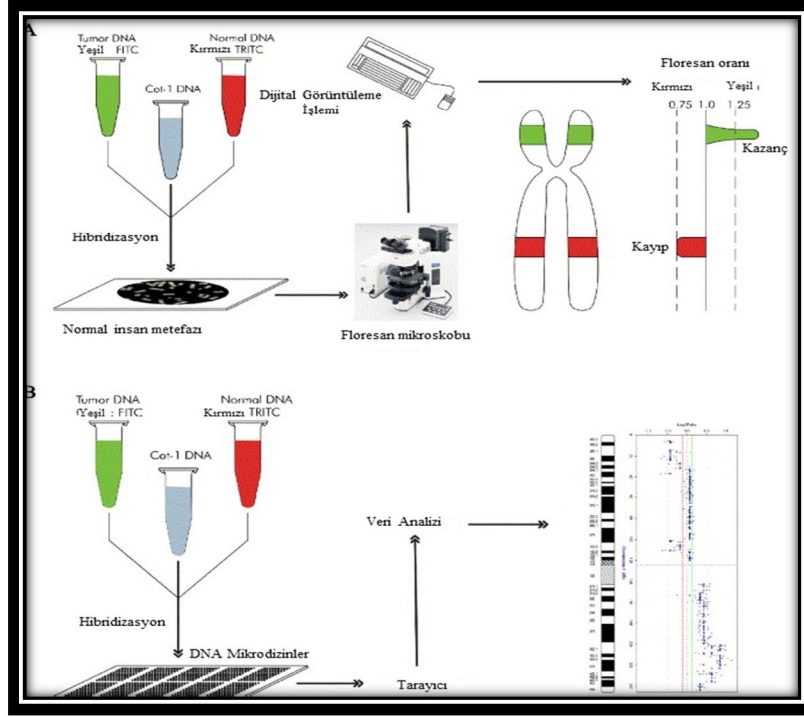
CGH, konvansiyonel sitogenetik ve floresans in situ hibridizasyonda (FISH) görülen zorlukları kompanse etmek için geliştirilmiş bir moleküler sitogenetik tekniktir. Konvansiyonel CGH DNA kopya sayısı değişikliklerini haritalayan ve tespit eden bir moleküler sitogenetik tekniktir. Bu yaklaşımda; sırasıyla yeşil ve kırmızı renk ile boyanan test örneği (tümörlü örnek) ve referansın (normal örnek) genomik DNA'larının metafaz kromozomlarına in situ hibridizasyonu sonucu hasta DNA' sında kromozomal kayıp (loss) veya belli bir bölgenin amplifikasyonunun (gain) gösterilmesi söz konusudur. Hibridizasyonun ardından her iki floresan sinyale ait görüntüler elde edilir (şekil 2.13.) ve her kromozom boyunca test /referans hibridizasyon sinyal oranı dijital olarak ölçülür. Her iki sinyalin eşit olduğu bölgeler sarı/turuncu renk ile algılanırken oran 1 dir. Delesyona uğramış bölgeler kırmızı renk olarak algılanır ve oran <1 iken amplifikasyon görülen bölgeler yeşil renk olarak algılanmakta ve oran >1 olarak değerlendirilmektedir. Böylece CGH ile tek adımda bütün genom taranabilmekte ve normal ile anormal genom arasındaki kopya sayısı farklılıkları hızlı bir şekilde belirlenip haritalandırılmaktadır. CGH, temel araştırmalardan klinik çalışmalara kadar geniş bir uygulama alanı potansiyeline sahiptir; özellikle tümör genetiğinde çok yoğun olarak kullanılmaktadır (108,109). Bununla birlikte klinik uygulamalarda CGH tekniğinin rezolüsyonu <5-10 Mb değişiklikliklerin tespitinde yetersiz kalmaktadır. Son zamanlarda konvansiyonel CGH ve FISH tekniğinin rezolüsyon kombinasyonu olarak görülen mikrodizin tabanlı CGH=array CGH (aCGH) bu alanda yerini almış olup klinik genetikte DNA kopya sayısı değişikliklerinin analizinde yüksek potansiyelle ön plana çıkmıştır (108).



**Şekil 2.13. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon tekniği şematik gösterimi (www.wikilectures.eu adresinden alınmıştır.)**

Solinas ve arkadaşları ile Pinkel ve arkadaşlarının bağımsız çalışmaları aCGH ile tanışmamızı sağlamıştır (111,112). Bu teknikte hibridizasyon, konvensiyonel CGH'in aksine metafaz kromozomları ile değil bir array üzerindeki haritalanmış DNA klonları ile gerçekleşmektedir ve kromozomlar artık mikroskopta görülecek boyutta değildir. Bu stratejide; Cy3 ile işaretli hasta genomik DNA'sı ile aynı miktardaki farklı bir floresan boya (Cy5) ile işaretli kontrol DNA'sı genomik fragmentlerin spotlandığı arraylere birlikte hibridize edilmektedirler. Spottardan gelen floresan yoğunluğu Cy3 için 532 nm dalga boyunda ölçülürken Cy5 için 635 nm'dir. Bu 2 boyanın bir spottan gelen floresan yoğunluğu eşit ise o bölge için hasta DNA'sında bir değişiklik olmadığı normal ile dengede olduğu bilgisi elde edilir. Bu floresan boyalardan alınan sinyalin oranı eşik değerinin üzerindeyse bir amplifikasyon durumuna; altında ise delesyon durumuna işaret etmektedir (109). Konvensiyonel CGH ve aCGH'in karşılaştırmalı şematik gösterimi şekil 2.14'de sunulmuştur.





**Şekil 2.14. Konvansiyonel CGH ve aCGH'in karşılaştırmalı şematik gösterimi (Reis-Filho, 2005 den değiştirilerek alınmıştır).**

aCGH tekniği; BAC array, cDNA array ve TNP mikrodizinlerini kapsamaktadır (108). İlk array bazlı platform binlerce baz uzunluğunda BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) ve YAC (Yeast Artificial Chromosomes) problemlerinin kullanımı ve ortalama birkaç mb'lık çözünürlükteki BAC arraylerdir. Bu uzun problemler daha kısa olanlarına göre yüksek spesifikliktedir ve daha kesin olmakla birlikte pek çok uygulama için çözünürlüğü yeterli değildir. Daha sonrasında daha kısa (130-600 bp) fosmid ve cosmid klonlar kullanılmıştır. Bazı laboratuvarlar ise ekspresyon profillemesi için dizayn edilmiş cDNA arrayleri kromozomal kopya sayısı değişikliklerinin ölçümünde kullanmışlardır. Geniş ulaşılabilir platformların açıklığını daha yüksek çözünürlükteki oligonükleotid temelli mikrodizinler kapatmıştır. Bu platformlar, array üzerindeki 25-85 mer'lik tek zincirli oligonükleotidlerle karakterizedir. Bu alanda Affymetrix (25 mer), Agilent (60 mer) ve NimbleGen (45-85 mer) markaları ön plandadır. Böylece aCGH teknolojilerindeki ilerleme konvansiyonelden sonra BAC arraylerden (~50-100 kb çözünürlük) oligonükleotid arraylere (~2-10 kb çözünürlük) doğru bir gelişim göstermiştir. Son dönemlerde TNP mikrodizinleri de kanserli ve pek çok hastalık çeşidi için dokulardaki hasar profilini belirlemek amacıyla kopya sayısı değişikliği analizlerinde kullanılabilir. TNP mikrodizinleri güçlü genomik analiz araçlarıdır (113).

#### **2.3.3.1.1.4.1.Kanser, kopya sayısı değişiklikleri ve TNP mikrodizinlerinin buluşması**

Tümörün gelişiminde; amplifikasyon, delesyon, nokta mutasyonları ve translokasyon gibi genomik değişikliklerin birikmesinin önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Bu moleküler genetik değişikliklerin aydınlatılması tarihte onkogen ve tümör baskılayıcı gen gibi kanser gelişiminde etkin genlerin tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır. Bunun en iyi örneklerinden bir tanesini meme kanserinde amplifiye bölgelerin karakterizasyonu sonucu Her-2/Neu ve c-Myc gibi önemli onkogenlerin tespit edilmesi vermektedir. Mikrodizin aCGH çok sayıda kanser çalışmasında verdiği tekrarlanabilir sonuçlarla uygulanabilirliğini göstermiştir. Kanser genetiğinde TNP aCGH uygulamaları:

- Dengesiz genomik yeniden düzenlemeler için sıklıkla hedef olan noktaları karakterize etmek,
- Kanser gelişimine etkili spesifik genleritespit etmek ve etkisini incelemek,
- Kanserın klonal gelişiminde, karsinogenezis ve tümör progresyonunda genetik değişiklikleri ayırmak ,
- Kantitatif genomik değişikliklere karışan yeni gen içeren kromozomal bölgeleri belirlemek,
- Subklasifikasyon ve kanserin prognostik değerlendirilmesini gerçekleştirmek gibi pek çok başlığı kapsamaktadır (114, 115).

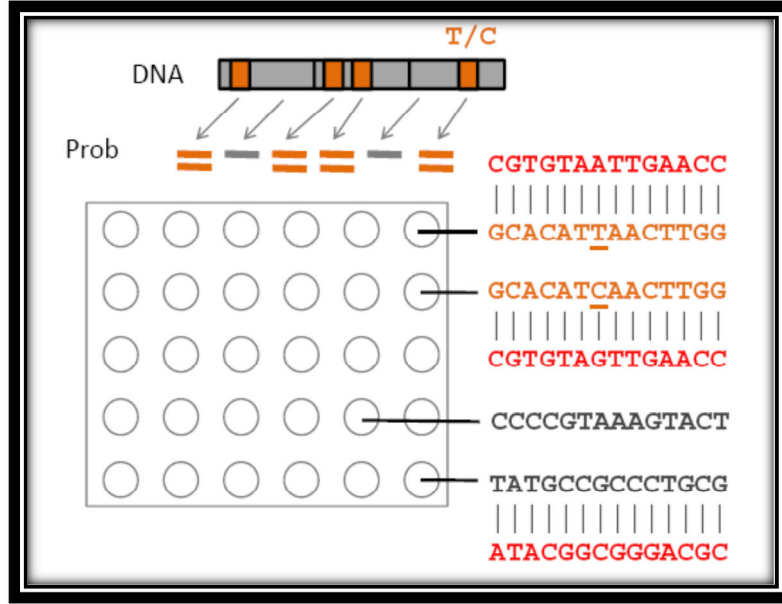
İlk TNP array 558 lokusun taranabildiği bir mikrodizin olup 1998 yılında kullanıma sunulmuştur. 2000 yılında ise TNP mikrodizinleri ilk defa bir kanser çalışmasında kullanılmıştır. Lindblad-Toh ve arkadaşları insan kanserlerinde LOH analizi gerçekleştirmişlerdir (116). Rubin ve arkadaşlarının prostat kanserinde TNP mikrodizinleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada TPD52 genini içeren 8q21 bölgesinde kopya sayısında artış görüldüğü tespit edilmiş ve bu amplifikasyonun prostat kanser gelişiminde önemli rolü olduğu belirtilmiştir (117). Lassmann ve arkadaşları tarafından kolorektal kanserde yaptıkları çalışmadaonkogen tanımlamada başarılı olunmuştur. Bu çalışmada 22 sporadik kolorektal kanser hastası ticari mikrodizinlerle analiz edilmiş ve karsinogenezis de önemli rolleri olan genlerde kopya sayısı değişiklikleri tanımlamıştır (118). Bir başka çalışma, Paris ve arkadaşları tarafından aCGH teknolojisi nasıl geliştirilir üzerine olmuştur. Prostat tümör FFPE örneklerinde aCGH ve oligonükleotit aCGH uygulanmıştır. Bu çalışmada

gelişen teknoloji TNP aCGH'in tümör genomunu karakterize etmede daha başarılı olduğunu göstermiştir (119).31 over kanserli olguda gerçekleştirilen bir çalışmada %19.5 frekansla 19p13.12 bölgesindeki bir amplifikasyonun önemli olduğu tespit edilmiş ve sonrasında gerçekleştirilen gen ifade analizi çalışmaları ile bu bölgedeki Notch 3 genin bu amplifikasyondan en çok etkilendiği ve bu genin over kanseri için kullanılabilir terapötik yaklaşımlar için bir hedef olabileceği ifade edilmiştir (120). Bu çerçevede daha pek çok çalışma mevcut olup; karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ile kompleks ve multifaktöriyel bir hastalık olan kanserde sık görülen yapısal değişikliklerin genom ebadında yüksek rezolüsyonla incelenebileceği ve kanserin başlangıcı, ilerlemesi ve tedavisi için önemli bilgiler sunabileceği gösterilmektedir.

#### **2.3.3.1.1.4.1. Bir TNP mikrodizin “Affymetrix SNP 6.0 array” ve kopya sayısı değişiklik analizi**

Yüksek çözünürlüklü oligonükleotid arrayler; kopya sayısı değişikliği genom boyu ilişkilendirme analizi gibi pek çok genom boyu analiz çalışmasında kullanılmaktadır. Affymetrix firmasının en son piyasaya sürdüğü genom boyu genotiplendirme platformu “Genome-Wide SNP 6.0 arraylerdir.” Tez kapsamında kopya sayısı değişiklik analizleri de bu array tipi ile gerçekleştirildiğinden dolayı bu bölümde bu array tipi ile ilgili bilgiler sunulmuştur. Bu array'in 2 önemli avantajı vardır. Birincisi; genomu yüksek çözünürlükte kapsaması, ikincisi ise düşük miktarda DNA materyali ile başlanması (121). SNP 6.0 Array'ler 906.600 TNP ve 946.000 kopya sayısı değişikliği probu olmak üzere toplam 1.8 milyon genetik belirteç içermektedir. Gen ifade mikrodizinlerinde olduğu gibi problemler 25 bç uzunluğundadır. Bu mikrodizin platformunun genotiplendirme array'lerinden 10K, 100K ve 500K modelleri eski jenerasyon, SNP5.0 ve 6.0 arraylere ise yeni jenerasyon olarak isimlendirilmektedir ki bu modellerin prob dizaynları da farklıdır. Eski jenerasyonda her bir alel için PM ve MM olmak üzere bir çift prob bulunmakta ve budurum “quartet” olarak isimlendirilmektedir. Ayrıca bu array modelleri SNP'in (-4,-2,-1,0,+1,+3,+4) lokasyonuna göre çoklu quartet'ler (7) içermektedir. Bu problemler DNA'da hem ters zincir hem de düz zincir için sentezlenmekte böylece bir SNP 4(quartet) X 7(farklı pozisyonlar) X 2(ters-düz zincir) =56 prob dizayn edilir. Bununla birlikte her iki alel için 14 quartet (PM) değerlendirilip en iyi 10 tanesi seçilmektedir. Aynı şey MM problemleri içinde yapılıp ve her bir TNP hem ters hem de düz zincirde olmak üzere topla 40

prob ile temsil edilir. Yeni nesil array'lerde ise yalnızca PM problemler kullanılmaktadır. Aynı zamanda her bir probun 3-4 tekrarı bulunmakla beraber DNA'nın tek zinciri üzerinden dizayn gerçekleşir (Şekil 2.15.) SNP 6.0 arrayler üzerindeki kopya sayısı problemlerin 5.677 tanesi genomik varyasyon veritabanında yer alan bilinen değişikliklerdir. Kopya sayısı değişikliği ve TNP'in kombinlendiği bu array ile genom 680 bp aralıklarla taranmaktadır (121).



Şekil 2.15. Affymetrix TNP array dizaynı (Neuvial 2012'den alınmıştır).

Bu array de prosedür 500 ng genomik DNA ile başlamakta olup, NspI ve StyI restriksiyon enzimleri ile kesilir ve 4 baz çiftlik "overhang"leri tanıyan adaptörler (Nsp adaptör/Sty adaptör) bağlanır. Adaptör takılı DNA fragmentlerinin amplifikasyonunda adaptör sekansı tanıyan genel bir primer kullanılır. PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) aşamasında 200-1.100 baz çifti arası fragmentler amplifiye edilir. Daha sonra her bir restriksiyon enzimi ile reaksiyonları gerçekleştirilen ve amplifiye edilen PZR ürünleri birleştirilir ve pürifiye edilirler. Çoğaltılan genomik DNA daha sonra fragmente edilir, işaretlenir ve array'e hibridize edilir. Hibridize edilen örnekler tarandıktan sonra her bir probdan gelen sinyal intensitesi ölçülür ve ilgili algoritmalar ile veriler değerlendirilir (121). Bu noktada sıklıkla her prob için sinyal intensitesinin log oranı hesaplanır ve hedeflenen bölge için hedefin referansa göre bağlı olarak görülen "0" dan sapmalar kopya sayısı değişikliği olarak değerlendirilir. SNP 6.0 verisi için pek çok sayıda analiz algoritması ve yazılımları mevcuttur. Affymetrix uyumlu yazılımlar: Partek Genomics solution, Nexus CGH, Helix

Tree Genetics analysis software, QuantiSNP, PennCNV, CNAG, dChip, aroma.affymetrix, Bioconductor paketleri (DNA copy, copynumber, CGHcall, snapCGH...).

Tarama işleminin ardından elde edilen veri üzerinden ilk olarak geri plan düzenlenmesi, (background adjustment), normalizasyon ve özetleme (summarization) basamaklarından oluşan ön işleme analizleri gerçekleştirilir. Spotlardan gelen sinyaller çoğu zaman sadece veriye ait olmayıp; işaretli örneklerin spesifik olmayan bağlanmaları, yıkama aşamasından kaynaklı artıklar ve tarayıcı kaynaklı optik gürültü sebebiyle bir arka plan gürültüsünü de barındırmaktadır. Gerçek veriden gelen sinyallerin analiz edilebilmesi için bu geri plan gürültüsü bu adımla elemeine edilmektedir. Normalizasyon adımının amacı ise örneklerdeki biyolojik olmayan yeni teknik kaynaklı farklılıkların ortadan kaldırılması ve arrayleri karşılaştırılabilir hale getirmektir. Özetleme basamağında ise kopya sayısı ve SNP problemleri için ayrı ayrı problemlerin intensitelerinden gelen değerler tek bir değer olarak elde edilir (122).

Kopya sayısı tespitinde kullanılan algoritmalar ise “circular binary segmentasyon (CBS)” ve “Hidden-Markov model (HMM)” olmak üzere 2 ana başlık altında sınıflandırılmaktadır. Tez kapsamında kullanılan segmentasyon metodu, Olshen ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yayınladıkları makale ile sunulmuştur. Bu metodda komşusuyla karşılaştırıldığında farklı bir kopya sayısında yeni bir segment bulana kadar ilgili bölge segmentlere ayrılmaktadır. Böylece kromozom boyunca aynı kopya sayısındaki bölgeler segmentlere ayrılmış olmaktadır (123).

Mikrodizin çalışmalarında örnek tipi ve kalitesi önemli bir nokta olup bütünlüğü korunmuş DNA tercih edilmektedir. Oysa pek çok hastalıkta olduğu gibi kanser çalışmalarında da formalinle fiksasyonu (sabitleme) yapıp parafine yerleştirilen (Formalin-Fixed Paraffin Embedded = FFPE) örnekler en geniş materyal kaynağını sunmaktadır. Bu noktada bu örneklerin doğası gereği mikrodizin çalışmalarında kullanımı uygun olmamakla birlikte kanser çalışmalarında kullanılabilmesi çalışmalara büyük avantaj sağlayacaktır. Bu aşamada gelinen nokta aşağıda özetlenmiştir.

### 2.3.3.1.1.5.CGH tekniğinde ve TNP mikrodizinlerinde arşiv materyallerinin kullanımı

FFPE örneklerden elde edilen DNA örneklerinin degrade olması,genelde düşük miktarda olması ve formalin fiksasyonu sonucu oluşan protein ve nükleik asitler arasındaki çapraz bağların enzimsel reaksiyonları olumsuz etkilemesi yüksek işlem hacimli teknolojilerin retrospektif çalışmalarda kullanımını sınırlandırmaktadır (124). Bununla birlikte süreç içinde CGH tekniğinin arşiv materyallerine uygulanabilme olasılığı pek çok tümörde retrospektif analize imkan tanımıştır. CGH, teknik açıdan bir takım sınırlamalara sahiptir. Analizin duyarlılığı, tümör hücrelerinin normal hücrelerle kontaminasyonu tarafından engellenebilir. Bu durumda mikrodiseksiyon ile tümör hücrelerinin ayrılması non-tümör hücrelerin kontaminasyonunu engelleyecektir (114).

Tümörler için en geniş DNA kaynağını FFPE arşiv materyalleri oluşturmaktadır. FFPE dokularının kaynak olarak kullanımı pek çok avantajı da beraberinde getirmektedir. Bir yandan bu dokular kaynak açısından aşılabilir bir sıkıntı oluşturmaz iken diğer yandan detaylı histolojik ve fenotipik karakterizasyonları yapılmıştır. aCGH çalışmalarında da kullanımları bu açıdan son derece yararlı olacaktır. Johnson ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada FFPE dokularından izole edilen DNA ile 300 bp den daha uzun fragmentlerin PCR amplifikasyonu gerçekleştirmiş olup tekrarlanabilir yüksek kalitede aCGH verisi sağladıklarını belirtmişlerdir (125). Çok yeni olmakla birlikte son çalışmalar kromozomal anomalilerin yüksek çözünürlüklü genomik profillenmesine imkan veren SNP-aCGH ile FFPE doku örneklerinin bu alanda kullanılabilirliğini valide eder niteliktedir. Arşiv materyalleri ile ilgili en önemli problem degradasyondur. Ancak son çalışmalarda da gösterildiği üzere gerek genomik DNA amplifikasyonu gerekse array prosedür ve analizlerine getirilen modifikasyonlar sayesinde bu problemin üstesinden gelmek yönünde önemli adımlar atılmıştır (124,126,127,128). Bunun güzel örneklerinden birisi de Tuefferd ve arkadaşlarının 15 adet akciğer tümörüne ait taze dondurulmuş dokular ve onların eşli FFPE örnekleriyle ve Affymetrix marka en son piyasaya sürülen gelişmiş array tipi “Genome wide human SNP 6.0” ile gerçekleştirdikleri çalışma sunmaktadır. Bu çalışma ile ve rapor ettikleri PZR, fragmentasyon ve analiz aşamaları optimizasyon uygulamaları ile FFPE materyaller ile başarılı mikrodizin sonuçlarının elde edilebildiğini göstermişlerdir (124).

### **2.3.3.2. Kanser genomunun ifade profili ve kanser biyolojisinde mikrodizin uygulamaları**

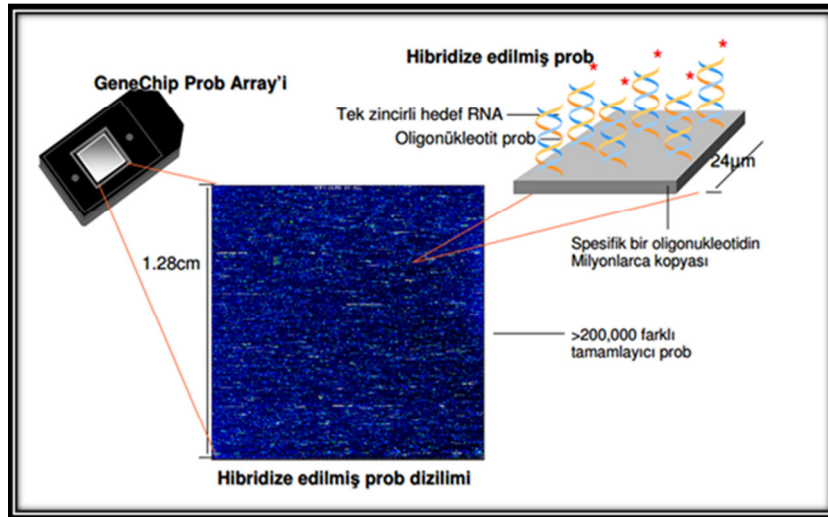
Genom hücreden hücreye sabit olmasına karşın gen ekspresyon profili dinamik bir yapıda olup hücrenin tipi ve içinde bulunduğu koşullara göre değişebilen bir karakter sergilemektedir. Bilim dünyasındaki önemli adımlardan birisi olan insanın tüm genom dizi bilgisinin çıkarılması beraberinde çalışmalara da genom boyu analizleri katmıştır (20). Buradan çıkışla çok sayıda genin rol aldığı tümör oluşumunda mikrodizin teknolojisinin kullanımı tek seferde binlerce geni tarayabilme imkanı ile ön plana çıkmıştır. Mikrodizin teknolojisi ile bir hücre populasyonundaki veya doku örneğindeki bütün genlerin ekspresyon paterninin geniş kapsamlı bir resmi çizilmektedir. Mikrodizinler; aynı anda birçok gen ile ilgili bilgi alınması, hızlı sonuç elde edilmesi yanında kanser biyolojisinde TNP ve mutasyon tanımlanması, tümör sınıflandırması, tümör baskılayıcı hedef genleri tanımlanması, kanser biyobelirteç belirleme, ilaç direnci,vb. pek çok sahada uygulama alanına sahiptir (23).

#### **2.3.3.2.1. Gen ifade çalışmalarında mikrodizin teknolojisi ve analizi**

DNA mikrodizinlerinin temel konsepti komplementer RNA veya DNA dizilerinin bağlanması ve hibridize olmasıdır. Bu teknolojiye analiz edilecek DNA molekülleri belli bir organize patern içinde katı destek yüzeylere sabitlenir ve array üzerindeki DNA'lara hibridize olan örnek DNA'ları analiz edilir. Bu noktada sabitlenen DNA prob olarak adlandırılırken;hibridize olan, DNA hedef olarak isimlendirilmektedir. Bağlanmanın miktarının ölçümünü yapabilmek için hedef moleküller floresan veya radyoaktif olarak işaretlenmektedir (130). Aslında 1953 yılında DNA'nın çift zincirli heliks yapısının tanımlanması, birbirini tamamlayan zincirlerin hibridize olması ve 1975 yılında Ed Southern, bu karakteristik özelliğin, radyoaktif olarak işaretlenmiş kısa DNA dizileri kullanılarak, DNA dizi analizinde kullanması (131) bu teknolojinin ortaya çıkmasında mirengi noktaları olmuştur.

Mikrodizin teknolojisinin ilk uygulamaları,hücrelerde gen ekspresyon seviyesini ölçümüne yöneliktir ve cDNA mikrodizinler ve oligo mikrodizinler olmak üzere kullanılan

problar açısından 2 ana başlık altında değerlendirilebilmektedirler (130). Bu alanda; Stanford Üniversitesinden Patrick Brown, ve arkadaşları saflaştırılmış cDNA klonlarından PCR amplifikasyonu ile elde ettiği DNA fragmentlerini bir robot yardımı ile mikroskop camının üzerine sabitleyerek ilk cDNA mikrodizinlerini (1995) üretmeleriyle öncü olmuşlardır (20). İlk oligonükleotid temelli ekspresyon mikrodizinleri ise Affymetrix firması tarafından kullanıma açılmıştır. 1990'ların başında Steve Fodor ve arkadaşları (affymetrix) fotolitografik teknikle çok sayıda oligonükleotidin katı yüzeye paralel sentezi ile binlerce oligonükleotid problemleri içeren cam arrayler üretmiş olup zaman içinde "GeneChip" markası altında piyasaya sürmüşlerdir (132, 133). Tez çalışması kapsamında bu marka mikrodizin kullanıldığı için bu platform üzerinden teknoloji (Şekil 2.16.) tanımlanmaya çalışılmıştır.

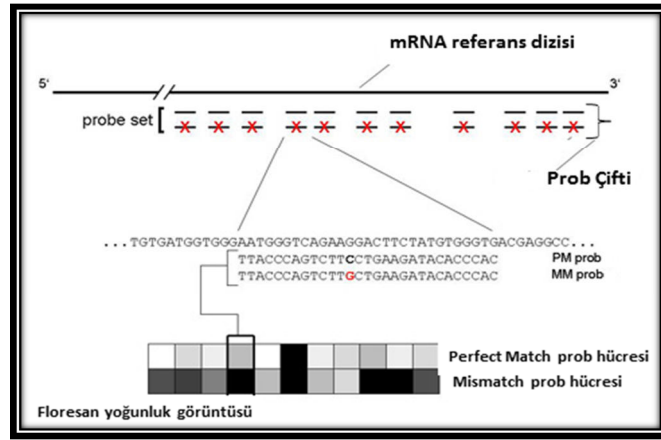


Şekil 2.16. Affymetrix GeneChip yapısal şeması (www.affymetrix.com adresinden alınmıştır)

Affymetrix mikrodizin gen ifade teknolojisinde arrayler üzerinde 25 nükleotit uzunlukta problemler kullanılmaktadır. Genlerin ifade düzeylerini ölçmek için bu problemlerin kullanıldığı array'de duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği arttırmak amacıyla her bir gen 11-22 probleme temsil edilmektedir. Her bir gen için oluşturulan böyle prob gruplarına "prob seti" denilmektedir ve bu platformda bazı genler için bir den fazla prob seti bulunmaktadır. Her bir prob bir çift probtan oluşmaktadır. Bu prob çiftleri; tam eşleşme gösteren "perfect match" (PM) problemleri ile bu 25 bazlık problemin 13. bazının farklı olduğu "mismatch problemleri" (MM)'nden oluşmaktadır. Bu dizayn; spesifik olmayan bağlanmalardan



oluşabilecek yanlış pozitif değerlendirmeleri engellemek amacıyla yani özgün olmayan hibridizasyonun tespiti için geliştirilmiştir (130) (Şekil 2.17.).



Şekil 2. 17.Affymetrix GeneChip prob dizaynı (www.dkfz.deadresinden alıntıdır.)

Bu teknoloji uygulaması; çalışılan mRNA örneğinin ters transkripsiyon tekniği ile cDNA'ya çevrilmesi ile başlayıp in vitro transkripsiyon ile aRNA (amplified RNA) sentezlenmesi ve biyotin işaretli nükleotidlerin inkorporasyonu ile devam etmektedir. Sonrasında elde edilen aRNA'ların pürifikasyonu ve fragmentasyon reaksiyonlarının ardından GeneChip array'e hibridize edilen örneklerin taranması ile uygulama son bulmaktadır. Tarama işleminin ardından gerçekleştirilen farklı olarak ifade edilen gen setinin tespiti ve sonrasında verideki biyolojik anlamının çıkarılmasında takip edilen analiz yöntemi çalışmaların amacı çerçevesinde farklı uygulamalar ve yöntemler içermekle birlikte bazı ana başlıkları kapsamaktadır. Bunlar: Ham verinin okunması, veri kalitesinin değerlendirilmesi, verinin ön işleme analizleri, farklı olarak ifade edilen gen setinin belirlenmesi ve ileri gen ontoloji ve zenginleşme yolak analizleri (134) (Şekil 2.18.).



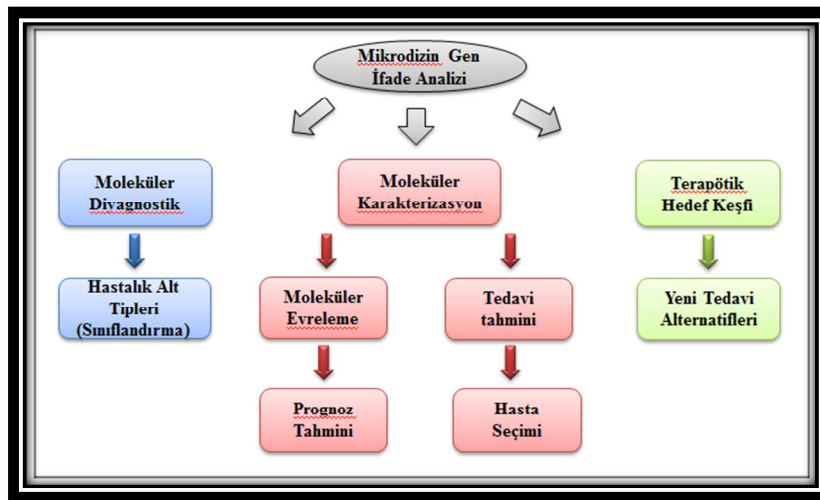
Şekil 2.18. Mikrodizin veri analiz prosesi (Olson, 2006'dan değiştirilerek alınmıştır).

Hibridize edilen array'lerin taranması ile ne kadar miktarda hedefin her bir spotta hibridize olduğu bilgisi elde edilir ve ilk olarak bu ham veri .DAT uzantılı dosyaya kaydedilir. DAT dosyasındaki piksel verisinin nümerik veri şeklinde eldesi .CEL uzantılı dosya ile elde edilmektedir. Genlerin ifade değerlerinin doğru ve güvenilir elde edilmesi için ön işleme metotları çok büyük önem arz etmektedir. Ön işleme; Arkaplan çıkarımı (Background correction), normalizasyon (Normalization) ve özetleme (Summarization) olarak 3 ayrı ana başlık altında değerlendirilmektedir (135). Spotlardan gelen sinyaller çoğu zaman sadece veriye ait olmayıp; işaretli örneklerin spesifik olmayan bağlanmaları, yıkama aşamasından kaynaklı artıklar ve tarayıcı kaynaklı optik gürültü sebebiyle bir arka plan gürültüsünü de barındırmaktadır. Doğru veri analizinde “background correction” başlığı altında bu gürültü elemine edilir. Normalizasyon adımının amacı ise örneklerdeki gen ifade değerlerinin aynı koşullarda elde edilememiş olması (teknik farklılıklar) nedeniyle doğru karşılaştırma ortamı yaratabilmek için buteknik farklılıkları uzaklaştırılıp arrayleri karşılaştırılabilir hale getirmektir. Her gen, prob seti dediğimiz 11-20 arasında değişen sayıdaki problarla ifade edildiğinden özetleme aşamasında aynı prob setine ait prob değerleri tek bir ifade değeri verecek şekilde özetlenir (136). Ön işleme algoritmalarında temel olarak 3 tanesi dikkat çekmektedir. Bunlar MAS5, RMA (Robust multiarray algorithm) ve MBEI (dChip) dir (137). Daha sonra ön işleme yapılan veri ile çalışmanın amacı doğrultusunda istatistiksel analizlerle farklı olarak ifade edilen gen setleri belirlenir ve bu gen setinde gen ekspresyon paternleri kümeleme analizleri doğrultusunda gerçekleştirilir. Bu aşamadan sonra veri

içindeki biyolojik anlamın ortaya çıkarılması önem kazanmaktadır. Bu noktada genler ve bu genlerin biyolojik, hücrel fonksiyonları gibi pek çok açıdan değerlendirildiği çeşitli veritabanları mevcuttur. Bu araçlar üzerinden gerçekleştirilen analizler sonucunda pek çok tanımlanmış biyolojik tema kombinlenip çalışma kapsamındaki anlamlı biyolojik hikaye ortaya çıkarılır.

### 2.3.3.2. Mikrodizin teknolojileri ile kanserin moleküler profilinin çıkarılması

Son yıllarda mikrodizinler kullanılarak yapılan gen ifade profili çalışmaları, pek çok malignitenin altında yatan önemli prosesleri anlamamıza yardımcı olmuştur. Kanserde gen ifade mikrodizinlerinin kullanım alanlarını; moleküler diyagnostik, moleküler karakterizasyon ve terapötik hedef keşfi kapsamında temel 3 başlık ve bunların alt başlıkları ile kategorize edebiliriz (Şekil 2.19.) (134). Bu başlıklar altında gerçekleştirilecek mikrodizin gen ifade çalışmaları; tümör başlangıç, gelişim ve ilerlemesi ayrıca tedavi için yeni seçeneklerin geliştirilme potansiyeli yaratması açısından kanser araştırmaları içinde kendine ayrı bir yer edinmiştir. Histolojik olarak benzer tümörlerin klinik davranışları ise sıklıkla farklıdır. Ayrıca bu çalışmalar tümörlerin moleküler profillerine dayanan subklasifikasyonları ve bu tümörlerin neden farklı davranış sergilediklerine açıklık getirecektir (129,134). Bu bölümde bazı çalışmalar bu başlıklar altında örneklendirilmiş olup; bahsi geçen araştırmalarda önemli sonuçlar ortaya konmuştur.



Şekil 2.19. Gen ifade profilinin medikal onkolojide potansiyel klinik uygulamaları (Nannini 2009'dan değiştirilerek alınmıştır).

Yapılan çalışmaların birinde, özgün gen ekspresyon paternleri ile kanser tiplerinin sınıflandırılmasının yapılıp yapılamayacağı sorusuna cevap aranmıştır ve cevap olarak; ön bilgi olmadan (unsupervised) akut miyelositer lösemi (AML) ve akut lenfositik lösemi (ALL) sınıflandırılması verilmiştir. Beraberinde yeni hastalarda doğru sınıf tahmini yapılabilmektedir (138). Diğer bir çalışmada ise mikrodizin verileri yardımıyla moleküler olarak farklı iki tip DLBCL (Diffuse large B-cell lymphoma) tanımlanmıştır. Ayrıca hastaların tedavilere verdikleri farklı yanıtlar, tümörlerde moleküler farklılık olabileceğini düşündürmüştür. Bu görüntüden yola çıkılarak varılan sonuçlarda bulunan farklılıkların, tedaviye cevabı ve tümörün farklılaşmış durumunun bir göstergesi olduğu ve bu durumun klinik yansımalarının da anlamlı olduğu bulunmuştur (139). Shipp ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise tedaviye yanıt veren hastalar ile ölen hastaların karşılaştırılması yapılmış olup gen ifade düzeylerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Sonuçta klinik olarak farklı risk grubundaki hastaların ayırt edilebileceğine vurgu yapılmıştır (140). İyi ve kötü iki prognostik gruba ayrılan 117 nod negatif meme kanserli hastadan alınan örneklerle yürütülen bir araştırmada gruplar arasındaki gen ekspresyon profilleri incelenmiş ve kötü prognoz imzasını hücre döngüsü kontrol genleri, metastaz, invazyon ve anjiyogenezis ile ilgili genlerin oluşturduğu saptanmıştır. Bulguların hastalığın klinik sonuçlarının tahmininde birer parametre olarak kullanılabileceği öngörülmüştür (141).

Mikrodizin çalışmalarından gelen bilgiler biriktikçe klinikte de pek çok tümör tipine de uygulanır hale gelmiştir. Örneğin CLL hastalarında ZAP-70 bir prognostik belirteç olarak tanımlanmıştır (142). Bir diğer örnekte ise kanser hastaları için klinik laboratuvar servisi veren “*Genomic Health*” şirketi, 447 meme tümörlü hasta ile gerçekleştirdikleri birbirinden bağımsız 3 farklı klinik çalışma sonucu belirledikleri 250 aday gen arasından analiz sonucu 16 kanser gen paneli ve normalizasyon için 5 gen içeren *Oncotype DX* adını verdikleri meme kanseri tarama testini oluşturmuşlardır. Daha önce patent almış olan *Oncotype DX* meme kanser testine Amerika Patent ve Marka Ofisinden 2 yeni patent verilmiştir. Şirket *Oncotype DX* gen setini genişletmek için KRAS gibi ek kanser belirteçlerini kapsama almayı planladıklarını ifade etmektedirler. Ayrıca FDA, onayladığı iki kolorektal kanser ilacı (Amgen's Vectibix ve BMS/ImClone's Erbitux ) için tedaviye başlanmadan önce KRAS mutasyonunun araştırılması gerektiğine vurgu yapmaktadır (143). Bu sonuçlar mikrodizin verilerinin ortaya çıkaracağı biyobelirteçlerin kliniğe olumlu yansımaları olarak değerlendirilebilir.

### **2.3.3.2.3. Mikrodizin gen ifade profili çalışmalarında arşiv materyallerinin kullanımı**

Mikrodizin analizlerin performansını ve hassasiyetini etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesi örnek kaynağı ve örnek hazırlama prosesidir. Mikrodizin teknolojisi normal ve hastalıkla ilgili durumda hücresel gen ekspresyonu ile ilgili geniş bilgi sağlar. Şimdiye kadar mikrodizin analizlerinin çoğu, taze kan ve doku örneklerinin kullanımı ile sınırlı kalmıştır. Bununla birlikte kanser çalışmalarında FFPE arşiv materyallerinin kullanımı büyük önem arz etmektedir (144). FFPE örneklerinin bol bulunması araştırmalar için önemli olmakla birlikte bu örneklerdeki degradasyon, çapraz bağlar gibi olumsuz etkenler mikrodizin gibi yüksek işlem hacimli teknolojilerde bu örneklerin kullanımını uygunsuz hale getirmektedir (145, 146). Bununla birlikte özellikle tümörler için geniş bir kaynak sunan bu materyaller ile mikrodizin çalışmaları yapılmış olup; bu materyallerin mikrodizin çalışmalarında kullanımına yönelik optimizasyon süreci devam etmekle birlikte oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Scicchitano ve ark. 2006, Coudry ve ark., 2007, Frank ve ark., 2007, Turner ve ark. 2011, Linton ve ark., 2009 bu noktada gerçekleştirilen çalışmaların örnekleridir (147-151).

### **2.3.3.3. Genomik yaklaşımların kullanımı ile genomik ve transkriptomik entegrasyon**

Biyolojik sistemler, çoklu ölçeklendirme ve çoklu yöntemlerle karakterize edilmelidir. Bunun en güzel örneğini gen ekspresyon ve *aCGH* analizlerinde sık kullanılan mikrodizin platformları vermektedir. Mikrodizin gen ekspresyon analizi işlevsel bilgi sunarken *aCGH* gen kopya sayısı değişikliklerini tarayarak genomun yapısal varyasyonları hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu iki tamamlayıcı bilginin bütünleştirilmesi ilginç sonuçlar ortaya çıkaracağı kadar bir çok anlaşılma zılgı daha da açıklayıcı hale getirmektedir (152).

İfade mikrodizinlerinin *aCGH* gibi moleküler sitogenetik tekniklerle kombine edilmesi tümör biyolojisinde hedefe yaklaşılması konusunda bir adım daha atılmasını sağlamaktadır (153). Monni ve arkadaşları meme kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarında bu iki tekniği kombine etmişlerdir. Bu sayede hem amplifiye olan hem de ekspresyonu artan sınırlı sayıda gen tanımlamışlardır (154). Bussey ve arkadaşlarının 60 adet kanser hücre hattında yaptıkları çalışmada DNA kopya sayısı, mRNA ekspresyon seviyesi ve ilaç

duyarlılığı arasındaki ilişkiyi tanımlamışlardır. Analizleri sonucunda ERBB2 geninin ifade düzeyindeki ileri derecedeki artış ile 3p kopya sayısı arasında ilişki belirtilmiştir (155). Böbrek hücresi karsinomları üzerinde gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise anormal kromozomal bölgelerde 71 adet farklı ekspresyon değeri veren gen tanımlanmıştır (156). Gastrik kanser hastaları üzerinde yürütülen bir çalışmada entegre edilen aCGH ve transkriptom verileri sonucunda bu kanser tipinin üç genel gruba ayrılacağı ifade edilmiştir (65). Curtis ve arkadaşlarının 2012’de yayınladıkları ve yaklaşık 2000 meme kanserli olguda gerçekleştirdikleri kopya sayısı değişikliği-gen ekspresyon verisi entegrasyonunda kopya sayısı değişikliklerinin gen ifadesine nasıl etki ettikleri üzerine önemli bilgiler sunduklarını ve meme kanseri için moleküler olarak yeni alt gruplar tanımladıklarını vurgulamışlardır (157). Gen dozajı ve ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki diğer bir çok çalışma ile de gösterilmiştir. Gen ifade farklılığının önemli bir bölümü kopya sayısı değişikliği ile açıklanmaktadır (58,86,158).

Kompleks ve multifaktöriyel bir hastalık olan kanserin; ortaya çıkışı, ilerlemesi ve yatkınlık yaratan nedenlerinin ortaya konulmasında yapılacak entegre çalışmalar doğru teşhis ve tarama tekniklerinin uygulanması yanında doğru tedavi yaklaşımını öngörmede önemli adımların atılmasını sağlayacaktır. Bu yaklaşımdan yola çıkılarak çizilecek resimde özellikle de bozuk gen ekspresyon paterni ve spesifik yapısal genomik değişikliklerin tüm genomda analizi bizlere doğru araçlarla tespit yapmamızı sağlayacaktır.

Dünyada en yaygın görülen ve en çok çalışılan kanserlerden biri de kolorektal kanserdir. Bu tez çalışması kapsamında da dünyada en yaygın görülen kanser tiplerinden biri olan kolorektal kanser vakalarının %90’ını oluşturan sporadik vakalarda; kanserin tetiklenmesinde, oluşmasında ve ilerlemesinde etkin olabilecek yapısal değişiklikler ve global gen ifade farklılıkları değerlendirilmiştir. Bu bölümde şimdiye kadar anlatılanlar üzerinden kolorektal kanserdeki gelinen nokta ve tez çalışmasının içeriği kapsamında literatür özeti sunulmuştur.

## **2.4.Kolorektal Kanser**

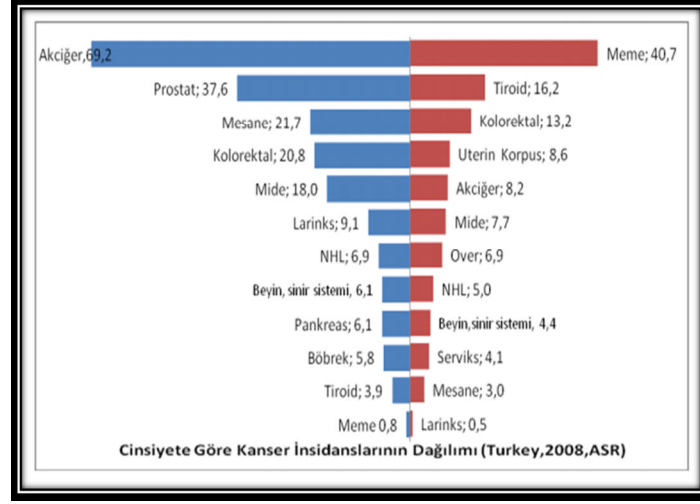
Kolorektal kanser (KRK), dünyada en yaygın görülen ve kanser sebepli ölümlerde üst sıralarda yer alan bir hastalıktır (159). Bu kanser; normal kolonik epitelin adenomatöz polip ve ardından invazif kansere patolojik transformasyonu sonucu oluşmaktadır ki bu çok adımlı prosesin gelişmesi belli bir zaman almakla birlikte pek çok genetik değişiklikle karakterize bir süreçtir (160). Dünya genelinde yaygın görülmesi nedeniyle de kolorektal karsinogenez etiyojisi, moleküler mekanizması, tanı ve tedavisi açısından en çok çalışılan kanser tiplerinden birisi olmuştur. Bu açıdan hastalıkla ilgili bilgiler hızla artmış olmakla birlikte; kanserin heterojen, çok genli ve çok adımlı doğasından dolayı kompleks görüntüsünün aydınlatılması ve klinikle buluşması için çalışmalar devam etmektedir (161).

### **2.4.1. Kolorektal kanser etyolojisi ve epidemiyolojisi**

Ferlay ve arkadaşlarının 2008’de yayınladıkları Avrupadaki kanser insidans ve mortalitesi çalışmalarında 3.2 milyon yeni kanser vakası olduğunu ve 2008’de kanser sebepli 1.7 milyon ölüm gerçekleştiğini belirtilmiştir. En yaygın kanserler; kolorektal kanser (436,000 vaka, %13.6), meme kanseri (421,000 vaka, %13.1), akciğer kanseri (391,000 vaka, %12.2) ve prostat kanseri (382,000 vaka, %11.9) dir. Kolorektal kanserle ilgili olarak bilinen en yaygın 3. kanser tipi genel bilgisinin aksine bu çalışmada kolon kanseri en çok görülen kanser tipi olmuştur. Ölüm sebebi olarak en yaygın kanserlerin sıralamasında ise kolorektal kanser ikinci sıradadır (akciğer kanseri (342,000 ölüm, %19.9), kolorektal kanser (212,000 ölüm, %12.3), meme kanseri (129,000, %7.5) ve mide kanseri (117,000, %6.8)(162). Bu çalışmanın yanında Amerika Kanser örgütü her yıl Amerikadaki yeni kanser vakaları ve ölümleri ile ilgili olarak araştırma yapmaktadır. “Cancer statistics, 2013” adıyla yayınladıkları raporda Amerika’da 2013 yılında 1,660,290 yeni kanser vakası olduğu ve 580,350 kanser sebepli ölüm gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu çalışmada erkekler arasında en sık görülen kanser; tahmin edilen yeni vaka sayısına göre prosta kanseri (238.590) dir. Bunu sırasıyla akciğer kanseri (118.080) ve kolon kanseri (73.680) takip etmektedir. Kadınlar arasında en yaygın görülen kanser tiplerinde tahmin edilen yeni vaka sayısına göre birinci sırayı meme kanseri (232.340) alırken ikinci sırada akciğer kanseri (110.110) yer almakta ve kolon kanseri ise 69.140 rakamıyla üçüncü sırada yer almaktadır. Bu raporda görüldüğü üzere kolon kanseri tahmini yeni vaka sayısında hem erkek hem de





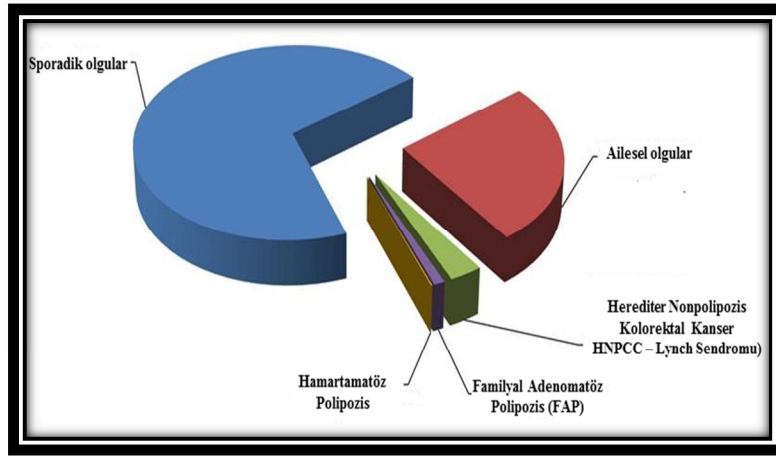


**Şekil 2.21. Cinsiyete göre Türkiye'deki kanser insidansı (Türkiye Sağlık Bakanlığı; 164'den alıntıdır).**

Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın 2007-2008 yıllarında oniki ildeki kanser kayıt merkezi verilerine göre, KRK görülme sıklığı açısından tüm kanserler içinde % 7,8 ile kadınlarda üçüncü ve % 7,5 ile erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır. Şu anda kolorektal taramaların kapsama oranı %20-30 arasındadır ve ülkemizde teşhis edilen olguların yarısından çoğu ileri evrededir (165).

Kolorektal kaser, gelişimi açısından genellikle 3 spesifik patern kapsamında görülmektedir: sporadik, kalıtsal ve ailesel (Şekil 2.22.). Ailesel veya kalıtsal bir öykü olmadan gelişen sporadik KRK tüm olguların yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır. Sporadik KRK 50 yaş ve üzerinde daha yaygın olarak görülmektedir. Sporadik terimi ailede kanser öyküsü olmayan ve kansere ailesel nedenlerden ötürü yatkın olmayan kendiliğinden gelişen tümörler için kullanılmaktadır. Sporadik kanser, çevresel faktörler ve tümör baskılayıcı gen ve onkogenlerdeki değişimleri de içine alan bir seri genetik değişiklik sebebiyle gelişmektedir (166,167). KRK'nın en yaygın kalıtsal formları familiyal adenomatöz polipozis (FAP) ve herediter nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCC) olmakla birlikte FAP varyantları olan Gardner ve Turcot sendromları ile Hamartamatöz Polipozis sendromları, Juvenil Polipozis sendromu ve MYH-ilişkili Adenomatöz Polipozis sendromu (MAP) da daha nadir görülmekle birlikte kalıtsal kanser sendromları da yatkınlıkla ilişkilidir (167). Ailesel tip en az birinci derece yakınında KRK varlığında gelişebilmektedir. Kalıtsal kanserde ise sporadik ve aileseldeki bu parametrelerin dışında otozomal dominant paternde bir kolorektal kanser aile öyküsü olması

gerekmektedir ve bu tip aynı zamanda iyi ve kötü huylu kolon dışı lezyonlar, florid adenomatöz polip gibi belirli fenotipik işaretleri de kapsamaktadır (168).



**Şekil 2. 22 .Kolorektal kanserin sınıflandırılma şeması (www.cancer.gov adresinden alıntıdır).**

Kolorektal kanser gelişiminde genetik faktörlerin yanında çevresel etkenlerde önemli rol oynamaktadır. Batı tipi beslenme artmış KRK riskinde en önemli çevresel faktörlerden biri olarak düşünülmekte olup bu diyetin tek başına tüm sporadik olguların yaklaşık % 50'sine katkı yaptığı tahmin edilmektedir (169). Epidemiyolojik çalışmalar ayrıca yüksek oranda yağ, kırmızı et ve alkol tüketiminin KRK'ye yakalanma riskini artırdığını göstermiştir. Sigara tüketimi de yine artmış riskle ilişkilendirilirken; meyve, sebze ve lifli besinlerle beslenmenin düşük risk oranı ile ilişkili olduğu vurgulanmaktadır. Steroidal olmayan anti-enflamatuvar ilaçlar, hormon replasman tedavisi ve fiziksel aktivitenin KRK'e karşı koruyucu etkileri yine çalışmalarda gösterilmiştir (170). Bu çevresel etkilerin yanında kanserde en büyük risk ailede kanser öyküsüdür. Birinci derece yakında KRK gözlenmesi riski 2 kat artırırken; birden fazla kişide KRK varlığı ise riski 4 kata kadar artırmaktadır (171).

Kolorektal kanser gelişiminin genetik ve çevresel faktörlerin farklı kombinasyonları tarafından belirlendiği kompleks ve heterojen bir hastalıktır. Populasyonu KRK riski açısından ayırmak ve sınıflandırmak bireysel risk seviyesinde kategorize etmekle birlikte kanser gelişimine önlem olacak hedeflerin ortaya konmasına imkan tanıyacaktır. Bu imkanın ortaya çıkarılmasında KRK'nın etyolojisi, kınığı ve de tabiki kanserin oluşumunda, ilerlemesinde ve yayılmasında etken olan moleküler mekanizmaların

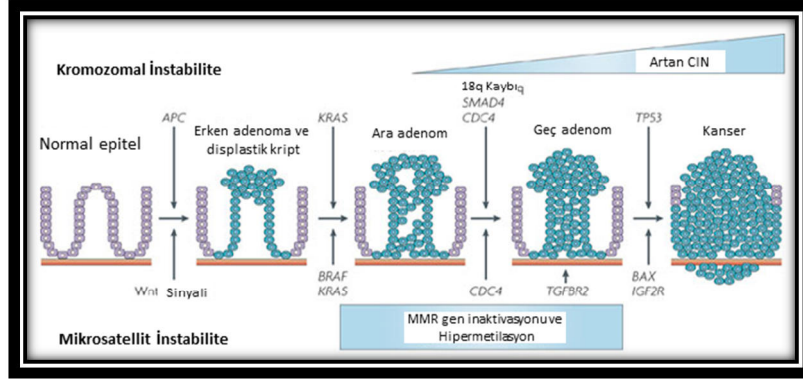
çözümlemesi için gerekli bilgilerin açığa çıkarılması şüphesiz en büyük amaç olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu noktada kolorektal kanserin moleküler biyolojisi ise çalışmalarda ön plana çıkmış olup kolorektal karsinogenez süreci bu bölümde değerlendirilmiştir.

#### **2.4.2. Kolorektal karsinogenezis ve moleküler mekanizması:Kanser yol haritası**

Kolorektal kanser; normal mukozadan benign prekürsör evreye, premalign polip ve invazif hastalığa doğru ilerleyen çok adımlı bir süreçte kümülatif değişikliklerle gelişmektedir. Bu prosesi sürükleyen moleküler mekanizma ve önemli patolojik işaretler kolorektal kanseri karakterize etmekte olup bu süreç işlenmeye ve şekillendirilmeye devam etmektedir (172). KRK sınıflandırılmasına yönelik pek çok parametre (lokasyon, patoloji...) olmakla birlikte moleküler profillerine göre bazı fenotiplere gruplandırılması son yıllarda ön plana çıkan sınıflandırma şeklidir. Bu noktada kolorektal karsinogenezde birbirinden farklı genetik profilleriyle 3 ara yol dikkat çekmektedir (Şekil. 2.23.) (173).

1. “Supressor Pathway”, Kromozomal instabilite yolağı(Chromosomal Instability=CIN)
2. Mikrosatellit instabilite yolağı (Microsatellite Instability=MSI)
3. CpG adacık metilasyon fenotipi (CpG Island Methylator Phenotype =CIMP)

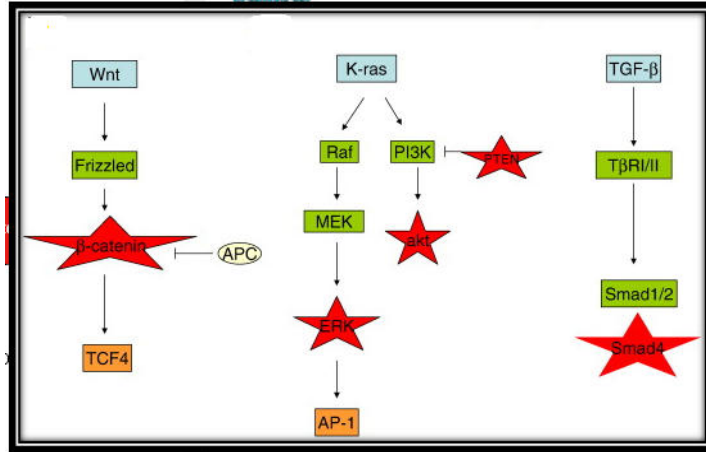
Bu üç sınıflandırma içerisinde kolorektal karsinomların en sık kromozomal instabilite ara yolu üzerinden geliştiği belirtilirken mikrosatellit instabilite ara yolu kolorektal karsinomların % 15-20'sinde bulunmakta ve diğerleri ise CpG adacık metilasyon fenotipi arayolu üzerinden gelişmektedir (174).



**Şekil 2.23. Kolorektal karsinogenizde moleküler ara yollar (Walther 2009'dan değiştirilerek alınmıştır).**

#### 2.4.2.1. Kromozomal instabilite yolağı

Kolorektal karsinomların yaklaşık %70-80'i "supressor pathway" şeklinde de isimlendirilen bu genetik yol ile gelişmektedir. Çeşitli onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile sonuçlanan bir seri mutasyonun birikimi ve çeşitli kromozomal yeniden düzenlenmelerin görüldüğü bu yolağın "adenoma-karsinoma sekansı" olarak da bilinmektedir (172). Bu değişiklikler mutasyonlu hücrelere büyüme avantajı sağlamakla birlikte klonal çoğalmaya da yol açmaktadır. Adenoma-karsinoma geçişindeki bu çok adımlı gelişim ilk defa 1990 yılında Fearon ve Vogelstein tarafından önerilmiştir. Adenom gelişiminde başlangıç genetik olay, wnt sinyal yolağında aktivasyona yol açan adenomatöz polipozis genindeki (APC) mutasyondur. APC genindeki mutasyon genin bekçi fonksiyonunun kaybolmasına neden olduğu gibi sonrasında kromozomal instabilitenin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bu mutasyonu Kras onkogeninde mutasyon gelişmesi takip etmektedir ki Ras aracılı yollar hücre çoğalmasını, büyümesini ve transformasyonunu tetiklemektedir. Maligneteye geçişte ise 18q delesyonu ve p53 mutasyonu söz konusudur. Ayrıca adenomadan invazif ve metastatik hastalığa ilerlemede SMAD4 'e ek olarak bazı tümör baskılayıcı genlerde de fonksiyon kaybı görülmektedir (175). Bu bölümde ifade edilen bu genlerin kolorektal kanser gelişiminde etkileri, etki gösterdikleri yollar (wnt sinyal yolağı, p53 sinyal yolağı, Ras sinyal yolağı, TGF/Smad sinyal yolağı) üzerinden sunulmuştur (Şekil 2.24.).



Şekil 2. 24. Kolorektal kanser adenoma-karsinoma sekansı yolları

Wnt sinyal yolağının aktivasyonu kolorektal kanser gelişiminde başlatıcı etken olarak kendini göstermektedir. Wnt sinyal yolağı onkoptotein β-kateninin nükleer partnerlerine bağlanması ve hücrel aktivasyonda etkili transkripsiyon faktörlerini uyarmasıyla süregelmektedir. APC geninin de içinde yer aldığı β-katenin degradasyon kompleksi proteolizis yoluyla β-katenin protein seviyesi kontrol etmektedir. Bu noktada APC proteini, β-katenini parçalayarak sitoplazmadaki miktarını azalttığı gibi onun nükleer lokalizasyonunu da inhibe ederek çekirdeğe geçişini engellemekte ve büyüme sinyalini durdurmaktadır. Kolorektal kanserdeki bu yaygın mutasyon APC geninin kodladığı proteini inaktive etmektedir ki APC geninin yoksunluğu Wnt yolağını aktif bırakmaktadır. APC genindeki “germline” mutasyonlar sonucu FAP sendromu ortaya çıkmaktadır. APC gen mutasyonu kromozomal instabilite yolağı tüm sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %80’inde görülmektedir (159, 176).

K-ras 12p12.1’de lokalize ve 21-kDa’luk “GTP-binding” proteinini kodlamaktadır. Kolorektal kanserlerin % 30-40’ında K-ras mutasyonu tanımlanmıştır (179). GTP’ye bağlandığında ras proteini aktif hale gelmektedir. Bu onkogen içinde MAPK (mitogen-activated protein kinase) gibi önemli sinyal yollarında görev almaktadır. Mutant K-ras’ın kolonik epitelyumun hiperplastik büyümesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (174).

Tp53 yolağının mutasyon yoluyla inaktivasyonu kolorektal kanserde üçüncü anahtar genetik adımdır. Tümörlerin çoğunda Tp53 geninin iki aleli de inaktive olmaktadır. Bu gendeki missense mutasyonlar genellikle p53’ün transkripsiyonel aktivitesini inaktive

ederken 17p delesyonu ikinci p53 gen alelini de elemine etmektedir (177). P53 geni hücre döngüsünde ve hücre ölümü kontrol noktalarında görev yapan ve pek çok hücrel stress ile aktive olan bir tümör baskılayıcı gendir. P53 inaktivasyonu sıklıkla geniş adenomdan invazif kansere geçişte etkin olmaktadır (176).

TGF- $\beta$  sinyalinin mutasyonel inaktivasyonu kolorektal karsinogenezde etkili olan bir diğer basamaktır (178). 18q delesyon erken adenomların %10-30'unda, geç adenomların %60'ında ve karsinomların %70'inde görülmekte olup bu bölgede TGF- $\beta$ 'nın hücrel mediyatörleri olan ve proliferasyon ve farklılaşmada görevli SMAD2 ve SMAD 4 bulunmaktadır. SMAD2 ve SMAD4 mutasyonları kolorektal kanserde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır (176,179).

#### **2.4.2.2. Mikrosatellit instabilite (MSI) yolağı**

Mutator ara yol olarak da bilinen mikrosatellit instabilite ara yolu (MSI), kolorektal kanserde genomik instabilitenin bir diğer şef mekanizmasıdır. DNA yanlış eşleşme tamir ("mismatch repair system, MMR") genlerindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bu yolak kolorektal karsinomların yaklaşık %20'sinde mutator fenotipe yol açmaktadır (172). Mikrosatellitler, genom boyunca yer alan kısa nükleotit tekrarlarıdır ve MSI bu tekrarların sayısındaki artma ve azalmalarla karakterizedir. Kromozomal instabilite yolağının aksine bu yolaktaki genlerde görülen genetik değişiklikler mikrosatellit dengesizliğine yol açan replikasyon hataları ile sonuçlanmaktadır (180). Hücre bölünmesinde replikasyon sırasında mikrosatellitlerin bulunduğu bölgelerde DNA polimeraz hata yapabilir. Normal şartlarda, DNA polimeraz 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi ile yanlış eşleşmeler düzeltilirken, onarımdan kaçabilen bu alanlar, yanlış eşleşme tamir sistemi aracılığıyla onarılır ve böylece DNA MMR genleri sayesinde replikasyon sürecinde genomik stabilizasyon sağlanır. Ancak MMR genlerinde bir mutasyon olması durumunda MSI olarak bilinen durum ortaya çıkar (172,181). MMR sisteminde görevli 7 gen bilinmektedir (hMLH1,hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 and hPMS2) (172).

Kolorektal tümörler, mikrosatellit instabilitesi açısından 3 grupta değerlendirilmektedir: mikrosatellit-stabil (MSS), yüksek mikrosatellit instabil (MSI-H) ve düşük mikrosatellit instabil (MSI-L). Herediter Non-Polipozis kolorektal kanser (HNPCC) tümörler'de MSI

karakteristik olmakla birlikte tüm sporadik olgularında %15'inde MSI görülmektedir. HNPCC tümörlerde germline MMR gene mutasyonları ve tümör dokusundaki yabancı tip alelin somatik inaktivasyonu sonucu gelişmektedir. Mutasyonların çoğu hMLH1 ve hMLH2 genlerinde gerçekleşmekle birlikte diğer genlerde de mutasyonlar bildirilmiştir (hMSH6,hPMS1,hPMS2) (182).

#### **2.4.2.3. CpG adacık metilasyon fenotip yolağı**

Epigenetik değişiklikler, DNA dizilerinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesinde ve fonksiyonunda oluşan stabil ve kalıtsal değişimlerdir. İnsanlarda epigenetik değişiklikler genellikle DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarını kapsamaktadır. DNA metilasyonu genellikle "CpG" adalarında meydana gelmekte olup "CpG" adaları, yüksek oranda guanin-sitozin ("guanine-cytosine: GC") dinukleotidleri içeren ve çoğunlukla genin promotor kısmında yer alan genom bölgeleridir. Bir genin promotor bölgesinin metilasyonu o genin susmasıyla sonuçlanmakla birlikte tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybına yönelik alternatif bir mekanizma sunmaktadır. CpG adacık metilasyon fenotip yolağı tümör baskılayıcı genlerin promotorlarının hiper metilasyonu sonucu susturulması gibi epigenetik dengesizlikle karakterizedir. APC, MCC, MLH1, MGMT gibi kolorektal karsinogenezde işlevi olan pek çok genin hiper metilasyon yolu ile ifadesinin susuturulduğu tespit edilmiştir. Bu yolak tüm kolorektal karsinomların yaklaşık %10-15'inde görülmektedir (161,183).

#### **2.4.3. Kolorektal kanserin patolojisi**

Bu bölümde kolorektal kanserin histopatolojisi, diferansiyasyon derecelendirmesi ve evrelendirilmesi üzerinde durulmuştur.

### **2.4.3.1. Kolorektal kanserin histopatolojisi**

Kolorektal karsinomların büyük çoğunluğu adenokarsinomdur (%90). Gland oluşturma yeteneği gösteren ve neoplastik epitel hücrelerden oluşan adenokarsinomlar gland oluşturma yeteneklerine göre farklı diferansiyasyon derecelerine sahip olmaktadır. Adenokarsinom dışında görülen diğer histolojik tipler; müsinöz adenokarsinoma, taşlı yüzük hücreli karsinoma, medüller karsinoma, “serrated” adenokarsinoma, kribriform-komodo tip adenokarsinoma, mikropapiller adenokarsinoma, adenoskuamöz karsinoma, iğsi hücreli karsinoma ve andifferansiye karsinomadır. Müsinöz adenokarsinomların tipik özellikleri ekstraselüler müsin sekresyonu yapan tümör hücrelerinin varlığıdır. Ayrıca ekstraselüler müsin alanları tümörün en az % 50’sini oluşturmaktadır. Bazı müsinöz adenokarsinomlarda taşlı yüzük hücreleri de bulunabilir. Taşlı yüzük hücreli karsinom ise intrasitoplazmik müsin varlığı ile karakterize olup müsin birikmesi çekirdeğin kenara itilmesine ve bu histolojik tiplerde özdeşleşmiş taşlı yüzük görünümü almasına neden olmaktadır (184,185).

### **2.4.3.2. Kolorektal karsinomlarda histolojik derecelendirme (Grade)**

Tümörlerin histolojik dereceleri; tümörün davranışının değerlendirilmesi, prognoz ve tedavi seçimi açısından önemlidir. Tümörlerin histolojik derecelendirilmesi, kanser malign durumu ve agresivliğinin bir ölçüsü olup tümör hücrelerinin organizasyonu ve normal epitel hücrelere olan benzerliklerine göre derecelendirilme yapılmaktadır. En popüler derecelendirme sistemi malignant duruma göre 4 noktada (G1-G4) değerlendirilmekte ve patolojik ölçüm genellikle hücresel diferansiyasyon seviyesi ile uyumludur. Tümörlerin derecelerinin artışı invazif özelliklerinin artışı ile koreledir (186).

G1: İyiferansiye

G2 :Orta diferansiye

G3 :Kötü-az diferansiye

G4 : İndiferansiye

Müsinöz adenokarsinomlar ve taşlı yüzük hücreli karsinomların tamamı “grade” 3 olarak kabul edilmektedir (184).



### 2.4.3.3.Kolorektal karsinomlarda evreleme (Stage)

Kanserin evrelendirilmesi, primer tümörün boyutuna, tutulan bölgesel lenf nodüllerinin yaygınlığına ve metastaz olup olmadığına dayanır.Kolorektal kanser evrelemesi için 3 farklı yöntem kullanılmaktadır: Dukes, Astra-Coller ve TNM sistemleri(184,185).

#### **Astra-coller sistemi:**

Evre A: Tümör mukozada sınırlı.

Evre B: Tümör submukozaya sınırlı, lenf bezi invazyonu yok.

Evre B2: Tümör kas tabakasına sınırlı, lenf bezi invazyonu yok.

Evre C1: Tümör barsak duvarını aşmadığı halde lenf bezi metastazı mevcut.

Evre C2: Tümör barsak duvarını aşmış ve lenf bezi metastazı mevcut.

#### **Dukes sistemi:**

Evre A: Tümör kolon duvarında sınırlı, muskularis propriayı aşmamış.

Evre B: Tümör tüm kolon duvarını tutup muskularis propriayı aşmış, kolonda serozayı, rektumda perirektal dokuyu invaze etmiştir. Lenf bezi tutulumu yok.

Evre C1: Bölgesel lenf bezlerinde metastaz yok.

Evre C2: Mezenterik kan damarları etrafındaki lenf bezlerinde metastaz mevcut.

#### **TNM Sistemi:**

**T** = Primer tümör, **N** = Bölgesel lenf düğümü tutulumu, **M** = Metastaz için kullanılır

**Evre 0:** Tis, N0, M0

**Evre 1:** T1, N0, M0 ve T2, N0, M0

**Evre 2:** T3, N0, M0 ve T4, N0, M0

**Evre 3:** Herhangi bir T, N1, M0 ve Herhangi bir T, N2, M0

**Evre 4:** Herhangi bir T, herhangi bir N, M1 olarak belirlenmiştir.

T=Primer tümör TX: Primer tümörü bilinmeyen, T0: Primer tümör yok, Tis: Karsinoma insitu, T1: Tümör submukozaya invaze, T2: Tümör muskularis propriaya invaze, T3: Tümör subseroza ya da nonperitonealize perikolik/perirektal dokuya invaze, T4: Tümör

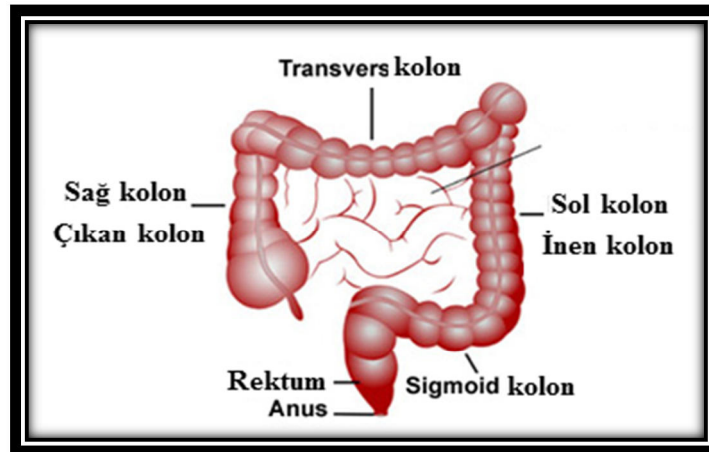
komşu organ ya da yapılara invazyon göstermekte ve/veya visseral peritonu perforasyon göstermektedir .

**N**= Bölgesel lenf bezleri **NX**: Bölgesel lenf bezleri değerlendirilememekte, **N0**: Lenf bezi metastazı yok, **N1**: 1-3 lenf bezi tutulumu mevcut, **N2**: 4 veya daha fazla lenf bezi tutulumu mevcut.

**M**=Uzak metastaz **MX**: Uzak metastaz değerlendirilememekte, **M0**: Uzak metastaz yok, **M1**: Uzak metastaz mevcut

#### 2.4.4.Kolorektal kanser ve lokalizasyonu

Kalın barsak proksimalde ileoçekal valfden başlayıp distalde anüse kadar uzanır ve yaklaşık olarak 150cm uzunluğundadır. Kolon; çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdan oluşmaktadır (Şekil 2.25.). Duodenum önünden geçen dikey bir planla sağ ve sol kolon olmak üzere ikiye ayrılır. Sağ kolon; çekum, çıkan kolon ve transvers kolonu kapsarken, sol kolon; inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdan oluşmaktadır. Sağ kolon soldan daha geniş çaplıdır ve çekum en geniş kalibrasyona sahiptir (187,188).



Şekil 2. 25. Kolon anatomisi

Sağ ve sol yerleşimli kanserler klinik, epidemiyolojik ve hislojik açıdan farklılıklar sergilemektedir (89). Sağ kolon yerleşimli kanserler daha müsinöz histolojili, yüksek MSI, CpG adacık metilasyonu daha sık görülürken; sol kolon yerleşimli tümörlerde CIN ve

anöplodi daha sık görülmektedir (190). İnsidans açısından ise sol kolon yerleşimli kanserler % 60-70 oranıyla sağ kolon yerleşimlilere göre daha sık görülmektedir (188). Tümör örneklerinin analizi ayrıca sağ ve sol kolon yerleşimli kanserlerin gen ifade profillerinin de farklı olduğunu gösterilmiştir (191,192). Bununla birlikte bu biyolojik farklılığın çözümlenmesi gereken pek çok noktası bulunmaktadır.

#### **2.4.5. Kolorektal kansere genomik ve transkriptomik bakış**

İnsan karsinogenezlerinde en iyi modellenmiş sistemlerden biri olan kolorektal kanserde tümör başlangıcı ve ilerlemesi çoklu genetik değişiklik varlığında gerçekleşmektedir. Bu modelde etkili temel faktörlerin bilinmesine rağmen hastalığın kompleks ve heterojen yapısı hastalığın kapsamlı hikayesinde çözülmesi gereken pek çok başlık ve parametrenin olduğunu göstermektedir. Bu noktada en büyük sorun karmaşıklığı tanımlayan bilgilerin entegre edilmesidir ki bu durum hastalığın mekanizmasının anlaşılmasının yanında ilerlemesi ve tedavi uygulamalarına da önemli bilgiler sunacaktır. Omik teknolojilerin gelişi ile birlikte bu alanda önemli adımlar atılmış olup beklentiler de artmıştır. Omik yaklaşımlar içinde temel olarak genomik, transkriptomik, proteomik ve epigenomik olmak üzere 4 temel başlık dikkat çekmekte olup bunlar içinde genomik ve transkriptomik uygun metodolojilerinde varlığıyla çalışmada ön plana çıkmıştır (193). Bu noktada en çok çalışılan kanserlerden biri olan kolorektal kanserde de genomik ve transkriptomik profil analizleri mevcut olup bu bölümde tez kapsamında da olan bu iki başlık çerçevesinde değerlendirmeler sunulmuştur.

##### **2.4.5.1. Kolorektal kanserin gen ifade profili**

Kolorektal kanser aşağıda belirtilen sebeplerden ötürü mikrodizin çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

1. KRK tümörigenezinde biyolojik bir modeldir. Adenomadan erken evre ve ileri evre karsinomaya kadar klinik ilerlemede paralel farklı moleküler değişiklikler görülmektedir.

2. Geleneksel klinik ve patolojik parametreler yüksek ve düşük risk KKK'leri birbirinden ayırmak için her zaman yeterli olmamakta ve prognostik değeri olan valide edilmiş moleküler belirteçler bulunmamaktadır.
3. Klinkte kullanılan ilaçlar için tedaviye yanıt ile ilgili tartışmalar devam etmektedir.

Bu kapsam dorultusunda çalışmaları genel olarak:

1. Karsinogenezis prosesi
2. Moleküler sınıflandırma ve prognostik moleküler belirteç keşfi
3. Tedaviye yöenlik çalışmalar (ilaç yanıtı, yeni hedefler) şeklinde sınıflandırabiliriz (194).

1999 yılında Alon ve arkadaşları ilk defa genom ebadında oligonükleotit mikrodizinlerle kolorektal kanserde gen ifade çalışması gerçekleştirmiş olup tespit ettikleri 2000 gen ile kolorektal tümör ile normal kolonik dokunun açık bir şekilde ayrıldığını kümeleme analizi ile göstermişlerdir (195.) Notterman ve arkadaşları tümör-normal karşılaştırması kapsamında adenoma, adenokarsinoma ve eşli normalleri arasında gerçekleştirdikleri analizde 4-10 kat değişimi ile 4000 farklı olarak ifade edilen gen belirlemişlerdir. Sonuçta global gen ifade profillemesinin solid tümörlerin moleküler sınıflandırmasında önemli bir araç olduğunu belirtmişlerdir (196). Metastaz gelişiminin altında yatan moleküler modifikasyonlara açıklık getirebilmek adına primer tümörler ve karşılığı metastazları arasında gen ifade profilleri yine pek çok çalışmada karşılaştırılmıştır (197-199). Agrawal ve arkadaşları tespit ettikleri farklı ifade edilen genler arasında osteopontin geninin bu proses için aday bir gen olduğunu belirtmiş olup bu genin ifadesini normal ve adenomalarda tespit edemezken invazif kanser, metastatik primer tümör ve karaciğer metastazlarında normal ve adonamlara göre 10-20 kat artmış olduğunu tespit etmişlerdir ve bu genin klinik kullanımda aday bir tümör belirteci olabileceğine vurgu yapmışlardır (197). Yine pek çok çalışmada kolorektal kanserde metastazın ilerlemesinde bazı genlerin önemli rol oynadığı tespit edilmiş olup özellikle hücre proliferasyonu, invazyon, adezyon ve doku yeniden modellenmesinde görevli genlerin bu prosesde etkin olduğu belirtilmektedir (194,198,199). Tümör-kontrol karşılaştırmasında birbirinen bağımsız yapılan çalışmalarda tümör başlangıcı ve ilerlemesi ile ilgili olarak genellikle hücre proliferasyonu, metabolizma, hücre adezyonu, hücre iletişimi, hücre döngüsü ve apoptozis gibi ana

fonksiyonel kategorilerdeki genler tanımlanmıştır. Bağımsız çalışmalarda örtüşen genlere örnek vermek gerekirse; TGF- $\beta$  ligandı TGF $\beta$ 1, transkripsiyon faktörü SOX4, KLF4, RAS aile üyelerinden RAN, HRASLS3 ve yine hücre döngüyle ilgili pek çok gen (CCNB1, CCNB2, CDC25B, PCNA) en çok karşılaşılan genler arasında yer almaktadır (66). Chan ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınladıkları tümör vs normal, adenoma vs normal ve cancer vs adenoma karşılaştırmalarını içeren toplam 25 bağımsız çalışma üzerinden gerçekleştirdikleri meta analiz bizlere bu alanda önemli sonuçlar sunmaktadır (Çizelge 2.2 ve 2.3.). Gerçekleştirilen bu meta analiz ile çalışmalarda en sık ve ortak rapor edilen genler belirlenmiş olup çalışmada tespit edilen bu genlerin kolorektal kanser için yüksek duyarlılıkta ve spesifikte biyobelirteç tanımlamada oldukça yardımcı olacağını belirtmişlerdir (200).

**Çizelge 2.2. Tümör vs kontrol karşılaştırması yapan çalışmalarda en çok rapor edilen ifadesinde artma görülen genler (Chan 2008'den alıntıdır)**

Gene name	Description	Total sample sizes	Mean fold change	Range	Validation
<i>TGFβ1</i>	Transforming growth factor-β induced, 68 kDa	369	8.94	1.11-32.00	RT-PCR (8, 19, 51, 54, 57)
<i>IFITM1</i>	IFN-induced transmembrane protein 1 (9-27)	351	7.52	3.00-12.00	RT-PCR (51, 57)
<i>MYC</i>	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue (avian)	329	5.02	1.69-7.50	RT-PCR (6, 51, 54, 58)
<i>SPARC</i>	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	244	6.30	1.27-15.00	Immunohistochemistry (39)*
<i>GDF15</i>	Growth differentiation factor 15	230	7.42	1.58-12.20	RT-PCR (19, 5)
Six studies: greatest sample size					
<i>CXCL1</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth-stimulating activity, α)	287	6.54	2.74-10.50	RT-PCR (18, 2)
Six studies: moderate sample size					
<i>CDC25B</i>	Cell division cycle 25 homologue B (Schizosaccharomyces pombe)	256	4.93	1.81-9.20	RT-PCR (17)
<i>HMBG1</i>	High-mobility group box 1	264	3.27	2.66-3.91	Western blot, immunohistochemistry (61)
Six studies: lowest sample size					
<i>IFITM2</i>	IFN-induced transmembrane protein 2 (1-8D)	141	7.09	3.00-13.00	RT-PCR (32)
<i>COL1A2</i>	Collagen, type I, α2	172	6.93	2.96-12.00	None found
Five studies: greatest sample size					
<i>CKS2</i>	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	285	4.21	1.79-7.20	RT-PCR (17, 5)
<i>TOP2A</i>	Topoisomerase (DNA) IIα, 170 kDa	277	3.61	1.05-5.60	Northern blot, Western blot (62)
<i>UBE2C</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	274	3.03	1.48-5.00	RT-PCR (63)
Five studies: moderate sample size					
<i>CDH3</i>	Cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	194	18.16	2.78-74.00	Western blot (64)
<i>INHBA</i>	Inhibin, βA (activin A, activin AB α polypeptide)	198	11.05	1.71-37.00	RT-PCR (65)
<i>SLC12A2</i>	Solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	208	10.58	3.58-15.15	RT-PCR (54)
<i>MMP11</i>	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	208	4.22	1.74-5.70	Western blot, immunohistochemistry (66)
<i>CSE1L</i>	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	207	3.74	1.14-5.00	None found
<i>HNRPA1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	243	2.89	1.01-4.50	RT-PCR (67)
Five studies: lowest sample size					
<i>CDK10</i>	Cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 10	150	13.85	2.66-17.59	None found
<i>COL3A1</i>	Collagen, type III, α1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)	178	4.31	1.24-9.38	RT-PCR (53)
<i>COL4A1</i>	Collagen, type IV, α1	168	2.70	1.05-4.00	None found

**Çizelge 2.3. Tümör vs kontrol karşılaştırması yapan çalışmalarda en çok rapor edilen ifadesinde azalma görülen genler (Chan 2008'den alınıdır )**

Gene name	Description	Total sample sizes	Mean fold change	Range	Validation
CA2	Carbonic anhydrase II	474	-15.51	-56.00 to -2.30	RT-PCR (53, 58)
MALL	Mal, T-cell differentiation protein-like	244	-5.34	-10.50 to -1.70	None found
CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	222	-10.40	-40.00 to -1.38	RT-PCR (17, 58)
Six studies: greatest sample size HSD11B2	Hydroxysteroid (11- $\beta$ ) dehydrogenase 2	224	-4.47	-7.60 to -2.23	Northern blot (68)
Six studies: moderate sample size SLC26A2	Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	190	-6.78	-9.09 to -4.04	None found
FCGBP	Fc fragment of IgG-binding protein	215	-4.88	-7.00 to -1.31	None found
Six studies: lowest sample size ACADS	Acyl-coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	168	-7.11	-20.00 to -2.00	None found
CKB	Creatine kinase, brain	188	-3.11	-5.00 to -1.10	Western blot (69)
Five studies: greatest sample size CLU	Clusterin	178	-3.83	-5.60 to -1.10	Immunohistochemistry (70)
CES2	Carboxylesterase 2 (intestine, liver)	186	-3.58	-6.30 to -1.15	None found
Five studies: moderate sample size CA1	Carbonic anhydrase I	146	-36.90	-59.00 to -5.30	RT-PCR (57)
GPA33	Glycoprotein A33 (transmembrane)	131	-12.51	-32.50 to -1.70	None found
KRT20	Keratin 20	176	-8.31	-20.40 to -1.65	None found
SELENBP1	Selenium-binding protein 1	154	-2.80	-3.45 to -1.11	Western blot, immunohistochemistry, mass spectrometry (71)
Five studies: lowest sample size CA12	Carbonic anhydrase XII	126	-4.41	-7.69 to -2.50	Immunohistochemistry (25)*
FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver	116	-4.28	-5.56 to -3.00	RT-PCR (57)

Kolorektal kanserde mikrodizin gen ifade profilinin çalışıldığı bir diğer tema da sınıflandırma ya da prognoz tahminidir. Barrier ve arkadaşları yüksek ve düşük riskli hastaları ayırmak için tümör ve normal örnekler arasında bir prognostik patern tanımlamak adına evre II ve III hastalar ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında tümör temelli 30 prediktör gen ve normal temelli 70 gen tespit etmişlerdir ve daha sonra bağımsız çalışmalarla bu sonuçlar valide edilmiştir (201). Mikrodizin gen ifade profili kolorektal kanserde

diyagnostik amaçlı olarak da yaygın kullanılmaktadır. Bu temalı çalışmalardan bir tanesi de Del Rio ve arkadaşlarının leucovorin, fluorouracil ve irinotecan (FOLFIRI) 'ne yanıt tahmini için ekspresyon paterni tanımlamak amacıyla 21 ileri kolorektal kanser dokusunda gen ifade profilini çıkardıkları çalışmalarında yanıt veren ve vermeyen hastalar arasında 14 farklı olarak ifade edilen gen tespit etmişlerdir (202).

Kolorektal kanser, özellikle henüz tam anlaşılmayan moleküler alt yapı, moleküler alt tiplere olan ihtiyaç, tanı ve tedavide kullanılabilecek biyobelirteçler gibi pek çok başlık altında moleküler biyoloji ve genetik alanında sık çalışılan bir kanser türüdür. Bu noktaların çözümünde; tümör oluşması ve ilerlemesi, prognostik ve prediktif değeri olan gen imzası ve tabiki yeni tümör hedeflerinin tespiti gibi önemli sonuçlar içeren global gen ifade çalışma örnekleri mevcuttur. Ancak klinikte değerlendirilebilmeleri için zamana ihtiyaç olduğu ve daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmektedir (194).

#### **2.4.5.2.Kolorektal kanserin genomik profili**

Gen ekspresyon profillemesine ilaveten karmaşık genomun analizine imkan veren ve oldukça teknolojik ilerlemeler kaydeden bir diğer önemli yüksek işlem hacimli yaklaşım aCGH'dir. Bu metod bize tümör başlangıç ve ilerlemesinde etkin tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin ifadelerinde değişikliklere neden olan kopya sayısı değişikliklerinin (kayıp/kazanç) genom ebadında yüksek çözünürlüklü analizine imkan tanımaktadır. Kolorektal kanserin normal hücrelerden adım adım ilerleyen farklı genetik değişikliklerle geliştiği; kopya sayısı değişikliklerinin ve anöploidilerin de bu değişiklikler arasında yer aldığı bilinmektedir. Bununla birlikte anöploidiler adenoma-karsinoma sekansında oldukça erken evrelerde görülmektedir (66). Konvansiyonel CGH ile gerçekleştirilmiş pek çok kolorektal kanser çalışması mevcuttur. Toplamda 859 kanser örneğini içeren bu çalışmaların kapsamlı bir meta analizi ile tümör gelişiminde, ilerlemesinde ve tümör evrelerinde etkin kayıp ve kazançlar tanımlanmıştır (203). Genel olarak kanserin erken evresinde kromozom 17p ve 18 de kayıplar görülürken, kromozom 8q, 13q ve 20'de kazançlar görülmektedir. Bununla birlikte primer karsinomadan lokal distal metastaza geçişte kromozom 4p ve 8p'de kayıp; kromozom 7p ve 17q'da ise kazanç tespit edilmiştir. Kromozom 4q kaybı ve 1q, 11, 12p, ve 19 kazancı ise kanserin ileri evreleriyle ilişkilendirilmiştir (203). Kolorektal kanserde aCGH ile gerçekleştirilen ilk



çalışmalar 2004 yılında yayınlanan ve primer tümör ve hücre kültürü ile yapılan 2 bağımsız çalışma ile kendini göstermiştir. Nakao ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği ilk çalışmada 123 primer kolorektal kanser örneği değerlendirilmiştir. Bu çalışmada genomun toplamda %17.3'nde değişiklik saptanırken; kromozom 8p, 17p, 18p ve 18q'da kayıp 8q ve 20q'da kazanç olduğu rapor edilmiştir (204). İkinci çalışmada ise CIN/MSI durumlarına göre sınıflandırılmış primer tümörler ve hücre hatları çalışılmış olup; Nakao ve arkadaşlarının çalışmalarıyla kısmen de olsa benzer sonuçlar bulunmuştur. Bu çalışmada kromozom 20,13 ve 8q ve daha küçük bir bölge 17q11-q12'de kazanç, 18q ve 4q34-q35'de ise kayıp olduğu tespit edilmiştir (204). Yine Hughes ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri meta analizde ve verileri havuzlayarak yeniden analiz ettikleri çalışmalarında 20, 13q, 8q and 7p 'de kazanç; 18, 17p, 8p ve 4p'de kayıp gibi daha önce tespit edilen değişikliklerin yanında yeniden analiz sonucunda ise daha az sıklıkla olmakla birlikte 1q ve 3'de kazanç; 6q, 9p ve 21q.'da anlamlı kayıplar tespit edilmiştir (204).

#### **2.4.5.3 Kolorektal kanser genomik ve transkriptomik entegrasyon çalışmaları ve önemi**

Genomik ve gen ifade verilerinin entegrasyonu ayrı ayrı etkilerinin yanında iki verinin korele olduğu gen veya gen gruplarının tanımlanması ile tümörigenezis, yeni onkogen veya tümör baskılayıcı gen tanımlama, kanser altgrupları oluşturma gibi pek çok kapsamda elde edilen önemli veriler ışığında değerlendirme yapma imkanı yaratacaktır. Bununla birlikte DNA ve RNA seviyesinde genetik imza analizi tek başlarına değerlendirilmelerinden çok daha kuvvetli bir moleküler şemanın oluşturulması ile sonuçlanacaktır (11,66). Kolorektal kanserde sayısı az olmakla birlikte genomik ve transkriptomik veri entegrasyonunun yapıldığı çalışma örnekleri mevcuttur (66, 205-210).

Son çalışmalardan birisi Berg ve arkadaşlarının 2010 yılında MSS stabil 2 yaş grubu (20 yaş-70 yaş) örnekli hastalarda gerçekleştirdikleri çalışmadır. Erken yaşta hastalık başlangıcı olan hastalarda daha sık olarak 2q35, 10q21.3-22.1, 10q22.3 ve 19q13.2-13.31 bölgelerinde kazanç 1p31.3, 1q21.1, 2q21.2, 4p16.1-q28.3, 10p11.1 ve 19p12 bölgelerinde kayıp tespit edilmiş olup bu bölgelerin toplamda 500'den fazla gen içerdiği belirtilmiştir. Bu bölgelerle gen ifade çalışmalarının entegrasyonu sonucunda 107 gene ulaşılmış olup CLC, EIF4E, LTBP4, PLA2G12A, PPAT, RG9MTD2 ve ZNF574 genlerinin ifaderinde en çok

değişim olan genler olduğu bildirilmiştir (209). 2013 yılında Loo ve arkadaşlarının MSS stabil ve CpG adacık metilasyon fenotip (CIMP)-negatif 40 kolorektal tümörlü ve eşli normal örnekleri ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında %25 sıklıkla 1q, 7p, 7q, 8p12-11, 8q, 12p13, 13q, 20p, 20q, Xp, ve Xq bölgelerinde kazanç; 1p36, 1p31, 1p21, 4p15-12, 4q12-35, 5q21-22, 6q26, 8p, 14q, 15q11-12, 17p, 18p, 18q, 21q21-22, ve 22q bölgelerinde ise kayıp olduğu tespit edilmiş olup bu bölgelerde anlamlı 356 genin farklı olarak ifade edildiğini belirtmektedirler ( $P < 0.0001$  ve  $\pm 1.5$ -kat değişimi). Yine bu çalışmada gen ontoloji ve yolak analizlerinde tespit edilen genlerin daha çok hücre döngüsü, hücre ölümü ve metabolizma ile ilgili olduğu ifade edilmektedir. Tümör örneklerinde %70 sıklıkla görülen 20q11-20q13 amplikonunun AHCY, POFUT1, RPN2, TH1L ve PRPF6 gibi pek çok kanser ilişkili gen içerdiği vurgulanmıştır (210).

İyi tanımlanmış olgulardan elde edilen entegre edilmiş omik ve epidemiyolojik veriler; genetik değişiklikler, çevresel etki ve spesifik klinik fenotip ilişkisini ve kanser biyolojisini daha iyi anlamamıza yardımcı olmaktadır. Çok genli çok adımlı doğası ile kompleks ve heterojen profile sahip kanser hastalığında tek tek komponentleri çalışmak kanserin karmaşık resminin çözümünde etkili bir yol olmayacaktır. Omik yaklaşımlar ve bu yaklaşımların kendi içlerinde kombinlenerek gerçekleştirilen çalışmalar bu karmaşık resmin çözümünde daha etkili olacağı düşünülmektedir. Kanser ve sahip olduğu karmaşık hikayenin başlıklarının iyi anlaşılmasında doğru analiz ve değerlendirmeler büyük önem arz etmektedir (25, 26, 66).

### 3.GEREKÇE VE AMAÇ

Kanser, belirli genlerde oluşan mutasyonlar sonucu veya gen ifadesinin miktarında ve zamanlanmasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan, hücresel seviyedeki genetik bir bozukluktur. Hastalığın gelişimi ise çeşitli genetik değişikliklerin etkisiyle bir çok faktörün etkisi altında çok basamaklı bir süreci kapsamaktadır. Tekli nükleotid polimorfizmleri (TNP) ve nokta mutasyonları gibi küçük ölçekli değişimler veya kromozom kazanımı ya da kaybı, kromozomun yeniden düzenlenmesi ve kromozomlardaki yapısal anomaliler gibi büyük ölçekli değişiklikler yanında çeşitli genlerin bozulmuş ifadeleri kanser oluşum sürecindeki kritik noktaları oluşturmaktadır. Bu bağlamda genomik değişiklikler ile genetik yatkınlığa neden olan genlerin tanımlanması, hastalığın teşhis ve tedavisine doğrudan yansiyacak verileri açığa çıkaracak olması açısından büyük önem arz etmektedir.

Son yılların en yaygın kullanılan moleküler belirteçi olan tekli nükleotid polimorfizmlerinin (TNP) genomdaki yüksek rezolüsyonlarının etkisi TNP'lerin mikrodizin platformlarına taşınmasıyla kendini göstermiştir. TNP mikrodizinler yüksek rezolüsyonları ile hem bağlantı ve asosiyasyon analizlerinde hem de kromozomlardaki yapısal değişikliklerin saptanmasına izin veren karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (*Comparative Genomic Hybridization*, CGH) uygulamalarında kullanılabilir. Bu kapsamda genom ebadındaki yüksek işlem hacimli araştırma imkanı veren mikrodizin teknolojisi ile aynı anda genomik ve transkriptomik boyutta çalışma imkanı sağlanmış olup önemli sayıda veri toplanması da mümkün kılınmıştır. Bu çerçevede mikrodizin teknolojisi DNA ve RNA bazlı olarak yanıtlanması gerekli sorulara kaynaklık eden hastalık, duyarlılık, direnç ve benzeri pek çok durumdan sorumlu bozuklukların ve farklılıkların tespitinde kullanışlı bir araç olarak ön plana çıkmaktadır.

Kolorektal kanserlerin altında yatan genetik temellerin anlaşılması hastalığın erken tanı, teşhis ve tedavisine yansımaları açısından önem arz etmektedir. Bu çerçevede yapılan çalışmalarda kolorektal kanserde gözlenen moleküler değişimler hem sitogenetik hem de genetik olarak tespit edilmiştir. Kromozomal kayıplar/kazançlar, mikrosatellit instabilitesi, mutasyonlar ve ekspresyon değişimleri başlıkları altında toplanacak olan bu moleküler

değişimler kolorektal kanserlerin çözümü zor karmaşık resminin anlaşılmasına önemli ölçüde katkı sağlamıştır. **Ancak yapılan çalışmalar çoğunlukla tek gen düzeyinde kalırken; genom boyu yapılan çalışmaların çoğu genomik ya da transkriptomik olarak tek boyutta değerlendirilmiş olup çok az sayıda entegre çalışma mevcuttur.**

Nakao ve arkadaşlarının kolorektal kanser vakalarında gerçekleştirdikleri bir çalışmada aCGH analiz ile çalıştıkları örnekler üzerinden tüm genomun %17,3'ünde kopya sayısı değişimlerine rastladıklarını ifade etmişlerdir (211). 77 sporadik kolorektal kanser olgularında BAC klonlar aracılığı ile gerçekleştirilen aCGH çalışmasında DNA kopya sayısı değişikliği ve metastatik durumu hakkında ilişki aranmış olup 11q13.3 11q22.3 ve Xp kromozomal bölgelerindeki kopya sayısı artışı ile nod metastazı arasında önemli bir bağlantı saptanmıştır (212). Kromozomal instabilite ve mikrosatellit instabilitesi olan sporadik kolorektal kanser vakalarında gerçekleştirilen bir diğer çalışmada uygulanan aCGH çalışması ile 287 adet hedef sekans tespit edilmiş olup pek çok kromozomda, önemli genlerde kayıp ve kazanç olduğu belirtilmiştir (118). 6,800 bilinen gen ve 35,000 EST (expressed sequence tags)'in tanımlandığı bir çalışmada kolorektal kanserin oligonükleotid mikrodizinler aracılığı ile ifade profili çıkarılmış olup; metabolizma, transkripsiyon, translasyon ve hücresel proseslerde görev alan pek çok genin ifade düzeyinde değişiklik saptanmıştır (192). Kim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sporadik kolorektal kanserli olgularda tümör büyümesi ve gelişiminde etkin rol oynayabileceği düşünülen 7 aday yeni geni içeren 47 adet farklı ifade düzeyi sergileyen gen tanımlanmıştır (213). 2 farklı dereceden 36 sporadik kolorektal hastasından alınan örneklerle yürütülen bir genom boyu ifade analizi araştırmasında yapılan analizler sonucu GSTP2 (GSTP-binding elongation factor) ve bir transkripsiyon faktörü olan HOXA9 genlerinin ifade düzeylerinde en farklı değişimin görüldüğünü saptamışlardır (214). İfadesi azalan (Down-regüle) BMP2 ve ANPEP yanında ifadesi artan (up-regüle) TKT, SPARC, MCM5 gibi yeni hedef genlerin tespit edildiğini belirten bir çalışmada invazif kolorektal kanser hasta tümör hücre örnekleri ve normal kolon epitel hücreleri arasındaki transkriptom profilleri karşılaştırılmıştır (215).

Bu ve benzeri çalışmalar sonucunda hastalığın sitogenetik ve genetik profillerine ait oldukça önemli veriler elde edilmiştir. Ancak yapılan çalışmalar genellikle **tek boyutta kalıp** hastalık oluşum ve ilerleme sürecinde meydana gelen değişimleri açıklamada,

doğrudan tespiti imkanı veren hedef noktaların belirlenmesinde değerlendirilebilecek bütünlüğe sahip değildir. **Bu çalışmalar tek başlarına önemli olabilecek veriler elde etmeleri yanında tespit edilen genlerin veya kromozomal bölgelerin hastalığın moleküler karakterizasyonunda, daha spesifik alt gruplara ayrılmasında ve birer biyobelirteç olarak tanımlanabilmesinde kullanılabilmesi için entegre çalışmalar yapılması gerektiği belirtilmektedir (64, 65, 152, 154, 155, 158).**

Sporadik kolorektal kanserde entegre çalışma görüntüsü veren tek bir çalışma mevcuttur. Lagerstedt ve arkadaşlarının 64 sporadik kolorektal kanser vakasının genomik ve transkriptomik profilini entegre olarak değerlendirmeye çalıştıkları bu araştırmalarının gerek deney tasarımı gerekse veri entegrasyon aşamalarında önemli sıkıntılar görülmektedir. 64 vaka (süpervize olarak) 2 ayrı gruba ayrılmış olup bu iki gruptan biri sağkalım diğeri ise tümör derecelerine göre alt gruplara bölünmüş ve vaka sayısı böylelikle aCGH çalışmalarında gerek deney dizaynı gerekse veri analizi için gerekli görülen rakamın altında kalmıştır. Bu durum çalışmanın istatistiksel gücüne gölge düşürmektedir (97). Ayrıca çalışmada kullanılmış olan örneklerin *fresh frozen* olması yani tümör ve prekanser lezyonlarının, stromal ve enflamatuar gibi pek çok normal hücre barındırdığı heterojen hücre popülasyonu olduğu ve kanser hücrelerinin disseksiyon ile ayrılmadığı dikkate alındığında sonuçların, kanser hücresinin gerçek profilini ne kadar yansıttığı soru işaretleri taşımaktadır. aCGH analizleri rezolusyonu **46 kb** BAC klonları ile gerçekleştirilmiştir ki daha önceki başlıklar altında değerlendirildiği gibi *BAC array*'lerin kopya sayısı değişikliği analizi için çözünürlükleri oldukça düşüktür. Bu durumda hastalığın oluşum ve ilerlemesinde etkin rol oynayabilecek daha küçük boyuttaki kopya sayısı değişimlerinin kaçırılma ihtimali de yüksektir. aCGH çalışmasında araştırmacının finansal problemini aşmak üzere örnekler havuzlanmıştır ("pooled"). Verilen havuzlama şemasında örnekler hayatta kalım durumları ve tümör tiplerine göre gruplandırılarak havuzlanmış ve toplam 6 mikrodizin ile hibridize edilmiştir. Her bir havuzda kaç vaka olduğu, vakaların hepsinin dahil olup olmadığı belirtilmemiştir (216). Ayrıca örnek havuzlama her ne kadar başvurulan bir yaklaşım olsada veri analizi boyutunda oluşan geri plan gürültüsü nedeniyle pek çok soruyu da beraberinde getirmektedir (217). Ekspresyon analizinde ise 3 vaka tek tek mikrodizine hibridize edilirken (hangi 3 vaka olduğu belirtilmemiş) 6 vaka havuzlanarak array analizine tabi tutulmuştur (216). Anılan çalışmada ilginç olan husus materyal metod kısmında zikredilen **ifade analiz çalışmasının sonuçlarına ne bulgular**

**ne de tatışma kısmında değinilmemiş olmasıdır. Bu nedenle bu çalışmanın entegre bir çalışma olarak değerlendirilmesi mümkün değildir.**

Entegre çalışmaların öneminin ortaya konduğu noktada **entegre** yaklaşımı altında bu tez çalışması ile dünyada en yaygın görülen kanser tiplerinden biri olan kolorektal kanser vakalarının %90'ını oluşturan sporadik vakalarda; kanserin tetiklenmesinde, oluşmasında ve ilerlemesinde etkin olabilecek yapısal değişiklikler ve global gen ifade farklılıklarını değerlendiren bu tez çalışmasının amaçları aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

**1. Sporadik kolorektal kanserli vakaların tümör materyalleri ve normal dokularındaki kopya sayısı değişimlerinin belirlenerek kanser oluşumu ve gelişiminde etken olan ve tümörlerin biyolojik ve klinik davranışlarında etkin rol alan yapısal değişikliklerin belirlenmesi**

**2. Sporadik kolorektal kanserli vakaların mikrodisseksiyon ile ayrılmış tümör ve normal hücrelerinden elde edilecek olan transkriptom profilleri kıyaslanarak, ifade düzeyi normale göre değişen genlerin tespiti ile kanser oluşum ve gelişimine etken olan genlerin belirlenmesi ve tümör alt grupları ile ilişkilendirilebilirliğinin analizi**

**3. DNA kopya sayısı ve ifade profil analizlerinin entegrasyonu ve yeni moleküler belirteçlerin tanımlanması**

Bu tez kapsamında genetik ve gen ifade verilerinin entegrasyonu ayrı ayrı etkilerinin yanında iki verinin korele olduğu gen veya gen gruplarının tanımlanması ile tümörigenezis, yeni onkogen veya tümör baskılayıcı gen tanımlama, kanser altgrupları oluşturma gibi pek çok kapsamda elde edilen önemli veriler ışığında değerlendirme yapılma imkanı yaratacaktır. Bu bilgiler ayrıca kanser için moleküler belirteç tanımlanması ve yeni tedavi stratejileri geliştirmede kullanışlı olacaktır. Bununla birlikte DNA ve RNA seviyesinde genetik imza analizi tek başlarına değerlendirilmelerinden çok daha kuvvetli bir moleküler şemasının oluşturulması ile sonuçlanacaktır. Bu çalışmada verilerinin bir araya getirilmesiyle yapılacak olan meta analiz ile kanserin oluş mekanizmasından, gelişiminden

sorumlu gen veya gen gruplarının tanımlanmasının yanısıra doğru tedavi yaklaşımları bulunmasına imkan tanıyacak hedef genler tanımlanması amaçlanmıştır. Zira hedefe yönelik tedavilerin gelişimi tümörlerin doğru ve kesin olarak sınıflandırılmasına bağlıdır. Değişen genlerin ve genetik anomalilerin dikkate alınarak genlerin tam kataloğunun çıkartılması ile tümörlerin genetik altyapılarına göre sınıflandırılması bu noktada primer hedef olarak çalışmalarda birinci sırada yer almaktadır. Etkili teşhis ve tedavi seçenekleri geliştirilmesinin pahalı ve uzun süreli pek çok basamak içeren bir süreç olduğu göz önünde bulundurulduğunda hedef validasyonunda doğru bilgilerin kullanımının bu prosesinde hem ekonomik açıdan hem de güvenilirlik açısından önemi dikkatten kaçmamalıdır

## 4.1.MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1.MATERYAL

Bu tez çalışmasına, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı parafin doku arşivinden,ailesinde (birinci derece akrabalarında) kanser hikayesi bulunmayan kolorektal karsinom hastalarına ait rezeksiyon materyalleri dahil edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında konvansiyonel adenokarsinom ile müsinözve taşlı yüzük hücreli adenokarsinomlarınformalinle fiksasyonu (sabitleme) yapıp parafine yerleştirilen (Formalin-Fixed Paraffin Embedded = FFPE) materyallerinden oluşan **toplam 50kolorektal karsinom** çalışmaya dahil edilmiştir (Şekil 3.1). Çalışmaya dahil edilen tümör örnekleri için belirli bir diferansiasyon derecesi dikkate alınmamış olup grade I-III kapsamında ilgili kriterlerdeki tüm kolorektal karsinomlar dahil edilmiştir. Tümör örneklerindeki tümör hücre içeriği > % 90 dır.

Tez çalışması kapsamında kontrol örnekleri olarak toplanan 50 kolorektal karsinomun kendi normal hücreleri(match-paired=eşli çiftler=toplam 100 örnek) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan normal hücreler cerrahi sınırın dışında tümöre en uzak hücrelerden seçilmiştir.

Tez çalışması kapsamında kullanılan örneklere ait demografik ve histolojik veriler çizelge4.1.'de sunulmuştur.



**Çizelge 4. 1. Tez çalışmasında kullanılan örneklere ait demografik ve histolojik veriler**

Kriter	Hasta (n=50)	Yüzde (%)
<u>Yaş (ortalama)</u>	45.28	
<u>Cinsiyet</u>		
Kadın	22	44
Erkek	28	56
<u>Grade</u>		
Grade I	3	6
Grade II	27	54
Grade III	20	40
<u>Tümör Lokalizasyonu</u>		
Sol Kolon	38	76
Sağ Kolon	12	24

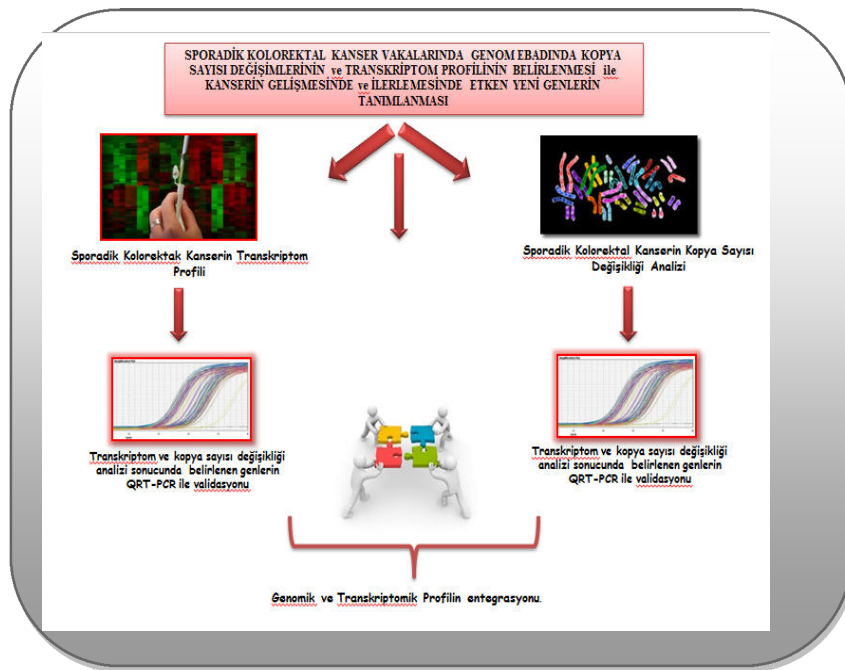
Elde edilecek sonuçlarla birlikte değerlendirilmek üzere çalışmaya dahil edilen olguların yaş, cinsiyet, yaşadıkları bölge gibi parametreler açısından gerekli bilgileri de toplanmıştır. Bu çalışma için etik kurul onayı ve FFPE doku örnekleri alınan bireylerden bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

## 4.2. Yöntem

### 4.2.1. Tez çalışmasında kullanılan yöntemlerin özeti

Bu tez çalışmasında olgulara ait hematoksilin-eozin (H&E) boyalı patoloji arşiv preparatları yeniden değerlendirilerek gruplandırılmıştır. Histopatolojik değerlendirme sonrasında çalışılacak örneklere ait tümör ve normal kolon preparatları için ayrı ayrı seçilen H&E boyalı lamalar üzerinde tümörlü ve normal hücrelerin bulunduğu alanlar, uzman patoloğ tarafından belirlenmiştir. Normal örnekler, kolorektal karsinomlu olgunun ayrı olarak arşivlenen normal kolon dokusunun bloklarından elde edilmiştir. H&E boyalı lamalar izlenerek olguya ait parafin bloklardan 8 µm boyasız kesitler hazırlanmış ve manuel mikrodiseksiyon yöntemiyle hücrelerin ayrıştırmasının ardından ayrıştırılan hücrelerden DNA ve RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 50 sporadik kolorektal karsinom olgusunun ayrıştırılan tümör ve normal hücrelerinden (tümör/normal=match paired/ eşli çiftler halinde toplam 100 örnek) izole edilen DNA'lar ile *Affymetrix* marka *Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0* kit ve *arrayleri* aracılığı ile ilgili kitin protokolüne uygun olarak SNP-Array CGH

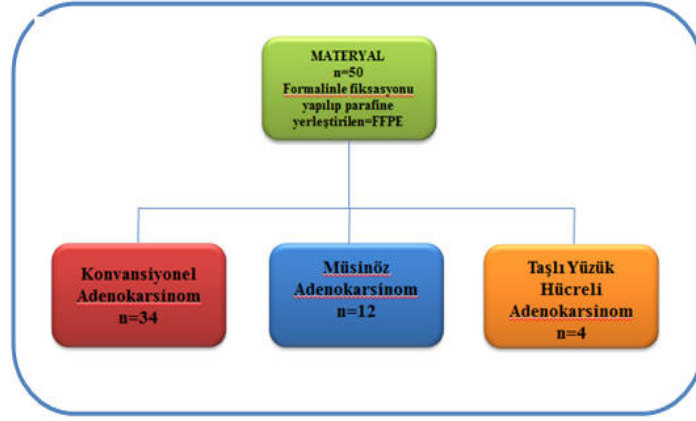
çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Array CGH aşamasında kullanılan 50 sporadik kolorektal kanser olgusununayrıştırılan tümör ve normal hücrelerinden (tümör/normal=match paired/ eşli çiftler halinde toplam 100 örnek) izole edilen RNA'lar ile Affymetrix marka FFPE dokulardan çalışmaya uygun Human X3P arrayleri aracılığı ile ilgili kitin protokolüne uygun olarak genom ebadında transkriptom profillendirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu iki kapsamlı verinin entegrasyon işlemi uygulanmıştır. Kopya sayısı değişikliği ve transkriptom profili çıkarılan örneklerden analiz sonucunda 2 verinin korelasyon gösterdiği genlerin validasyonu normal hücrelerinden izole edilen DNA ve RNA örnekleri üzerinden eş zamanlı (real time) PZR ile gerçekleştirilecektir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Tez çalışması genel özet şeması

#### 4.2.1.Çalışmaya dahil edilen FFPE materyallerin histopatolojik değerlendirmesi

Gruplarda yer alacak olgulara ait arşiv materyali (H&E kesitler ve parafin bloklar) arşivden çıkarılarak, olguların H&E boyalı kesitleri üzerinde histopatolojik değerlendirme yapılmıştır. Kolorektal karsinom grubunda 34 konvansiyonel adenokarsinom, 12 müsinöz adenokarsinom, 4taşlı yüzük hücreli karsinom seçilmiştir. Bu olgulara ait demografik ve klinikopatolojik bilgiler patoloji raporlarından elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Histopatolojik olgu grupları

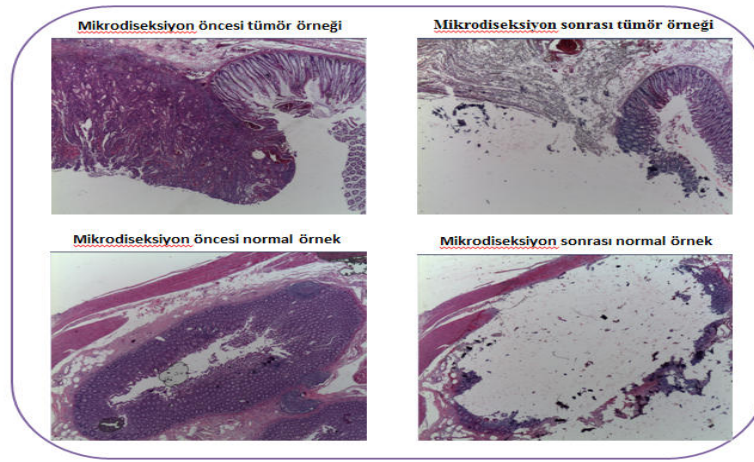
#### 4.2.3. Mikrodiseksiyon ve deparafinizasyon

H&E boyalı lamalar üzerinde lezyonun bulunduğu alanlar ışık mikroskopi altında seçilerek marker kalem ile işaretlenerek ayrıştırılacak tümör ve normal hücre alanları belirlenmiştir. Referans olarak kullanılan işaretli H&E boyalı preparatlara ait parafin bloklar arşivden çıkarılarak mikrodiseksiyon için boyasız kesit hazırlanmıştır. DNA ve RNA izolasyonu için parafin doku kesiti, mikrodiseksiyon ve deparafinizasyon için aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

Tüm çalışma boyunca gerekli steril bir ortam ve malzemeler kullanılmıştır. RNA izolasyonunda kullanılmak üzere alınan kesitlerde RNA ile çalışma için gerekli temizlik şartları dikkate alınmış olup su banyosu, mikrotom bıçakları, çalışma alanları RNase ZAP (Sigma, R2020) ile temizlenmiştir. Kesitlerin alındığı lamalar 80°C 2 saat bekletilerek steril edildikten sonra kullanılmıştır. RNA çalışmaları boyunca RNazsız filtreli pipet uçları kullanılmıştır.

1. Arşivden çıkarılan parafin bloklar -20°C'de bir süre bekletilip soğutularak mikrotom cihazına (Shandon Finesse 325 Manuel Mikrotom, Thermo, A77500016) yerleştirilir.
2. Bloktan 8 µm kalınlığında 4 parça kesit alınarak 45°C sıcaklığındaki su banyosuna atılır. Böylece kesim işlemi esnasında kıvrılan dokunun düzgün bir şekilde yayılması sağlanmış olur. (Örnekler arasında çapraz kontaminasyonu önlemek için her blokta yeni steril mikrotom bıçakları kullanılmıştır).
3. Su banyosundan doku lam üzerine alınarak 5 dk kurumaya bırakılır.

4. Deparafinizasyon işlemi için preparatlar ksilen dolu şale de 10 dk bekletilir.
5. 4. adım taze ksilen ile tekrarlanır.
6. Preparatlar % 100 lük alkol dolu şale de 5 dk bekletilir.
7. 6. adım taze alkol ile tekrarlanır.
8. Preparatlar distile su dolu şalede 1 dk bekletilir. Daha sonra peçete üzerinde 5-10 dk kurtulur.
9. Marker kalemi ile işaretlenmiş olan H&E boyalı preparatlar ile deparafinize edilmiş boyasız kesitler üst üste çakıştırılmak suretiyle tümör ve normal hücreleri barındıran alanlar bistüri ile kazınır (Şekil 4.3.) ve 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.



**Şekil 4.3. Mikrodiseksiyon öncesi ve sonrası tümör ve normal örnekler**

**Not:** 4.2.4 DNA izolasyon başlığına kadar olan işlemler DNA (Kopya Sayısı Analizi) ve RNA (Gen İfade Analizi) kapsamındaki çalışmalar için ortak olan basamaklardır.

#### **4.2.4.Parafine gömülü dokulardan ayrıştırılan tümör ve normal hücrelerdenDNA izolasyonu**

FFPE dokudan 8 µm kalınlığında alınan 4 parça kesitden genomik DNA izolasyonu deparafinizasyon işlemi ile tümürlü ve normal hücrelerin mikrodiseksiyon işleminin ardından fenol-klorofom yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

DNA izolasyonunda kullanılan Fenol-kloroform yöntemi için gerekli solüsyonlar, içerikleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir.

**Lizis Solüsyonu:Kaynak:Malumbres ve ark., blood,2008**

10mmol/L Tris HCL pH:8.0 (Sigma,T5941)

0.1 mmol/L EDTA (Etilen -Diamin-Tetra Asetikasit) (Sigma, E5134)

%2 SDS(Sigma, L4390)

10mmol/L Tris HCL (Sigma, 1185-53-1) pH:8.0

**30mg/ml Proteinaz K (Sigma P-6556):**

30 mg Proteinaz K alınıp 900 ul distile suda çözülür ve 1 ml'ye tamamlanır. Daha sonra daha küçük hacimlere bölünerek  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır.

**Sodyum Asetat (Sigma, S2889):**

40.8 g sodyum asetat 70 ml distile suda çözülür. Glasiyal asetik asit ile pH 5.2'ye ayarlanır ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

**DNA İzolasyon Protokolü**

1. Tümörlü bölgelerin disekte edildiği bu tüplere 200  $\mu\text{l}$  lizis buffer ve 30  $\mu\text{l}$  30 mg/ml Proteinaz K eklenir, iyice karıştırılır.
2. Lizat  $56^{\circ}\text{C}$ 'lik çalkalamalı ısı bloğu ya da su banyosunda bir gece inkübe edilir. Ardından  $65^{\circ}\text{C}$  ısı bloğu ya da su banyosunda 6 saat ya da bir gece daha inkübasyona bırakılır.
3. Lizat üzerine 230 ul Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (Fluka, 77617) karışımından eklenir.
4. Vortex ile karıştırılır.
5. 13000 rpm'de 10 dakika,  $4^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta santrifüj edilir.
6. Süpernatant pipet yardımı ile temiz bir tüpe alınır.
7. 560  $\mu\text{l}$  soğuk %100 Etanol( Sigma, 24102) ve 23 ul 3 M sodyumsetat eklenir,DNA görünene kadar yavaşça alt üst edilir.
8.  $-20^{\circ}\text{C}$  'de 1 saat bekletilir.
9. 13000rpm'de 10 dakika  $4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilir.
10. Alkol dökülerek uzaklaştırılır.
11. 500  $\mu\text{l}$  70% Etanol eklenir ve tüpe yavaşça vurarak pelet kaldırılır.

12. 13000rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edilir.
13. Alkol dikkatlice dökülerek uzaklaştırılır ve peletin kuruması tüpler bir peçeteye ters çevrilerek alkol uzaklaşana kadar bekletilir.
14. DNA pellete göre uygun miktarda nükleaz free su kullanılarak çözündürülür.
15. DNA'ların 1 gece oda ısısında çözünmesi beklenir ardından -20 °C 'de muhafaza edilir.

#### **4.2.4.1.DNA'nın spektrofotometrik analizi ve miktar tayini**

İzole edilen DNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000) aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. DNA miktar sonucu ng/μl şeklinde elde edilir. DNA 260 nm dalga boyunda, protein 280 nm dalga boyunda, fenol ve diğer bileşikler ise 230 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Bu doğrultuda DNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/280 ve A230/280 oranları dikkate alınmaktadır. DNA için 260/280 oranının ~1,8 olması gerekmektedir. A260/ A230 oranının ise 1,8-2,2 aralığında olması beklenir. İzolasyon protokolünden kaynaklanabilen protein, fenol veya diğer kontaminatların varlığı bu değerlerin düşmesine sebep olabilmektedir. Bu tez çalışmasında da mümkün olduğunca bu oranlar için ilgili aralıklar dikkate alınmıştır.

#### **4.2.4.2. Mikrodizin reaksiyonları için DNA konsantrasyonunun ayarlanması**

Konsantrasyonları belirlenen DNA örnekleri kopya sayısı değişimi analizi için kullanılacak olan Affymetrix SNP 6.0 array protokolünde yer alan Nsp ve Sty restriksiyon enzim kesim reaksiyonları için iki ayrı tüpte 50 ng/μl olacak şekilde hazırlanmıştır.

#### **4.2.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi**

- İzole edilen DNA örnekleri bütünlük durumu değerlendirilmek üzere %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.
- Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar ve hazırlanma şekilleri aşağıdaki gibidir:

- **5X TBE (Tris-HCl, Borik Asit, EDTA):**

54 g Tris Base (Sigma T6066), 27,5 g Borik Asit (Sigma B6768) ve 20 ml 0.5 M EDTA'nın (pH=8,0) (Sigma E5134) 800–900 ml deiyonize su (ddH<sub>2</sub>O) içerisinde çözülmesi sağlanır ve daha sonra 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan 5X TBE stok solüsyonu olarak kullanılır. 5xTBE'nin deiyonize su ile 1/5 oranında sulandırılması ile hazırlan 1xTBE ise çalışma solüsyonu olarak agaroz jel hazırlamada, DNA örnekleri ve PZR ürünlerinin yürütülmesinde kullanılır.

- **Ethidium Bromide (10 mg/ml):**

100 mg toz etidyum bromidin (Sigma E7637) 10 ml distile su içerisinde çözülmesi sağlanır. 10mg/ml olarak hazırlanan boya solüsyonu karanlıkta ve + 4°C'de saklanır.

- **DNA Ladder (100 bp DNA Ladder)**

DNA Ladder (Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, SM0321) üzerine 166 µl 6X Loading Dye (Fermantas, R0611) ve 734 µl distile su ilave edilir. Vorteks yardımı ile karıştırılır.

- **%1'lik Agaroz Jel**

1 g agaroz (Sigma, A5093) hassas terazi (Shimadzu BX320H) ile tartılır ve üzerine 100 ml 1x TBE eklenir. %1'lik olarak hazırlanan agaroz mikrodalga fırın (Vestel) yardımı ile çözdürülür. Çeker ocak altına alınan agarozun el yakmayacak kadar soğuması beklendikten sonra 5 µl etidyum bromür eklenir ve boyanın homojen dağılması için karıştırılır. Hazırlanan agaroz-boya karışımı jel tablasına dikkatlice dökülür. Dökme sırasında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilir. Daha sonra örneklerin yükleneceği kuyuların oluşmasını sağlayan jel tarakları dikkatlice yerleştirilir. Son olarak hazırlanan jelin katılaşması için 20-30 dk oda sıcaklığında beklenir.

- **%1'lik Agaroz Jelde DNA Örneklerinin Yürütülmesi**

Hazırlanan %1'lik agaroz jel, içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına (Scie-Plas HU10W) yerleştirilir. Jel'deki ilk kuyuya DNA ladder yüklenir. 3 µl DNA örneği 3 µl 6X Loading Dye ile karıştırıldıktan sonra pipet yardımıyla jeldeki diğer kuyu(lara) yüklenir.

Jele yükleme yapılırken yüklemenin yapıldığı kuyularda hava kabarcığı olmamasına ve yüklenen boya-jel karışımının kuyulardan taşmamasına dikkat edilir. Yükleme tamamlandıktan sonra örnekler 120 voltta 20-30 dakika yürütülür ve görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine (Syngene Gene Genius Bio İmaging System) aktarılır. Burada GeneSnap 6.08.04 yazılımı ile UV ışık altında görüntülenerek elde edilen DNA'nın %1'lik agaroz jel görüntüsü bütünlük açısından değerlendirilir.

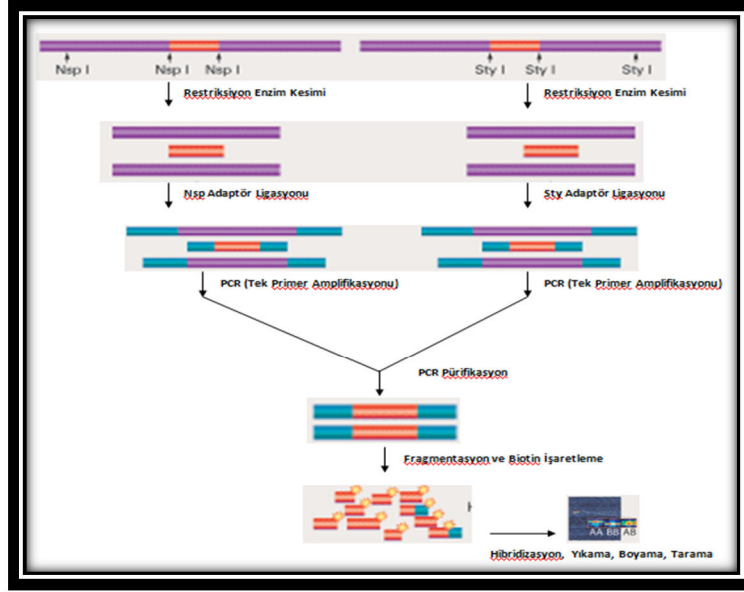
**Not:** Bir sonraki aşama olan mikrodizinin reaksiyonlarından biri olan PZR ve fragmentasyon basamaklarında PZR ve fragmentasyon reaksiyon ürünlerinin görüntülenmesi için %2'lik ve %4'lük agaroz jel kullanılmış olup aynı prosedür takip edilmiştir.

#### **4.2.4.4. Kopya Sayısı Değişikliği için Gerçekleştirilen Mikrodizin Reaksiyonları**

50 sporadik kolorektal kanser vakasının tümör ve normal hücrelerinden (tümör/normal=match paired/ eşli çiftler halinde toplam 100 örnek) izole edilen DNA örneklerinden yapılacak olan kopya sayısı değişimleri analizleri *Affymetrix* marka SNP 6.0 *array*'leri ve kiti (Affymetrix, Genome-Wide Human SNP Array 6.0, 901182; Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit 6.0, 901152) aracılığıyla üretici protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Yalnızca PZR pürifikasyon ve fragmentasyon aşamasında FFPE örneklerin degradasyon durumu dikkate alınarak Tueffered ve arkadaşlarının önerdiği şekilde değişiklik yapılmıştır (124). Yöntem kısa özeti aşağıdaki gibidir.

500 ng genomik DNA, NspI ve StyI restriksiyon enzimleri ile kesilir ve 4 baz çiftlik "overhang"leri tanıyan adaptörler (Nsp adaptör/Sty adaptör) bağlanır. Restriksiyon enzim kesimi sonucu oluşan bütün fragmentler boyut önemsenmeden adaptör ligasyonu için birer substrattır. Adaptör takılı DNA fragmentlerinin amplifikasyonunda adaptör sekansı tanıyan genel bir primer kullanılır. PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) aşamasında 200-1.100 baz çifti arası fragmentler amplifiye edilir. Daha sonra her bir restriksiyon enzimi ile reaksiyonları gerçekleştirilen ve amplifiye edilen PZR ürünleri birleştirilir ve pürifiye edilirler. Çoğaltılan genomik DNA daha sonra fragmente edilir, işaretlenir ve array'e hibridize edilir.





Şekil 4. 4. SNP 6.0 Affymetrix SNP 6.0 protokol akış şeması

#### 4.2.4.1 SNP 6.0 Restriksiyon Enzimi ile Kesim

##### 4.2.4.1.a STY Restriksiyon Enzim Kesimi

Bu basamakda genomik DNA styI restriksiyon enzimi ile kesilir.

##### Önemli Notlar:

- Sty I ve Nsp I kesim reaksiyonları aynı gün yapılmamalıdır.
- Reaktifler buz üzerinde çözülür.
- Enzim kullanılacağı zaman -20 °C'den çıkarılır. Kullanılmadan önce 3 sn spin edilir.
- Kullanmadan önce DNA'lar 3 sn vortekslenir ve 2000 rpm'de 30 sn spin edilir
- Reaktifler 1er sn 3 kez vortekslenir ve 3 sn spin edilir.
- PZR cihazı önceden kapağı ısıtılır ve blok oda ısısında bırakılır.

NOT: Protokolden farklı olarak biz fermentase marka enzim ve bufferını kullanıyoruz. Protokol, 250 ng değil 312,5 ng DNA(kesim sonucunugörmek için yükleme yaptığımız için hacim 25 ul 'ye çıkarılmıştır) input değeri için ve fermentas marka enzim için aşağıdaki gibi değiştirilmiştir.

Fermentas fast digest StyI Enzim protokolünde 1 ug genomik DNA için 1 ul enzim koyulması gerektiği belitiyor. Biz 50 ng'dan 6,25 ul reaksiyona koyarak toplam 312,5 ng DNA ile çalışıyoruz. O halde :

1000 ng DNA için 1 ul enzim

$\frac{312,5 \text{ ng DNA için}}{1000} \times 1 \text{ ul}$

X=0,31 ul enzim koyulur

#### **Kesim reaksiyon karışımının hazırlanması**

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>
dH2O	15,94 µl
Sty1(10U/µL)	0,31 µl
10X FAST DIGEST BUFFER	2,5 µl
Genomic DNA (50ng/µl)	6,25 µl
Toplam Hacim	25 µL

- Tablo izlenerek buz üzerinde kesim karışımı hazırlanır.
- Karışım 1er sn 3 kez vortekslenir ve 3 sn spin edilir ve 312,5 ng DNA barındıran tüplere eklenir.
- Karışım 3 sn vortekslenir ardından 2000 rpm de 30 sn spin edilir.
- Tüpler PZR cihazına'a koyulur.

#### **PZR programı**

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
37°C	20 dk
65°C	5 dk
4°C	Beklet

*NOT: Kesim sonrası ligasyona geçilmeyecekse örnekler -20°C'de saklanmalıdır.*

#### **4.2.4.2.a SNP 6.0 LİGASYON**

Bu aşamada kesilen örnekler Sty adaptörler ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilir.

### Önemli Notlar:

- 10X T4 DNA ligaz buffer ilk çözündürülmesinin ardından alikvatlanarak saklanır.
- 10X T4 DNA ligaz buffer ATP içermektedir bu nedenle buz üzerinde çözülmesi sağlanmalıdır. Buffer kullanmadan önce herhangi bir çöküntü kalmayana dek iyice vortekslenmelidir.
- NSP ve STY ligasyon reaksiyonlarında kendi adaptörlerinin kullanılmasına dikkat edilir.
- Nsp ve Sty ligasyon reaksiyonları kesim reaksiyonlarında olduğu gibi farklı zamanlarda kurulur.
- Enzim kullanılacağı zaman -20°C'den çıkarılır.
- Adaptör Sty buz üzerinde çözünmesi sağlanır. Reaktifler 1er sn 3 kez vortekslenir ve 3 sn spin edilir. Sonrasında tekrar buza alınır.
- PZR cihazı önceden kapağı ısıtılır ve blok oda ısısında bırakılır.
- Eğer örnekler donuk durumdaysa onlarında buz üzerinde çözünmesi sağlanır. Kullanılmadan önce 3 sn vortekslenir ve 2000 rpm'de 30 sn spin edilir. Sonrasında tekrar buza alınır

### Ligasyon reaksiyon karışımının hazırlanması:

<b>Reaktif</b>	<b>Hacim</b>
<b>STY Adaptor (50 µM)</b>	<b>0,75 µl</b>
<b>T4 DNA Ligaz Tamponu (10X)</b>	<b>2,5 µl</b>
<b>Kesilmiş DNA</b>	<b>19,75 µl</b>
<b>T4 DNA Ligaz (400U/µl)</b>	<b>2 µl</b>
<b>Toplam</b>	<b>25 µl</b>

- Tablo izlenerek buz üzerinde ligasyon karışımı hazırlanır.
- Karışım 1er sn 3 kez vortekslenir ve 3 sn spin edilir ve kesilmiş DNA'ları barındıran tüplere eklenir.
- Karışım 3 sn vortekslenir ardından 2000 rpm de 30 sn spin edilir.

- Tüpler PZR cihazı'na koyulur. Program aşağıdaki gibidir.

Sıcaklık	Zaman
16°C	180 dk
70°C	20 dk
4°C	Beklet

Ligasyonu yapılmış DNA'lar PZR reaksiyonuna geçmeden önce soğuk 75µl PZR suyu ile dilüe edilmelidir. Karışım 3 sn vortekslenir ardından 2000 rpm de 30 sn spin edilir.

**NOT:** Ligasyon sonrası PZR'a geçilmeyecekse örnekler -20°C'de saklanmalıdır.

#### 4.2.4.3.a PZR

- Kontaminasyon olup olmadığını anlamak için mutlaka negatif kontrol kullanılır.

1. Adaptör takılmış DNA'lar 3 sn vortekslenir.
2. 2000 rpm'de 30 sn spin edilir ve buza alınır.
3. Enzim dışındaki tüm reaktifler 1er sn 3 kez vortekslenir. 3 sn spin edilir ve buza alınır.
4. PZR cihazı önceden kapağı ısıtılır ve blok oda ısısında bırakılır.
5. Tabloda tek örnek için değerleri verilen PZR karışımı örnek sayısına göre hazırlanır.

Reaktif	Hacim
5X Go Taq PZR Tamponu	20µl
dNTP (2,5mM)	14µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	14µl
PZR Primer 002 (100pmol)	4,5µl
GoTaq DNA Polimeraz (5U/ µl)	4µl
Betain (5M)	20µl
dH <sub>2</sub> O	13,5µl
Dilüe edilmiş adaptörlü DNA	10µl
Toplam	100µl

6. Tabloda gösterilen miktarlar çalışılan örnek için yeterli olacak şekilde hazırlanır ve birer saniye 3 kez vortekste karıştırılır ve spin edilir.
7. MJ DNA Engine Tetrad'da aşağıdaki protokol ile 30 döngü PZR reaksiyonu yapılır.

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
94°C	3 dk	1
94°C	30 sn	30
60°C	30 sn	
68°C	15 sn	
68°C	7 dk	1
4°C	Beklet	

8. 3µl PZR ürünü 3 µl 2xJel yükleme boyası ile karıştırılarak 2% agaroz jele yüklenir ve 120 voltta yaklaşık 30 dk yürütülürdaha sonra purifikasyon basamağına geçilmeyecekse örnekler -20°C'de saklanmalıdır.

#### 4.2.4.4.a PZR Sonuçlarının Agaroz Jel Elektrofrezisi

PZR sonuçları % 2 'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

#### 4.2.4.1.b Nsp Restriksiyon Enzim Kesimi

Bu basamakta genomik DNA NspI restriksiyon enzimi ile kesilir.

#### Önemli Notlar:

- Sty I ve Nsp I kesim reaksiyonları aynı gün yapılmamalıdır.
- Reaktifler buz üzerinde çözülür.
- Enzim kullanılacağı zaman -20 °C'den çıkarılır. Kullanılmadan önce 3 sn spin edilir.
- Kullanılmadan önce DNA'lar 3 sn vortekslenir ve 2000 rpm'de 30 sn spin edilir

- Reaktifler 1er sn 3 kez vortekslenir ve 3 sn spin edilir.
- PZR cihazı önceden kapağı ısıtılır ve blok oda ısısında bırakılır
- **NOT:** Protokolden farklı olarak biz fermentas marka enzim ve bufferını kullanıyoruz. Protokol, 250 ng değil 312,5 ng DNA(kesim sonucunugörmek için yükleme yaptığımız için hacim 25 ul 'ye çıkarılmıştır) input değeri için ve fermentas marka enzim için aşağıdaki gibi değiştirilmiştir.

Fermentas fast digest NspI Enzim protokolünde 1 ug genomik DNA için 1 ul enzim koyulması gerektiği belirtiliyor. Biz 50 ng'dan 6,25 ul reaksiyona koyarak toplam 312,5 ng DNA ile çalışıyoruz. O halde

1000 ng DNA için 1 ul enzim

312,5 ng DNA için x ul

X=0,31 ul enzim koyulur.

#### **Kesim reaksiyon karışımının hazırlanması**

<b>Reaktif</b>	<b>Miktar</b>
dH <sub>2</sub> O	15,94 µl
NspI(10U/µL)	0,31 µl
10X FAST DIGEST BUFFER	2,5 µl
Genomic DNA (50ng/µl)	6,25 µl
Toplam Hacim	25 µL

- Tablo izlenerek buz üzerinde kesim karışımı hazırlanır.
- Karışım 1er sn 3 kez vortekslenir ve 3 sn spin edilir ve 312,5 ng DNA barındıran tüplere eklenir.
- Karışım 3 sn vortekslenir ardından 2000 rpm de 30 sn spin edilir.
- Tüpler PZR cihazı'na koyulur.

## PZR cihazı programı

Sıcaklık	Zaman
37°C	5 dk
65°C	5 dk
4°C	Beklet

**NOT:** Kesim sonrası ligasyona geçilmeyecekse örnekler -20°C'de saklanmalıdır.

### 4.2.4.2.b SNP 6.0 LİGASYON

Bu aşamada kesilen örnekler Nsp adaptörler ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilir.

#### Önemli Notlar:

- 10X T4 DNA ligaz buffer ilk çözülmesinin ardından alikvatlanarak saklanır.
- 10X T4 DNA ligaz buffer ATP içermektedir bu nedenle buz üzerinde çözülmesi sağlanmalıdır. Buffer kullanmadan önce herhangi bir çöküntü kalmayana dek iyice vortekslenmelidir.
- NSP ligasyon reaksiyonlarında kendi adaptörlerinin kullanılmasına dikkat e dilir
- Nsp ve Sty ligasyon reaksiyonları kesim reaksiyonlarında olduğu gibi farklı zamanlarda kurulur.
- Enzim kullanılacağı zaman -20°C'den çıkarılır.
- Adaptör Nsp buz üzerinde çözünmesi sağlanır. Reaktifler 1er sn 3 kez vortekslenir ve 3 sn spin edilir. Sonrasında tekrar buza alınır.
- PZR cihazı önceden kapağı ısıtılır ve blok oda ısısında bırakılır.
- Eğer örnekler donuk durumdaysa onlarında buz üzerinde çözünmesi sağlanır. Kullanılmadan önce 3 sn vortekslenir ve 2000 rpm'de 30 sn spin edilir. Sonrasında tekrar buza alınır.

### **Ligasyon reaksiyon karışımının hazırlanması:**

<b>Reaktif</b>	<b>Hacim</b>
<b>NSP Adaptor (50 µM)</b>	<b>0,75 µl</b>
<b>T4 DNA Ligaz Tamponu (10X)</b>	<b>2,5 µl</b>
<b>Kesilmiş DNA</b>	<b>19,75 µl</b>
<b>T4 DNA Ligaz (400U/µl)</b>	<b>2 µl</b>
<b>Toplam</b>	<b>25 ul</b>

- Tablo izlenerek buz üzerinde ligasyon karışımı hazırlanır.
- Karışım 1er sn 3 kez vortekslenir ve 3 sn spin edilir ve kesilmiş DNA'ları barındıran tüplere eklenir.
- Karışım 3 sn vortekslenir ardından 2000 rpm de 30 sn spin edilir.
- Tüpler PZR cihazı'na koyulur. Program aşağıdaki gibidir.
- Ligasyonu yapılmış DNA'lar PZR reaksiyonuna geçmeden önce soğuk 75µl PZR suyu ile dilüe edilmelidir. Karışım 3 sn vortekslenir ardından 2000 rpm de 30 sn spin edilir.

***NOT: Ligasyon sonrası PZR'a geçilmeyecekse örnekler -20°C'de saklanmalıdır.***

#### **4.2.4.3.b PZR**

Nsp restriksiyon enzimi ile kesilip devam edilen ligasyon ürününden 7 adet Sty restriksiyon enzimi ile kesilip devam edilen ligasyon ürününden 6 adet PZR reaksiyonu kurulur. Böylece 1 örnek için toplam 13 adet PZR reaksiyonu kurulmuş olur. İlgili kit protokolünde bu sayı 7 (4 Nsp-3 Sty) dir. Çalışmada kullanılan FFPE örneklerinin tipik karakteristiği olan degradasyon ve protein ve DNA arasında oluşan çapraz bağlar PZR reaksiyonundabu örneklerden beklenen verimin alınmasını etkilemiştir.Bu nedenle kit protokünde belirtilenden daha fazla sayıda PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu çok sayıda PZR reaksiyonu arraye hibridize edilecek miktar olan 202.5 µg'a ulaşmak için yapılmaktadır.



1. Adaptör takılmış DNA'lar 3 sn vortekslenir.
2. 2000 rpm'de 30 sn spin edilir ve buza alınır.
3. Enzim dışındaki tüm reaktifler 1er sn 3 kez vortekslenir. 3 sn spin edilir ve buza alınır.
4. PZR cihazı önceden kapağı ısıtılır ve blok oda ısısında bırakılır.
5. Tabloda tek örnek için değerleri verilen PZR karışımı örnek sayısına göre hazırlanır.

<b>Reaktif</b>	<b>Hacim</b>
5X Go Taq PZR Tamponu	20µl
dNTP (2,5mM)	14µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	14µl
PZR Primer 002 (100pmol)	4,5µl
GoTaq DNA Polimeraz (5U/ µl)	4µl
Betain (5M)	20µl
dH <sub>2</sub> O	13,5µl
Dilüe edilmiş adaptörlü DNA	10µl
Toplam	100µl

6. Tabloda gösterilen miktarlar çalışılan örnek için yeterli olacak şekilde hazırlanır ve birer saniye 3 kez vortekste karıştırılır ve spin edilir.
7. MJ DNA Engine Tetrad'da aşağıdaki protokol ile 30 döngü PZR reaksiyonu yapılır.

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
94°C	3 dk	1
94°C	30 sn	} 30
60°C	30 sn	
68°C	15 sn	
68°C	7 dk	1
4°C	Beklet	

8.3µl PZR ürünü 3 µl 2xJel yükleme boyası ile karıştırılarak 2% agaroz jele yüklenir ve 120 voltta yaklaşık 30 dk yürütülürdaha sonra purifikasyon basamağına geçilmeyecekse örnekler -20°C’de saklanmalıdır.

#### **4.2.4.4.b PZR Sonuçlarının Agaroz Jel Elektrofrezisi**

PZR sonuçları % 2 ‘lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

#### **4.2.4.4.5 PZR Pürifikasyonu**

PZR pürifikasyonu Clontech clean-up kit ile gerçekleştirildi. Pürifikasyon işlemi için gerekli 0.1 M EDTA’nın hazırlanış şekli aşağıdaki gibidir.

##### 0,1M EDTA

37.22 gr EDTA (Sigma E5134) tartılır ve son hacim 1 ml olacak şekilde su ile tamamlanır. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

PZR purifikasyonu ve elüsyonu Clontech clean-up kit ile gerçekleştirildi.

1. Her PZR reaksiyonunun üzerine (Nsp ve Sty ile ayrı ayrı gerçekleştirilen sırasıyla 7 ve 6 adet PZR reaksiyonu) 8 µl 0.1 M EDTA eklenir.
2. 2 saniye orta derecede vortekste karıştırılır.
3. Karışım 2000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
4. Bir örneğe ait 7 adet Nsp restriksiyon kesim enzimi ile devam edilmiş PZR ürünü ve 6 adet Sty restriksiyon kesim enzimi ile devam edilmiş PZR ürünü tek bir tüpte birleştirilir ve bu bütün örnekler için uygulanır.
5. Kit ile birlikte gelen pürifikasyon plakasının her bir kuyusuna her bir örneğin 13 adet PZR reaksiyonundan ~300 µl eklenir. Bir örnek için gerçekleştirilen PZR’lar 4 adet plaka kuyusuna homojen olarak dağıtılmış olur.Plaka üzerinde kullanılmayan yerler alüminyum kapatici ile kapatılır.
6. Purifikasyon plakası manifoldun üzerine yerleştirilir.
7. 600 mbar vakumda purifikasyon gerçekleştirilir. Kuyular tamamen kuruyana kadar vakum uygulanır. Kuyular tamamen kurduktan sonra 50 µl PZR suyu eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilir.

8. Yıkama basamağı 2 kez daha tekrarlanır. Her yıkama arasında membranın tamamen kuruması beklenir.
9. Yıkama basamakları bittikten sonra vakum kapatılır ve plakamanifolddan çıkarılır.
10. Her kuyuya 45 µl kit ile birlikte gelen elusion tampon olan RB buffer eklenir.
11. Plaka karıştırıcıya yerleştirilerek oda sıcaklığında 10 dk karıştırılır.
12. Tüm kuyulardaki PZR ürünleri her örnek için bir temiz tüpe alınır.

#### **4.2.4.4.6. Pürifiye Edilen PZR Ürünlerinin Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini**

Pürifiye edilen PZR örneklerinin saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000) aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. PZR ürünü miktar sonucu ng/µl şeklinde elde edilir. PZR ürünlerinin saflığı değerlendirilirken A260/280 ve A230/280 oranları dikkate alınmaktadır. PZR için 260/280 oranının ~1,8 olması gerekmektedir. A260/ A230 oranının ise 1,8-2,2 aralığında olması beklenir. Ölçüm sonucunda toplamdaki PZR ürün miktarı ilgili kit protokolünde verilen ve bir sonraki aşama olan fragmentasyon için gerekli 202.5 µg'ı karşılaması gerekmektedir. Bu miktara ulaşamayan örnekler için ek PZR reaksiyonları kurulup tekrar pürifiye edilirler ve bir önceki PZR ürünü ile birleştirilirler.

#### **4.2.4.4.7. SNP 6.0 Fragmentasyon ve Fragmentasyon Sonrası Agaroz Jel Elektroforezi**

Bu adımda pürifiye PZR ürünleri fragmentasyon reaktifi kullanılarak fragmente edilir. Öncelikle Fragmentasyon reagenti uygun miktarda Fragmentasyon buffer ve nükleaz-free su eklenerek dilüe edilir. Daha sonra bu dilüe reaktif örnek+ fragmentasyon buffer karışımına eklenir. Mix PZR cihazı'nda fragmentasyon programına koyulur. Ardından %4'lük agaroz jelde yürütülür.

#### ***Önemli Notlar:***

- *Fragmentation Reagent stoğu -20°C' de saklanır.*
- *Pürifiye PZR ürünleri RB buffer ile dilüe edilmelidir. (en az 202,5 ug - 45 µL).*

- *Fragmentasyon reaksiyonu başlamadan önce PZR cihazı 37°C 'de bekletilir.*
- *Fragmentasyon reagent fazla miktarda hazırlanmalıdır.*
- *Dilüe frag.reagentın küçük miktarlarda hazırlanması hataya sebep olur..*
- *Tüm dilüsyonlar, eklemeler ve karışımlar buz üzerinde yapılmalıdır.*
- *Tüm basamaklar mümkün olduğunca çabuk yapılmalıdır.*
- *Frag. Reagent kullanıldıktan sonra atılmalıdır.*

• **Fragmentasyona 45 ul'de en az 200 ug olacak şekilde koyulur.**

1. PZR cihazı 37°C önceden ısıtılır.(10 dk)
2. Örnekler 45 ul 'de 202,5 ug olacak şekilde ayarlanır.(1 ul'de 4,5-6 ug olması isteniyor).
3. Fragmentasyon Buffer 1er sn 3 kez vortekslenir ardından 3 sn spin yapılır ve buza alınır.
4. 5 µL 10X Fragmentation Buffer buz üzerinde her bir örneğin üzerine eklenir ve vortex'de orta derecede 2 saniye karıştırılır. Buz üzerine konur.

Reaktif	Hacim
Pürifiye PZR ürünü (200 µg in 45 ul RB buffer)	45 µL
10X Fragmentation Buffer	5 µL
<b>Toplam</b>	<b>50 µL</b>

5. Dilue Fragmentasyon reagent hazırlanır.

GeneChip Fragmentation Reagent tüpünün üzerinde etiketlenmiş U/µL tanımına bakılarak dilüsyon hesaplanır.

Fragmentasyon buffer ve PZR suyu kullanılarak 0.1 U/µL olacak şekilde stok Fragmentasyon reagent dilüe edilir ve 5 dk buzda bekletilir. Kullanmadan önce 1 er sn 3 kez vortekslenir ardından spin yapılır.

Y = Stok Fragmentasyon Reagent'ın dilüe µL değeri

X = Stok Fragmentasyon Reagent tüpünün üzerindeki değer (tüpün üzerinde)

0.1 U/µL = dilüe Fragmentasyon Reagent'ın konsantrasyonu

$$\frac{Y=0,1U/\mu L \times \text{Toplam rxn hacmi}\mu L}{X U/\mu L}$$

Örnek Hesaplama :Toplam hacim 12 ul olsun (1 örnek için)

$$\frac{Y=0,1U/\mu L \times 12 \mu L}{2,75 U/\mu L} = 0,44 \text{ ul}$$

Reagent	Fragmentasyon Reaktifi Konsantrasyonu(1 örnek için)
Su	10.36 ul
10 X Fragmentasyon Buffer	1.2 ul
Fragmentasyon Reagent(2,75 U/ul)	0.44 ul
<b>Toplam</b>	<b>12 ul</b>

*NOT: Fragmentasyon Reagent viskozdur. Bu nedenle tüp içinde iyice karıştırılmalıdır.*

6. Dilüe fragmentasyon reagent'dan (0.1U/μL) 5 μL fragmentasyon karışımına eklenir.

Reaktif	Hacim (1 örnek için)
Fragmentation Mix(örnek+buffer)	50 μL
Diluted Fragmentation Reagent (0.1U/μL)	5 μL
<b>Total</b>	<b>55 μL</b>

- 3 saniye orta hızda vortexlenir ve 2,000 rpm 30 sn 4 °C 'de santrifüj edilir.
- Fragmentasyon tüpleri önceden 37 derecede ısıtılmış PZR cihazı'na yerleştirilir.
- Program aşağıdaki gibidir.

Sıcaklık	Zaman
37°C	35 dakika
95°C	15 dakika
4°C	Beklet

- Reaksiyon bittikten sonra tüpler spin edilir..
- 2 μL fragmente edilmiş PZR ürünü ile 3 μL jel yükleme boyası karıştırılarak 4% agaroz jele yüklenerek 120V- 30 dakika yürütülür.

**NOT1:** Bantlar 200 bp ve altında olmalı

**NOT2:** Bu tez çalışmasında materyalimiz FFPE örnekler olduğu için fragmentasyon aşamasında aşağıdaki PZR cihazı rogramını kullanılmıştır. Çünkü fragmentasyonda kullanılan DNase I enzimi unspezifik olarak PZR ürününü parçalamaktadır. FFPE PZR ürünleri olması gereken aralıktan daha küçüktür. Bu nedenle fragmentasyon zamanı daha küçük tutulur. 37°C de 35 dk yerine 10 dk yapılır. Jelde yürütülür. Eğer 200 bp den daha büyük sürüntü görüntüsü varsa taze DNase I eklenir 10 dk daha fragmente edilir

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
<b>37°C</b>	<b>10 dakika</b>
<b>95°C</b>	<b>15 dakika</b>
<b>4°C</b>	<b>Beklet</b>

#### **4.2.4.4.8.SNP 6.0 Biotin ile İşaretleme**

Bu basamakta İşaretleme reaktifi kullanılarak fragmente örnekler işaretlenir.

#### **Önemli Notlar**

- Enzim hariç reaktifler buz üzerinde eritilir. Enzim kullanılacağı zaman -20°C'den çıkarılır. Kullanılmadan önce 3sn spin edilir.
- Reaktifler 1er sn 3 kez vortekslenir ve ardından 3 sn spin yapılır soğuk çalışma bloğuna konur.
- PZR cihazı bloğu önceden 37°C'e ayarlanır. Örnekler koyulmadan 10 dk bu şekilde beklemesi sağlanır.

4. Labeling karışımı buz üzerinde hazırlanır. 1er sn 3 kez vortekslenir ve ardından 3 sn spin yapılır

<b>Reaktif</b>	<b>Hacim/1X</b>
<b>5X TdT Buffer</b>	<b>14 µL</b>
<b>GeneChip DNA Labeling Reagent (30 mM)</b>	<b>2 µL</b>
<b>TdT (30 U/µL)</b>	<b>3.5 µl</b>
<b>Toplam</b>	<b>19,5 µl</b>

5. 53.5 µL fragmente edilmiş DNA'nı(Jele 1.2 ul yüklenir) üzerine 19.5 µL labeling karışımı eklenir.

<b>Reaktif</b>	<b>Hacim</b>
<b>Fragmente DNA</b>	<b>53.5 ul</b>
<b>Labeling karışımı</b>	<b>19.5 µL</b>
<b>Toplam</b>	<b>73 µL</b>

6. 3 sn. vortexde karıştırılır ve 2000 rpm'de 30 sn spin edilir. PZR cihazıa yerleştirilir. Programı aşağıdaki gibidir.

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
<b>37°C</b>	<b>4 saat</b>
<b>95°C</b>	<b>15 dk</b>
<b>4°C</b>	<b>Bekletme</b>

7. Labeling reaksiyonu bittikten sonra tüpler 2000 rpm'de 30 sn spin edilir.

**NOT: Hibridizasyon basamağına geçilmeyecekse örnekler -20°C'de saklanmalıdır.**

#### **4.2.4.4.9.SNP 6.0 Hibridizasyon**

Bu adımda her bir örnek insan SNP 6.0 array 'e yüklenerek hibridize edilir. İlk olarak hibridizasyon reaksiyon karışımı hazırlanır ve her örneğin üzerine eklenir.Daha sonra örnekler PZR cihazı' da denatüre edilir. Denatürasyondan sonra her bir örnek SNP 6.0 array'e yüklenir. Örnekler hibidizasyon fırınına yerleştirilir ve 50°C de 18 saat hibridizasyon işlemi gerçekleştirilir.

## Önemli Notlar

- Örnekler denatürasyondan sonra ve array'lere yüklenene kadar 49°C PZR cihazı'nda bekletilmelidir.
- Arrayler kullanılmadan önce mutlaka oda ısısına getirilmelidir (10-15 dk). Özellikle kauçuk septaların oda ısısına gelmesi önemlidir.Çünkü onlar çatlamaya eğilimlidir.
- Kullanılmadan önce hibridizasyon fırını 50°C' e ayarlanır ve 60 rpm'de dönmesi sağlanarak en az 1 saat ön ısıtma yapılır.
- İşaretili örnekler çözdürüldükten sonra 3 sn vortekslenir ve 2000 rpm'de 30 sn santrifüj edilir. Daha sonra buza alınır.
- DMSO karışıma eklenirken tüpün ortasına koyulur. Asla tüpe değdirilmemelidir. Plastik partikülü karışabilir. Bu durum geri planda kirliliğini artırabilir.
- Artan hibridizasyon karışımı 1 haftaya kadar -20°C'de saklanabilir.

1. Hibridizasyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlanır.

<b>Reaktif</b>	<b>Hacim(1 örnek için)</b>
<b>MES (12X; 1.22 M)</b>	<b>12 µL</b>
<b>DMSO (100%)</b>	<b>13 µL</b>
<b>Denhardt's Solution (50X)</b>	<b>13 µL</b>
<b>EDTA (0.5 M)</b>	<b>3 µL</b>
<b>HSDNA (10 mg/mL)</b>	<b>3 µL</b>
<b>Oligonucleotide kontrol</b>	<b>2 µL</b>
<b>Human Cot-1 (1 mg/mL)</b>	<b>3 µL</b>
<b>Tween-20 (3%)</b>	<b>1 µL</b>
<b>TMACL (5M)</b>	<b>140 µL</b>
<b>Toplam</b>	<b>190 µL</b>



2. 190 ul hibridizasyon karışımı işaretli örneğe eklenir ve toplam 263 ul'lik karışım elde edilir.
3. 30 sn vorteks yapılır.
4. 2000 rpm'de 30 sn spin edilir.
5. Hibridizasyon karışımı + işaretli örnek 95° C ısı bloğunda 10 dk denature edildikten sonra 49°C ısı bloğunda arraylere yükleme yapılan kadar bekletilir. Bir arraye yükleme yapılırken diğer örnekler 49°C ısı bloğunda bekletilirler.
6. Array içine 200 µL denatüre edilmiş hibridizasyon karışımı enjekte edilir. Delikler küçük bantlar ile kapatılır.(Yüklenmiş arrayler 1.5 dk dan fazla oda ısısında tutulmamalıdır.)
7. Array'ler 18 saat 60 rpm de 50°C'de hibridize edilirler.

*NOT:Kalan hibridizasyon karışımı -20°C'de saklanabilir.*

#### **4.2.4.4.10.SNP 6.0 Yıkama, Boyama ve Tarama**

Boyama 3 aşamada gerçekleşir.

Boyama1. SAPE aşaması

Boyama 2. Ab amplifikasyon adımı

Boyama 3. SAPE ile son boyama

#### **Önemli Not:**

- Kullanılan Protokol: GenomeWideSNP6\_450.
- Yıkama,boyama veya taramadan önce arrayler mutlaka oda ısısında olmalı. +4 de bekletildiyse oda ısısına gelmesi beklenilmelidir.

1.18 saat hibridizasyondan sonra ,arrayler fırından alınır ve arraylerin arkalarındaki kağıtlar çıkarılır. Hibridizasyon karışımı arrayden çıkarılır. (Çıkan hibridizasyon karışımı 1.5 ml tüplere aktarılır ve -80 C de saklanabilir)

2. 270 µL Array Bekletmeing Buffer ile arrayler tamamen doldurulur. Arraylerin yıkama ve boyamadan önce oda ısınsa gelmesi sağlanır.

*NOT: Eğer array hemen yıkanmayacaksa o zaman içi array Bekletmeing buffer ile doldurulur ve bu şekilde 4°C'de 3 saat kadar bekletilebilir.*

2. Boyama reaktifleri aşağıdaki gibi hazırlanır. Her örnek için 3 kahverengi renkli tüp hazırlanır. İlk olarak Stain buffer hazırlanır. Daha sonra 1 ve 2 nolu amber tüplere

eşit olarak bölünür ardından bu iki tüpe aşağıdaki diğer reaktifler eklenir. 3 nolu tüpe 820 ul array holding buffer eklenir.

### **Boyama Reaktiflerinin Hazırlanması**

**Bir array için gerekli miktarlar aşağıdaki gibidir:**

#### **Stain Buffer**

<b>İçerik</b>	<b>1X</b>
<b>H2O</b>	<b>800,04 µL</b>
<b>SSPE (20X)</b>	<b>360 µL</b>
<b>Tween-20 (3%)</b>	<b>3.96 µL</b>
<b>Denhardt's (50X)</b>	<b>24 µL</b>
<b>Toplam</b>	<b>1188 µL</b>
<b><u>Toplam Hacim / 2</u></b>	<b>594µL</b>

➤ **Stain buffer hazırlanır. 1 ve 2 nolu amber tüplere 594 ul olarak dağıtılır.**

### **1. Modül için 1 nolu amber tüp SAPE boya solüsyonu**

#### **SAPE Boya Solüsyonu**

Streptavidin Phycoerythrin (SAPE), karanlıkta ve 4°C saklanmalıdır. Amber tüplerde hazırlanmalıdır. Tüpe konulmadan önce karıştırılmalıdır. SAPE veya SAPE solüsyonu dondurulmamalıdır.

#### **SAPE Solüsyon Karışımı**

<b>İçerik</b>	<b>Hacim</b>
<b>Stain Buffer</b>	<b>594 µL</b>
<b>1 mg/mL Streptavidin Phycoerythrin (SAPE)</b>	<b>6 µL</b>
<b>Toplam</b>	<b>600 µl</b>

Karıştırılır.

*NOT: SAPE içeren tüp, istasyonun 1. modülüne yerleştirilmelidir.*

## **2. Modül için 2 nolu Amber tüp antikor boya solüsyonu**

### **Antikor Boya Solüsyonu**

#### **Antikor Solüsyon Karışımı**

<b>İçerik</b>	<b>Hacim</b>
<b>Stain Buffer</b>	<b>594 µL</b>
<b>0.5 mg/mL biotinylated antibody</b>	<b>6 µL</b>
<b>Toplam</b>	<b>600 µL</b>

Karıştırılır.

*NOT: Antibody Stain Solüsyonu içeren tüp istasyonun 2. modülüne yerleştirilmelidir.*

## **3. Modül için 3 nolu amber tüp için array Bekletmeing buffer**

### **Array holding Buffer**

<b>İçerik</b>	<b>Hacim</b>
<b>MES Stock Buffer (12X)</b>	<b>8.3 mL</b>
<b>5M NaCl</b>	<b>18.5 mL</b>
<b>Tween-20 (10%)</b>	<b>0.1 mL</b>
<b>Su</b>	<b>73.1 mL</b>
<b>Toplam</b>	<b>100 mL</b>

3. amber tüp içine 820 µL array Bekletmeing buffer konulur.

*NOT: Array Bekletmeing Buffer içeren tüp, istasyonun 3. modülüne yerleştirilmelidir.*

4. Boyalar hazırlandıktan sonra vorteks yapılır ardından spin edilir.
5. Boyalar modüllere yerleştirilir. boyama yıkama işlemi gerçekleşir.
6. Arrayler taratılır.
7. İşlem bitince istasyona “shut down” yaptırılır.

#### **4.2.4.5. Eşli kopya sayısı değişikliği veri analizi için gerçekleştirilen biyoinformatik analizler**

Eşli kopya sayısı analizleri, bünyesinde çeşitli paketler barındıran “aroma.affymetrix” R paketi ile “CRMA v2” metodu<sup>218</sup> kullanılarak gerçekleştirilmiş olup segmentasyon(circulary binary segmentation) uygulaması yine “aroma.affymetrix” paketi kapsamında bir diğer R paketi olan “DNACopy” ile gerçekleştirilmiştir. CRMA v2 metodubir önışlemeve özetleme metodu olup aşağıdaki adımlarla ham kopya sayısı hesaplama işlemleri gerçekleştirilmektedir.

##### **1. Alel problemleri arasındaki sinyal karışmasının kalibrasyonu (PMA, PMB).**

A ve B alellerinin problemleri genomda TNP'in olduğu yerde tek nükleotid açısından farklıdırlar. Bu tek nükleotidlik farklılık 2 alel sinyallerinin birbirine çok yakın olmasına ve karışmasına sebep olabilir. Bu noktada kalibrasyon yapılır.

##### **2. Normalizasyon**

Prob sinyal dağılımındaki farklılıklar normalize edilir. Bütün teknik etkiler uzaklaştırıldığı gibi sekans etkisindeki farklılıklar normalize edilir.

##### **3. Teknik tekrarlı problemlerin (PM) ve TNP problemleri için iki alelden gelen sinyallerin özetlenmesi (PM=PMA+PMB)**

##### **4. PCR fragment uzunluk etkilerinin normalizasyonu**

SNP 6.0 array'lerde DNA 2 enzimle kesilmekte ve daha sonra çoğaltılmaktadır. Kopya sayısı problemleri için sadece Nsp enzimi kullanılırken; SNP problemleri için sadece Nsp, sadece Sty ya da hem Nsp hem Sty ile kesim gerçekleştirilmektedir. Bu kesimlere ait fragmentlerin amplifikasyonun işleminde farklı uzunluktaki fragmentler farklı etkinlikte amplifiye olmaktadır. Daha da ötesi bu sistematik etki örnekten örneğe de fark göstermektedir. Bu basamakta bu etkiler normalize edilmektedir.

## 5. Kopya sayısı hesaplanması $C = \theta_{ij}/\theta_{Rj}$ ,

$$C_{ij} = 2 \frac{\theta_{ij}}{\theta_{Rj}}$$

R:referans

$\theta_{ij} = \theta_{Aij} + \theta_{ijB}$  (i örneği ve j SNP'i için A ve B alelleri sinyal toplamı)

$\theta_{Rj} = \theta_{ARj} + \theta_{RjB}$  (referans örneği ve j SNP'i için A ve B alelleri sinyal toplamı)

Ham kopya sayısı verisi elde edildikten sonra bulgularda açıklandığı üzere belli bir eşik değeri üzerindeki (0.35 gibi), belli sıklıkla görülen ve belli boyuttaki değişiklikler gibi filtreler uygulayarak daha anlamlı veri ortaya çıkması sağlanmıştır.

### 4.2.5.Parafine gömülü dokulardan ayrıştırılan tümör ve normal hücrelerden RNA izolasyonu

RNA izolasyonu, deparafinizasyon basamağı dışında Qiagen RNeasy FFPE ticari kiti (Katalog No: 74404) kullanılarak üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda yapılmıştır. Deparafinizasyon işlemi için DNA izolasyonu öncesinde gerçekleştirilen deparafinizasyon adımları takip edilmiştir. Deparafinizasyon adımı için hem kit protokolü hem uygulanan deparafinizasyon protokolü ile aynı örnekler için iki ayrı izolasyon gerçekleştirilmiş ve bu iki deparafinizasyon adımı ile gerçekleştirilen izolasyonlar sonucunda elde edilen RNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçlarında konsantrasyon ve saflık değerleri dikkate alınarak kit protokolünde yer alan deparafinizasyon adımı yerine kendi uyguladığımız deparafinizasyon adımlarının kit prosedürüne entegre edilmesine karar verilmiştir. İlgili sonuçlara bulgular bölümünde yer verilmiştir.

Qiagen RNeasy FFPE kiti (Katalog No: 74404) için izolasyon protokolü aşağıdaki gibidir.

#### **Deparaffinizasyon**

1. Deparafinize edilecek lamalar lam kutusuna yerleştirilir.

2. Lam kutularının yerleştirileceği kaplara lamlardaki doku kesitlerini aşacak şekilde ksilen eklenir.
3. Kesitler 10 dk deparafinize edilir.
4. Taze ksilen dolu kapta 2 ve 3. adımlar tekrarlanır.
5. Lam kutusu %100'lük alkol ile doldurulmuş kaba alınır ve 5 dk inkübe edilerek ksilenin uzaklaşması sağlanır.
6. 5. adım taze % 100'lük alkol dolu kapta tekrarlanır.
7. Lam kutusu alkol dolu kaptan çıkarılır ve alkolün kesitler üzerinden tamamen uçması beklenir.
8. RNaz ZAP ile temizlenmiş bistüriler yardımı ile mikroskop altında tümörlü bölgeler kazınarak hücreler RNazsız tüplere alınır.

### **Kit Protokolü**

1. Tümörlü bölgerin disekte edildiği bu tüplere 150 µl Buffer PKD ve 10 µl Proteinaz K eklenir, iyice vortekslenir.
2. 55°C' de 15 dk , ardından 80°C' de 15dk beklenir.
3. 320 µl buffer RBC eklenir.
4. Lizat iyice karıştırılır ve gDNA eliminatör spin kolona aktarılır. 30 sn 13.000 rpm'de santrifüj edilir.
5. Kolon atılır, alttaki sıvı ile devam edilir.(kolon atılmayıp %100 ve %70 lik alkol ile yıkanarak DNA izolasyonuna devam edilebilir).
6. Tüpteki sıvıya 720 µl 100% EtOH eklenir ve iyice pipetaj yapılır. Santrifüj edilmez.
7. 700 µl örnek +4°C' de bulunan RNeasy Minelute spin kolona eklenir. 15 sn 13.000 rpm'de santrifüj edilir. Alttaki sıvı atılır ve kolon aynı collection tüpe konulur.
8. Bir üstteki adım, kalan örnek ile tekrarlanır. Aynı collection tüp ile devam edilir.
9. 500 µl Buffer RPE kolona eklenir. 15 sn, 13.000 rpm'de santrifüj edilir (Membran yıkanır.) Sıvı atılır. Aynı collection tüp ile devam edilir.
10. 500 µl Buffer RPE kolona eklenir. 2 dk 13.000 rpm'de santrifüj edilir.
11. Kolon yeni 2 ml'lik collection tüpe konulur. Kolonun kapağı açılır. En yüksek hızda 5 dk santrifüj edilir (membran kuruyacak).
12. Kolon kitten çıkan 1.5 ml'lik tüpe konulur. 16 µl RNase free su, memebraña değmeden doğrudan kolona eklenir. 5 dk oda ısısında beklenir. En yüksek hızda 1dk santrifüj edilir.

13. 20. adım tekrarlanır.

14. RNA'lar -80 °C 'de muhafaza edilir.

#### **4.2.5.1.RNA'nın Spektrofotometrik Analizi ve Miktar Tayini**

İzole edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000) aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. RNA miktar sonucu ng/µl şeklinde elde edilir. RNA 260 nm dalga boyunda, protein 280 nm dalga boyunda, fenol ve diğer bileşikler ise 230 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Bu doğrultuda RNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/280 ve A230/280 oranları dikkate alınmaktadır. RNA için 260/280 oranının ~2 olması gerekmektedir. A260/ A230 oranının ise 1,8-2,2 aralığında olması beklenir. İzolasyon protokolünden kaynaklanabilen protein, fenol veya diğer kontaminatların varlığında bu değerlerbelirlenen aralığın dışında çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında da mümkün olduğunca bu oranlar için ilgili aralıklar dikkate alınmıştır.

#### **4.2.5.2.Mikrodizin Reaksiyonları için RNA Konsantrasyonunun Ayarlanması**

İzolasyon sonucunda miktarları belirlenen RNA örneklerinin konsantrasyonları, gen ifade değişim analizinde kullanılacak olan Ovation FFPE WTA Kit (Nugen ,Katalog No: 3403) protokolünde cDNA sentez reaksiyonu için gerekli başlangıç RNA miktarı olan 100 ng'ı sağlayacak şekilde ayarlanır ve -80°C'ye kaldırılır.

#### **4.2.5.3 İzole Edilen RNA Örneklerinin Bütünlük ve Kalite Analizi**

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlük analizleri, Agilent 2100 Biyoanalizörü ile RNA 6000 Nano kitleri (Katalog No: 5067-1511) kullanılarak üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

İlgili yönteme ait protokol aşağıdaki gibidir.

### **Jelin Hazırlanması**

- 1- Tüm reaktifleri kullanmadan önce 30 dakika oda sıcaklığında tutarak ısı dengesini sağlanır
  - 2- 550 ul jel matriksini spin filtresinin üst haznesine koyulur.
  - 3- 10 dakika 1500 x g de santrifüj edilir.
  - 4- 65 ul jel kitle birlikte verilen RNaz içermeyen 0.5 mL lik tüplere transfer edilir.
- Bunları 4 °C de saklayarak bir ay süresince preparasyonda kullanabilirsiniz.

### **Jel-Boya Karışımının Hazırlanması**

- 1- Tüm reaktifleri kullanmadan önce 30 dakika oda sıcaklığında tutarak ısı dengesini sağlanır.
- 2- Yüksek hızda vortekslenir ve 15 saniye santrifüj edilir.
- 3- 1 µl RNA 6000 Nano boya (mavi □) 65 ul jel karışımına eklenir.
- 4- Tüp kapatılır.İyice vortekslenir ve jel ile boyanın iyice karıştığından emin olduktan sonra tüm komponentler 4 °C de karanlık ortamda saklanır.
- 5- Tüpler 10 dakika oda sıcaklığında 13000 x g de santrifüj edilir.

### **Jel Boya Karışımını Yüklenmesi**

- 1- Tüm reaktifleri kullanmadan önce 30 dakika oda sıcaklığında tutarak ısı dengesi sağlanır. Çip priming istasyona yerleştirilir.
- 2- 9 ul jel boya karışımını işaretlenmiş ⑥ olan kuyucuğa aktarılır.
- 3- Pistonun 1 mL pozisyonunda olduğundan emin olunur sonra çip priming istasyonu kapatılır
- 4- Pistona şırınga klipi tarafından tutulana kadar bastırılır.
- 5- 30 saniye bekledikten sonra pistonu serbest bırakılır.
- 6- Pistonun 0.3 mL noktasına geldiğini gözlenir.
- 7- 5 saniye bekledikten sonra pistonu 1 mL pozisyonuna tekrar getirilir.
- 8- Çip priming istasyonu açılır.
- 9- 9 ul jel boya karışımını ⑥ işaretlenmiş olan tüm kuyucuklara aktarılır.



### **RNA 6000 Nano marker Yüklmesi**

1. Herbir 12 kuyucuğa ve ladder olarak işaretlenmiş kuyucuğa 5 ul RNA 6000 Nano işaretçi transfer edilir.
2. Hiçbir kuyucuk boş bırakılmaz yoksa çip verimli çalışmayacaktır. Boş kalan kuyucuklaraise 5 ul RNA 6000 Nano ve 1 ul örneklerin sulandırıldığı tampon eklenir.

### **Ladder ve Örneklerin Yüklmesi**

- 1- Kullanmadan önce ladder solüsyonu eritilir ve buz üzerinde muhafaza edilir.
- 2- İkincil yapı oluşumunu önlemek için örnekleri çipe yüklemeyden önce 70 °C de 2 dakika kadar denatüre edilir.
- 3- Ladder olarak işaretli olan kuyucuğa 1 ul RNA ladder yüklenir.
- 4- Herbir 12 kuyucuğa 1 ul örnek transfer edin.
- 5- Çip bu çip için üretilmiş vortekse yerleştirilir.
- 6- 2400 rpm de 60 saniye vortekslenir.
- 7- 5 dakika içerisinde çipin Biyoanalizöre yüklenmesi gerekir.
- 8- Elektrod temizleyicinin bir kuyucuğundan 350 µl RNaseZAP ile yavaşça eklenir.
- 9- Kapak açılır ve elektrod temizleyici cihazın haznesine yerleştirilir.
- 10- Kapak kapatılır ve bu şekilde 1 dakika beklenir.
- 11- Kapak açılır ve elektrod temizleyici çıkarılır. Üzerini yazarak daha sonraki kullanımlar için saklayın.
- 12- Başka bir elektrod temizleyicinin bir kuyucuğunu 350 µl RNaz içermeyen su ile yavaşça doldurulur
- 13- Kapak açılır ve elektrod temizleyici cihazın haznesine yerleştirilir.
- 14- Kapak kapatılır ve bu şekilde 10 saniye beklenir.
- 15- Kapak açılır ve elektrod temizleyiciyi çıkarılır. Üzerine not düşülerek daha sonraki kullanımlar için saklanır.
- 16- 10 saniye daha elektrolardaki suyun buharlaşması için beklenir.

### **Cipin Biyoanalizöre Yerleştirilmesi**

- 1- Biyoanalizörün kapağı açılır ve elektrod kartuşunun doğru yerleştirildiğinden emin olunur ve ayrıca çip seçicinin 1. pozisyonda olduğundan emin olunur.
- 2- Çip hazneye yerleştirilir. Çip yalnızca bir yönde yerine oturabilir.
- 3- Kapak dikkatlice kapatılır. Kartuşun elektrodları çipin kuyucuklarına oturacaktır.
- 4- 2100 Expert yazılımı size ekranda çipin yerleştirildiğini ve kapağın kapandığını gösterecektir.

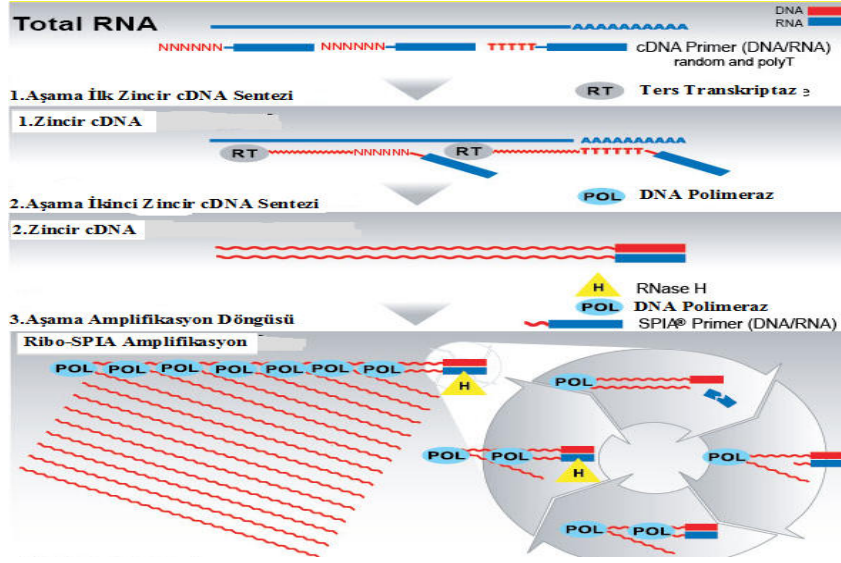
### **Cipi Koşturmaya Başlama**

- 1- “Instrument” sekmesinde deneme menüsünden uygun deneyi seçilir.
- 2- Güncel dosya adı kullanılır veya size uygun olacak şekilde değiştirilir. Veri sizin girdiğiniz şekilde kayıt edilecektir. Bu aşamada dosyanın kayıt edileceği yeri analiz edilecek numune sayısını da girebilirsiniz.
- 3- Pencerenin sağ üst köşesinde yer alan “start” ikonuna basın. Ham veri “instrument” sekmesinden görüntülenir.
- 4- Veri kazanımı sırasında numune bilgileri girilebilir. “Data file” sekmesine tıklanır ve ardından “Data and Assay” ikonları tıklanır. “Chip summary” sekmesini tıklanır. Numune bilgileri girilir ve “apply” ikonu tıklanır.
- 5- Ham sinyali görmek için tekrar “Instrument” ikonu tıklanır

#### **4.2.5.4. Gen İfade Değişim Analizleri için Gerçekleştirilen Mikrodizin Reaksiyonları**

50 sporadik kolorektal kanser vakasının tümör ve normal hücrelerinden (tümör/normal=match paired/ eşli çiftler halinde toplam 100 örnek) izole edilen RNA’lardan yapılacak olan gen ekspresyon değişimleri analizleri *Affymetrix* marka FFPE örnekler için üretilmiş “*U133\_X3Parray*’leri” aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Yapılan ön denemeler sonucunda kullanılacak cDNA sentez kiti de “*Nugen Ovation FFPE WTA* olarak belirlenmiştir. İlgili çalışmalar, Bulgular bölümünde verilmiştir.

Nugen Ovation FFPE WTA System yöntemi kısacası aşağıda belirtildiği gibidir.



Şekil 4. 5. Nugen Ovation FFPE WTA System yöntemi

Ribo-SPIA teknolojisi 50-100 ng FFPE türevli total RNA'dan 3 adımda cDNA amplifikasyonu gerçekleştirmektedir.

### İlk zincir cDNA sentezi

İlk zincir cDNA sentezi total RNA'dan DNA/RNA kimerik primer karışımı ve ters transkriptaz enzimi kullanılarak hazırlanır. Primerler hem Poly A dizisine hem de transkripte rastgele hibridize olan DNA bölümlerine sahiptir. Ters transkriptaz enzimi bu primerlerden ilk zincir cDNA'yı oluşturur ve bir cDNA/mRNA hibrid molekülü meydana gelir. Bu hibrid molekül cDNA dizisinin 5' ucunda bir RNA dizisine sahiptir.

### DNA/RNA Heterodupleks Çift Zincir Sentezi

cDNA/mRNA kompleksindeki mRNA'nın fragmentasyonu DNA Polimeraza ikinci zinciri sentezlemek için başlangıç noktası yaratır. Burası ilk zincir kimerik primerlerindeki 5' diziye tamamlayıcı DNA dizisi içerir. Sonuçta bir ucunda DNA/RNA heterodupleksini içeren çift zincirli cDNA oluşur. Bu aşamadan sonra bead pürifikasyonu yapılarak temizleme işlemi gerçekleştirilir.

## **SPIA Amplifikasyonu**

SPIA, Nugen tarafından geliştirilen güçlü bir izotermal dizi yerdeğişimi amplifikasyon işlemidir. Bu homojen izotermal deneyde DNA/RNA kimerik SPIA primeri, DNA polimeraz enzimi ve RNaz H kullanılmaktadır. RNaz H enzimi, cDNA'nın 5' ucundaki DNA/RNA heterodubleksindeki RNA'yı degrade eder ve böylece ilk SPIA primerinin bağlanabileceği bir DNA dizisi ortaya çıkar ve daha sonra DNA polimeraz primerin 3' ucundan replikasyonu başlatır. Yeni oluşan dizinin 5'ucundaki RNA kısmı yine RNaz H ile uzaklaştırılır ve diğer döngüdeki cDNA sentezi için başlangıç noktası ortaya çıkar. Böylece reaksiyon devam eder ve SPIA cDNA birikimi gerçekleşir.

Bu adım tamamlandıktan sonra tekrar bir pürifikasyon yapılır ardından örnekler fragmente edilir, işaretlenir ve *array*'e hibridize edilir.

## **İLK ZİNCİR cDNA SENTEZİ**

1. İlk zincirprimer, İlk zincir buffer karışımı, ilk zincir enzim karışımı ve nükleaz içermeyen su  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılır.
2. Enzim spin edilir hemen buz üzerine alınır.
3. Enzim dışında diğer reaktifler oda ısısında çözülmeli. Reaktifler vorteks ile karıştırılır, spin edilir ve buz üzerine alınır. Su oda ısısında bırakılır.
4. Primerden 2 ul alınır 0.2 mlPZR tüpüne koyulur.
5. 5  $\mu\text{L}$  total RNA örneği (50 -100 ng) primer üzerine eklenir.
6. 5 kez pipetaj yapılır spin edilir ve buz üzerine alınır.
7. Tüp önceden ısıtılmış PZR cihazı'na koyulur.

**Primer Bağlanması:  $65^{\circ}\text{C} - 2 \text{ dk} \rightarrow 4^{\circ}\text{C}$  bekletme**

8. Tüpler cihazdan alınır ve buza koyulur.
9. İlk zincir cDNA sentez karışımı aşağıda tek örnek için değerleri verilen tabloya göre hazırlanır.

<b>İlk Zincir Buffer Karışımı</b>	<b>2.5 µl</b>
<b>İlk Zincir Enzim Karışımı</b>	<b>0.5 µl</b>
<b>Toplam</b>	<b>3 µl</b>

10. Hazırlanan karışım pipetaj yapılarak karıştırılır, spin edilir ve buz üzerine alınır.

11. 3 µL of ilk zincir reaksiyon karışımı tüpe eklenir.

12. 5 kez pipetaj yapılır spin edilir ve buz üzerine alınır.

13. Tüpler önceden 4°C'e getirilmiş PZR cihazı cihazına koyulur ve ilk zincir cDNA sentez programı çalıştırılır.

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
<b>4°C</b>	<b>2 dk</b>
<b>25°C</b>	<b>30 dk</b>
<b>42°C</b>	<b>15 dk</b>
<b>4°C</b>	<b>Bekletme</b>

14. Program bitince tüpler cihazdan alınır ,spin edilir ve buza koyulur.

15. Hemen ikinci zincir cDNA sentez adımına geçilir.

### **İKİNCİ ZİNCİR cDNA SENTEZİ**

1. İkinci zincir buffer karışımı ve ikinci zincir enzim karışımı –20°C 'den çıkarılır.

2. Enzim spin edilir hemen buz üzerine alınır.

3. Bufferoda ısısında çözülür. Vorteks ile karıştırılır, spin edilir ve buz üzerine alınır.

4. İkinci zincir cDNA sentez karışımı aşağıda tek örnek için değerleri verilen tabloya göre hazırlanır.

<b>İlk Zincir Buffer Karışımı</b>	<b>9.7 µl</b>
<b>İlk Zincir Enzim Karışımı</b>	<b>0.3 µl</b>
<b>Toplam</b>	<b>10 µl</b>

5. Hazırlanan karışım pipetaj yapılarak karıştırılır, spin edilir ve buz üzerine alınır.
6. 10 µL ikinci zincir reaksiyon karışımı her bir ilk zincir reaksiyon karışımı tüpü üzerine eklenir.
7. 5 kez pipetaj yapılır, spin edilir ve buz üzerine alınır.
8. Tüpler önceden 4°C'e getirilmiş PZR cihazı cihazına koyulur ve ikinci zincir cDNA sentez programı çalıştırılır.

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
<b>4°C</b>	<b>1 dk</b>
<b>25°C</b>	<b>10 dk</b>
<b>50°C</b>	<b>30 dk</b>
<b>80°C</b>	<b>20 dk</b>
<b>4°C</b>	<b>Bekletme</b>

9. Program bitince tüpler cihazdan alınır, spin edilir ve hemen ikinci zincir cDNA purifikasyon (Agencourt RNAClean XP beads) adımına geçilir.

### **cDNA Purifikasyonu**

*Prosedüre başlamadan önce Agencourt RNAClean XP beadlerin oda ısısına geldiğinden emin olunur.*

1. Taze 70% etanol hazırlanır.
2. Bead tüpü ters düz edilerek iyice karıştırılır ve homojen görüntüye kavuşması sağlanır.
3. Oda ısısında 32 µL (1.6 volumes) bead her bir örnek tüpüne eklenir ve 10 kez pipetaj yapılır.

4. Oda ısısında 10 dk inkübe edilir.
5. Tüpler magnete yerleştirilir ve 5 dk inkübe edilir. Bead solüsyonunun berraklaşması beklenir. (Beadler tüp duvarına yapışacaktır).
7. Tüpler magnet üzerinde iken 45 µL binding buffer pipet ile çekilir. Geride bir miktar buffer kalabilir bu sayede bead kaybı azalır.
8. Tüpler magnet üzerinde iken 200 µL taze hazırlanmış 70% etanol eklenir ve 30 sn beklenir.
9. Pipetle alkol uzaklaştırılır.
10. Yıkama adımı 2 kez tekrarlanır.Son yıkamada alkolün mümkün olduğunca uzaklaşması için 2 kere pipetle çekilebilir.
11. Magnet üzerinde tüpler 15-20 dk hava yardımıyla kurutulur. Bütün alkolün evapore olması istenir.
12. cDNA 'lar bead üzerindeyken hemen SPIA amplifikasyon adımına geçilir.

### **SPIA Amplifikasyonu**

*Enzim baloncuk oluşturmadan iyice karıştırılmalıdır.*

1. SPIA Buffer karışımı, SPIA Primer karışımı, SPIA Enzim karışımı –20°C 'den çıkarılır.
2. Enzim, buz üzerinde eritilir. Tüp 5 kez alt üst ederek karıştırılır,spin edilir ve buz üzerine alınır. Enzimin baloncuk oluşturmadan iyice karıştığından emin olunur.
3. Primer karışımı ve buffer karışımı oda ısısında eritilir, vortekslenerek karıştırılır, spin edilir ve buz üzerine alınır.
4. Sırasıyla aşağıdaki tabloda tek örnek için verilen değerlere göre buffer karışımı, primer karışımı ve enzim kombinlenerek bir reaksiyon karışımı hazırlanır. Karışım pipetaj yardımıyla karıştırılır, spin edilir ve buz üzerine alınır. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan hemen sonra kullanılmalı.

<b>SPIA Buffer Karışımı</b>	<b>80 µl</b>
<b>SPIA Primer Karışımı</b>	<b>40 µl</b>
<b>SPIA Enzim Karışımı</b>	<b>40 µl</b>
<b>Toplam</b>	<b>160 µl</b>

5. 160 µL SPIA reaksiyon karışımı beadlere bağlı çift zincirli cDNA'ları içeren tüplere koyulur.
6. 80 µL 'ye ayarlı pipet yardımıyla 8-10 kez pipetaj yapılır. SPIA reaksiyon karışımının eklenmesiyle cDNA'lar beadlerden elue olurlar.
7. Reaksiyon hacminin yarısı (80 µL) ikinci bir tüpe bölünür.
8. Tüpler önceden soğutulmuş PZR cihazı cihazına koyulur . program aşağıdaki gibidir.

Sıcaklık	Zaman
4°C	1 dk
47°C	60 dk
95°C	5 dk
4°C	Bekletme

9. Program bitince tüpler PZR cihazı cihazından alınır, spin edilir ve buz üzerine alınır. Tüplerin kapakları bir daha pre-amplifikasyon alanında açılmaz.

**Not:** Eğer SPIA cDNA pürifikasyon adımı Agencourt RNAClean XP metodu kullanılacaksa 9-12 adımları atlanır ve doğrudan pürifikasyon metodu uygulanır. Alternatif pürifikasyon metodları uygulanıyorsa 9. adımdan devam edilir. **Bu tez çalışmasında Qiagen QiaQuick kitini kullanıldığı için 9. adımdan devam ettim.**

10. İki tüpe bölünen örnekler birleştirilir.
11. Tüpler magnete yerleştirilir ve 5 dk bead solusyonu iyice berraklaşana kadar beklenir.
12. Elüe cDNA içeren berraklaşmış süpernatantlar temiz tüplere alınırlar. (beadler uzaklaşmış olur).
13. Hemen SPIA cDNA pürifikasyon adımına geçilir ya da SPIA cDNA'lar -20°Cde saklanır

#### **QIAGEN QIAquick PZR Purification Kit ile SPIA cDNA PÜRİFİKASYONU** **Kit Kat. No:28106**

- Bütün santrifüj adımları oda ısısında ve 17,900 X g (13,000 rpm) de gerçekleştirilir.



**PROTOKOL** (Not: Prosedürdeki değerler tek örneklidir)

1. Temiz bir 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne 800 µL Buffer PB eklenir.
2. 160 µL SPIA cDNA PB buffer üzerine eklenir.
3. 5 sn vorteks ile karıştırılır ardından spin edilir.
4. QIAquick spin kolonlar toplama tüplerine yerleştirilir ve etiketlenir.
5. 480 µL örnek buffer karışımı kolona yüklenir.
6. 1 dk 17,900 X g 'de santrifüj edilir.
7. Altta kalan sıvı atılır ve kolon aynı toplama tüpüne yerleştirilir.
8. Kalan 480 µL örnek aynı kolona yüklenir.
9. 1 dk 17,900 X g 'de santrifüj edilir.
10. Altta kalan sıvı atılır ve kolon aynı toplama tüpüne yerleştirilir.
11. 700 µL 80% etanol kolona eklenir.
12. 1 dk 17,900 X g 'de santrifüj edilir.
13. Altta kalan sıvı atılır ve kolon aynı toplama tüpüne yerleştirilir.
14. 11-13. adımlar tekrarlanır.
15. 2 dk 17,900 X g.de boş çevrilir.
16. Alttaki sıvı toplama tüpüyle birlikte atılır. Kolon kısmı temiz bir kurutma kağıdına değdirilir. Fazla kalan alkol bu kağıda emdirilir.
17. Kolonlar temiz 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilir.
18. 15-16 µL oda ısısındanükleaz içermeyen sukolonun merkezine eklenir.
19. 5 dk oda ısısında beklenir.
20. 1 dk 17,900 X g 'de santrifüj edilir.
21. 18-20. adımlar tekrarlanır
22. Örnek vortekslenerek karıştırılır ve spin edilir.
23. SPIA cDNA nanodropta ölçülür (ssDNA biriminde- A260 unit = 33 µg/ml) sonrasında -20°C'de muhafaza edilir.

**Fragmentasyon ve İşaretleme**

**EncoreBiotin Module (NUGEN, Kat No:4200)**

Fragmentasyon adımında tek zincir cDNA ürünü 50-100 baz aralığında enzimatik ve kimyasal olarak fragmente edilir.

İşaretleme adımında fragmente cDNA'nın 3' hidroksil ucuna enzimatik olarak biyotin takılır.

### Önemli Notlar:

- Bütün malzemeler  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmalıdır. Encore Biotin Module kuru buzda gelir. Çok uzun süre  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmemelidir. Kitin performansını düşürür
- 260/ purified SPIA cDNA must be  $>1.8$ .
- İşaretlenmeyen cDNA ürünü fragmenteasyon ve işaretleme işlemlerinden önce 6 aya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanabilir.
- Aksi belirtilmedikçe eritilen reaktifler hemen buz üzerine alınmalıdır.
- Buffer'lar eritildikten ve karıştırıldıktan sonra herhangi bir çöküntü gözlenirse çözdürülür. Buffer berrak olmalı. Kısa bir vorteksdan sonra oda ısısında 2 dk bekletilir. Primer ve enzimkarışımları ısıtılmamalı.
- Her zaman tüpleri bloğa yerleştirmeden önce PZR cihazı'nın başlangıç inkübasyon ısısına ulaştığına emin olun. Kapak ısıları  $100^{\circ}\text{C}$  olmalı.
- FL3 labeling buffer pembe renk görülebilir. Bu normal bir durumdur.
- İşaretleme master mix düşük hızda spin edilir. Yüksek hızda yapılan spin uzun periyotta çöküntü oluşmasına neden olabilir.
- Küçük hacimler için birkaç kez pipetaj yapılarak reaktifin tamamen transfer edildiğinden emin olunur.

### Fragmentasyon, işaretleme, son hibridizasyon reaksiyonları için gerekli cDNA Miktarı

Kit	Her Reaksiyon için Gerekli cDNA Miktarı	Son Hibridizasyon Kokteyl Konsantrasyonu
WT-Ovation FFPE System V2 Kat No:3400	4-5 $\mu\text{g}$	18-23 ng/ $\mu\text{l}$

**ÖNEMLİ NOT:** *Yapılan denemeler sonucunda tez çalışmasında fragmentasyon reaksiyonu için 3,5  $\mu\text{g}$  cDNA kullandık. İlgili sonuçlara bulgular bölümünde yer verilmiştir.*

## Fragmentasyon Protokol

**Önemli not:** Reaksiyona başlamadan önce Fragmentasyon reaksiyonunua koyulacak olan pürifiye SPIA cDNA 4-5 µg olacak şekilde toplam 25 µL olacak şekilde ayarlanır. Biz tezimde 25 µL de 3,5 µg olacak şekilde çalışıyoruz. Pürifiye cDNA'dan 3,5 µg alınır, hacim 25 µL den az ise su ile 25 µL'ye tamamlanır. Fazla ise vakum cihazı ile suyu uçurulur. Reaksiyon için uygun hacme gelmesi sağlanır.

### Örnek hesap:

#### 08-79 Tumor örneği için

#### 10-21 Tümör örneği için

27 ul de 4,80 ug varsa

veya

1 ul de

154,37 ng varsa

X ul 3,5 ug

x ul 3500 ng

**X=19,7 ul+5,3 ul su=25 ul toplam hacim hacim**

**X= 22,7 ul+2,3 ul su=25 ul toplam**

1. Fragmentasyon Buffer karışımı ve Fragmentasyon enzim karışımı-20°C'den alınır.
2. Fragmentasyon buffer oda ısısında eritilir, 2sn vorteks ile karıştırılır, 2 sn spin edilir ve buz üzerine alınır.
3. Enzim, 3 kez döndürülerek karıştırılır, 2 sn spin edilir ve buz üzerine alınır.
4. Aşağıda tek örneklik için değerleri verilen enzim ve buffer ile karışım hazırlanır.

<b>İlk Zincir Buffer Karışımı</b>	<b>5 µl</b>
<b>İlk Zincir Enzim Karışımı</b>	<b>2 µl</b>
<b>Toplam</b>	<b>7 µl</b>

5. Karışım pipetaj ile karıştırılır ve spin edilir. Ardından buza alınır. Fragmentasyon karışımı hazırlandıktan hemen sonra kullanılmalıdır.
6. Fragmentasyon reaksiyonunua koyulacak olan pürifiye SPIA cDNA 4-5 µg olacak şekilde toplam 25 µL olacak şekilde ayarlanır. Biz tezimde 25 µL de 3,5 µg olacak şekilde çalışıyoruz.
7. Hazırlanan 7 µL fragmentasyon reaksiyonkarışımı her bir örneğin üzerine eklenir.
8. 8-10 kez iyice pipetaj yapılarak karıştırılır.
9. 2 sn vortekslenir, 2 sn spin edilir.

10. Tüpler önceden sıtılmış PZR cihazı cihazına yerleştirilir. Program aşağıdaki gibidir.

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
<b>37°C</b>	<b>30 dk</b>
<b>95°C</b>	<b>2 dk</b>
<b>4°C</b>	<b>Bekletme</b>

11. Tüpler cihazdan alınır ,2 sn spin edilir ve hemen buz üzerine alınır. Ardından vakit kaybetmeden işaretlem adımına geçilir.

### **İŞARETLEME PROTOKOLÜ**

1. İşaretleme buffer karışımı, işaretleme reaktifi ve işaretleme enzim karışımı – 20°C’den çıkarılır.
2. Tüm reaktifler hemen buza alınır.
3. Buffer ve işaretleme reaktifi oda ısısında eritilir. 2 sn vortekslenir ve ardından 2 sn spin edilir. Reaktifler buza alınır.
4. Enzim 3 kez alt üst edilerek karıştırılır. 2 sn spin edilir ve buza alınır.
5. Sırasıyla aşağıdaki tabloda tek örnek için verilen değerlere göre buffer karışımı, reaktif ve enzim kombinlenerek bir reaksiyon karışımı hazırlanır.

<b>İşaretleme Buffer Karışımı</b>	<b>15 µl</b>
<b>İşaretleme Reaktifi</b>	<b>1.5 µl</b>
<b>İşaretleme Enzim Karışımı</b>	<b>1.5 µl</b>
<b>Toplam</b>	<b>18 µl</b>

6. Karışım pipetaj yardımıyla karıştırılır, spin edilir ve buz üzerine alınır. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan hemen sonra kullanılmalı.
7. 18 µL işaretleme reaksiyon karışımı her bir fragmente edilmiş cDNA üzerine eklenir.
8. 8-10 kez iyice pipetaj yapılarak karıştırılır.
9. 2 sn vortekslenir, 2 sn spin edilir.

10. Tüpler önceden ısıtılmış PZR cihazı cihazına yerleştirilir. Program aşağıdaki gibidir.

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
<b>37°C</b>	<b>60 dk</b>
<b>70°C</b>	<b>10 dk</b>
<b>4°C</b>	<b>Bekletme</b>

12. Tüpler cihazdan alınır ,2 sn spin edilir ve hemen buz üzerine alınır.

13. İşaretli cDNA'lar hemen hibridizasyon reaksiyonu için kullanılır ya da -20°C' alınır.

### **HİBRİDİZASYON**

**Önemli Notlar:** Affymetrix 3'IVT kit protokolünden farklı olarak NUGEN Encore Biotin kiti denatürasyon basamağını 99°C 'de 2 dk yaptırmaktadır. Ayrıca hibridizasyon süresini 18 saat ± 2 saat şeklinde öneriyor. Bu tez çalışmasında hibridizasyon süresi 19 saat olarak belirlenmiştir.

Yıkama programı olarak EukGE-WS2v4\_450 kullanılmaktadır.

20X Hibridizasyon kontrolü 65°C'de 5 dk PZR cihazı cihazında inkübe edilir (1 kez yapmak yeterli). Ardından kullanılan miktara göre bölünerek saklanır.

Arrayler kullanılmadan önce oda ısısına gelmesi sağlanır.

### **Protokol**

➤ Deneye başlamadan önce ısı blokları belirtilen sıcaklık değerlerine ayarlanır ve ısınmaları sağlanır. Kullanılmadan önce hibridizasyon fırını 50°C' e ayarlanır ve 60 rpm'de dönmesi sağlanarak en az 1 saat ön ısıtma yapılır.

1. Tabloda tek örnek için verilen değerlere göre ilgili reaktifler kombinlenerek bir reaksiyon karışımı hazırlanır.

RNAzsız su	19 µl
% 100 DMSO	22 µl
2X HibridizasyonBuffer	110µl
Asetile BSA(50 mg/ml)	2,2µl
HsDNA (10 mg/ml)	2,2µl
20X Hibridizasyon kontrol	11 µl
Kontrol oligonükleotid B2(3nM)	3,7 µl
Fragmented edilmiş, işaretlenmiş cDNA	50 µl
Toplam	220µl

2. Hazırlanan hibridizasyon kokteyli 99°C 2 dk ısı bloğunda inkübe edilir.
3. Bu arada oda ısısına getirilen ve etiketlenen arrayler 200µl (X3P array için) 1X Hibridizasyon buffer (pre-hibridizasyon buffer) ile ıslatılır(ortam hazırlama). Hava kabarcığı yapmamaya dikkat edilir. Daha sonra arrayler 45°C ısıtılan hibridizasyon fırınına yerleştirilir ve 10 dk 60rpm de inkübe edilir.
4. Hibridizasyon kokteyli 45°C ısı bloğuna alınır ve 5 dk inkübe edilir.
5. Hibridizasyon kokteyli 45°C ısı bloğundan alınır ve mikrosantrifüjde maksimum hızda 5 dk spin edilir.
6. Santrifüjün ile arraylerin prehibridizasyon bufferi ile muamelesi eş zamanlı olarak biter. Arraylerfırından alınır.İçlerindeki 1X prehibridizasyon buffer'ler çekilir. Örnekler arraylere yüklenir.
7. Örnekleri içeren arrayler hibridizasyon fırınına karşılıklı olarak dengede olacak şekilde yerleştirilir. **19 saat 45°C 60rpm'de hibridize edilirler.**

### **YIKAMA BOYAMA ve TARAMA**

Ekspresyon arraylerde boyama 3 aşamada gerçekleşir.

Boyama1. SAPE aşaması

Boyama 2. Antikor amplifikasyon adımı

Boyama 3. SAPE ile son boyama

➤ Yıkama, boyama veya taramadan önce arrayler mutlaka oda ısısında olmalı. +4 de bekletildiyse oda ısısına gelmesi beklenmelidir.

1. 19 saat hibridizasyondan sonra arraylerdeki hibridizasyon kokteyli çekilir. Yerine 200µl Wash A eklenir.

2. Boyama reaktifleri aşağıdaki gibi hazırlanır. Her örnek için 3 amber tüp hazırlanır. SAPE boyama solüsyonu hazırlanır. 1 ve 3 nolu amber tüplere eşit olarak bölünür. 3 nolu tüpe de antikor solüsyonu hazırlanır.

3. Boyama Reaktiflerinin Hazırlanması

Bir array için gerekli miktarlar aşağıdaki gibidir:

#### SAPE BOYAMA SOLÜSYONU

Streptavidin Phycoerythrin(SAPE) +4°C de karanlıkta saklanmalıdır. Kullanmadan önce iyice karıştırılmalı. SAPE boyama solüsyonu her zaman taze ve amber tüplere hazırlanmalıdır.

SAPE solüsyon karışımı hazırlanır.

2X Stain Buffer	600µl
50mg/ml BSA	48µl
1mg/ml Stre ptavidin Phycoerythrin(SAPE)	12µl
Distile su	540µl
Toplam	1200 µl

4. 1 nolu amber tüpe bu 1200µl'lik solüsyon hazırlanır. İyice vortekslenir. Ardından 3-4 sn spin edilir. 3 nolu tüpe 600 µl'si bölünür. Yani 1 ve 3 nolu tüpte 600 µl SAPE solüsyonu bulunur.

5. 2 nolu amber tüpede antikor solüsyon karışımı hazırlanır.

Antikor solüsyon karışımı;

2X Stain Buffer	300µl
50mg/ml BSA	24µl
10mg/ml Gold IgG Stock	6µl
0,5mg/ml biotinylated Ab	3,6µl
Distile su	266,4µl
Toplam	600µl

6. Hazırlanan 3 tüp vortekslenir ve ardından spin edilir.
7. Boyalar yıkama istasyonundaki modüllere sırasıyla (1,2,3) yerleştirilir.
8. Cihaz prime ettirilmiş hazırdır. Deneyler ve isimleri “Console” ‘da “administrator”“quick registration” sekmesinden girilir.
9. Yıkama Protokolü: EukGE-WS2v4 protokolünü “Console” otomatik seçer.
10. Launcher → AGCC Fluidics Control → Sample file name ‘den daha önce ismi girilen deney seçilir.
11. Probe Array type: U133\_X3P seçilir. Protocol bölümü otomatik olarak EukGE-WS2v4 olarak seçilir.
12. Run tıklanır.
13. Yıkama istasyonundaki komutlar takip edilir.
14. Arrayler taratılır

#### **4.2.5.5.Eşli mikrodizin gen ifade değişikliği veri analizi için gerçekleştirilen biyoinformatik analizler**

Mikrodizin gen ifade analizi verilerinin istatistiksel değerlendirilmesinde önışleme uygulamaları açık bir yazılım platform olan “R” üzerinde uygulanmış olup yapılan karşılaştırmalarda farklı olarak ifade edilen gen setlerinin tespiti; paired t-test ile kümeleme analizi ise hiyerarşik yöntem ile matlab programlama dilinde yazılmış kodlar aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Gen ontoloji ve yolak analizleri ise “DAVID” yazılımı aracılığı ile değerlendirilmiştir.



#### 4.2.5.5.1.Önişleme

Mikrodizin gen ifade verisi GC-RMA (GCRobust Multiarray Averaging) metodu<sup>219</sup> kullanılarak R platformunda önişleme uygulamasına tabii tutulmuştur. Bu algoritmada önişleme; arkaplan düzeltme, normalizasyon ve özetleme basamakları ile gerçekleştirilmektedir. GC-RMA, RMA'nın gelişmiş formu olmakla birlikte daha kesin gen ifade verisi elde etmede GeneChip problemlerinde yanlış bağlanmaları hesaplamada prob afinitesinden yararlanarak sekans bilgisini kullanmaktadır.

Spotlardan gelen sinyaller çoğu zaman sadece veriye ait olmayıp; işaretli örneklerin spesifik olmayan bağlanmaları, yıkama aşamasından kaynaklı artıklar ve tarayıcı kaynaklı optik gürültü sebebiyle bir arka plan gürültüsünü de barındırmaktadır. Doğru veri analizinde "background correction" başlığı altında bu gürültü elemine edilmiştir. Quantile normalizasyon kullanılarak teknik farklılıkları uzaklaştırılıp arrayler karşılaştırılabilir hale getirilmiştir. Her gen, prob seti dediğimiz 11-20 arasında değişen sayıda prob ile ifade edildiğinden özetleme aşamasında aynı prob setindeki problemlerin intensite değerleri "median-polish" algoritması ile tek bir ifade değeri verecek şekilde özetlenmiştir.

#### 4.2.5.5.2.Farklı olarak ifade edilen genlerin tespit edilmesi

Mikrodizin çalışmalarında ön işleme uygulaması yapıldıktan sonra, gen ifade veri analizi dört ayrı basamak ile gerçekleştirilmiştir.

1. Paired T-testi
2. Varyans filtreleme
3. Çoklu test düzeltmesi (Multiple Test Correction)
4. Kat değişimi (Fold change)

Tez çalışmasında eşli tümör ve normal örnekler olduğu için bu 2 grubun karşılaştırılmasında paired t test kullanılmışken eşli çiftler içermeyen (Grade III-Grade II gibi) karşılaştırmalarda t-test kullanılmıştır. Uygulamada gen ifadeleri arasında gerçek

farklılığı göstermek için array'ler arasında düşük varyanslı genler filtrelenmiştir. Mikrodizinlerde bir diğer uygulama çoklu test düzeltmesidir.

Mikrodizin gen ifade sistemleri ile binlerce genin analizi yapılabilmektedir. Belirlenen şartlarda genlerin ifade profilleri ölçülürken her gen bir diğerinden bağımsız olarak düşünülmektedir. Bir başka deyişle t-test veya anova her gen için ayrı ayrı yapılmaktadır. Bu noktada yanlış pozitif oranı da yapılan test sayısı ile doğru orantılı olarak artmakta olup çoklu test düzeltmesi devreye girmektedir ve p değeri düzenlenmektedir. Çoklu test düzeltme metodları içinden bu tez çalışması için 'Benjamini and Hochberg False Discovery Rate' yöntemini tercih edilmiştir. Buna göre, çalışmada genel olarak ayarlanmış p değeri değeri 0.001'in altında olan genler diferansiyel ifade düzeyleri anlamlı olarak secildiğinde, bu secilen gruptaki yanlış pozitiflik oranı (FDR) da %1'den düşük olacak şekilde kontrol edilmiş olmaktadır.

Mikrodizin çalışmalarında hipotez ve sonuçlar çerçevesinde istatistiksel anlamlılık yanında kat değişimi açısından da belli bir eşik değeri belirlenip ifadesi artan ve azalan genler için o eşik değerinin üstündeki ve altındaki genler değerlendirilmeye alınmaktadır. **Bu tez çalışmasında genellikle  $p < 0.001$  istatistiksel anlamlılıktaki 2 kat değişim gösteren genler ile çalışmaya devam edilmiştir.**

#### 4.2.5.5.3. Kümeleme analizi

Kümeleme analizi gen ifade değerlerini analizlerinde sık kullanılan bir tekniktir. Kümeleme analizinde genel olarak öğeler arasındaki ilişkinin derecesine göre bu öğeler gruplara ayrılmaktadır. Öğeler arasındaki ilişkinin derecesi yüksek ise bunlar aynı grupta yer alacaklar iken; ilişki düşük ise aynı grubun elemanları olmayacaklardır. Bu tez çalışmasında denetimsiz kümeleme (unsupervised) metodlarından hiyerarşik kümeleme analizi uygulanmıştır. Hiyerarşik kümeler ağaçlar şeklinde organize edilmiş iç içe geçmiş alt kümelerden oluşmaktadır. Bu analiz, genlerin benzer ifade profillerine göre gruplandırılmasını içermektedir. Bu gruplandırma için uzaklık bilgisi kullanılmaktadır. Kümeleme analizinde uzaklık ölçüsü olarak Öklid uzaklık ve yöntem olarak da average Linkage" kullanılmış olup hem gen hem de örnek bazlı kümeleme işlemi uygulanmıştır.

#### 4.2.5.5.4.Gen ontoloji, zenginleşme ve yolak analizleri

Gen ontoloji (GO) terimleri, zenginleşme ve KEGG yolak analizleri “DAVID” yazılımı üzerinden Fisher’s exact test uygulanarak gerçekleştirilmiştir.DAVID entegre edilmiş bir veritabanı olmakla birlikte geniş gen veya protein listelerindeki biyolojik anlamın çıkarıldığı sistematik bir analitik araçtır (220). DAVID yazılımı ile kullanıcının genlerinin isim listesi çıkarılabilir, genlerin fonksiyonel sınıflandırılması yapılabilir, kullanıcının gen listesinde zenginleşmiş anotasyon terimleri elde edilebilir ve bu gen listesinde fonksiyonel olarak benzer terimler kümelendirilebilmektedir. Bir başka deyişle listedeki genler nelerdir, listedeki major gen aileleri nelerdir, gen listesinde hangi anotasyon terimleri ve grupları zenginleşmiştir, listedeki genler için hangi yollar ön plandadır ve tek tek genler hangi yollarda yer almaktadır, listedeki genler hangi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir gibi sorulara cevap alınabilmektedir.

Bu tez çalışmasında DAVID ile fonksiyonel anotasyon kümelendirme modülünden yararlanılmış olup KEGG yolak analizleri de gerçekleştirilmiştir. Bu analiz ile tüm zenginleşmiş (önemli) anotasyon terimleri sıralanmaktadır. Bu sıralama için zenginleşme skorundan (enrichment score) yararlanılmaktadır. DAVID zenginleştirme skorunun anlamlılığının hesaplanmasında modifiye Fisher exact test kullanmakta olup p değeri (ease score) ile ifadelendirilmektedir. Hesaplanmada gerçekleştirdiği değerlendirmeye kinaz genleri üzerinde şu şekilde verilebilir. DAVID farklı olarak ifade edilen gen listemizdeki genlerin ontolojilerini değerlendirdikten sonra bu listedeki genlerin ne kadarının kinaz olduğunu belirler ve ardından tüm kinazların genomdaki oranını hesaplar ve son olarak bu iki değerlerin birbirine oranı belirlenir. Sonuçta  $p < 0.05$  ise kinazların bu çalışmadaki anlamının tesadüfü olmadığı; bir zenginleşme yani önemli olma durumunun söz konusu olduğu ortaya çıkmaktadır.

Daha yüksek skordaki grup, o anotasyon terimi üyelerinin daha çok zenginleştiği yani daha çalışmada daha önemli rol oynadığı anlamına gelmektedir. Bu noktada bu skor için verilen eşik değeri  $\geq 1.3$ ’dür. Bununla birlikte bu skorun altındaki gruplarında önemli olabileceği ve değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Bu çerçevede tez çalışmasında değerlendirilen fonksiyonel anotasyon kümeleri için bu skorun üstündeki gruplar incelendiği gibi altındaki kümeler de gen içeriklerine göre potansiyelleri

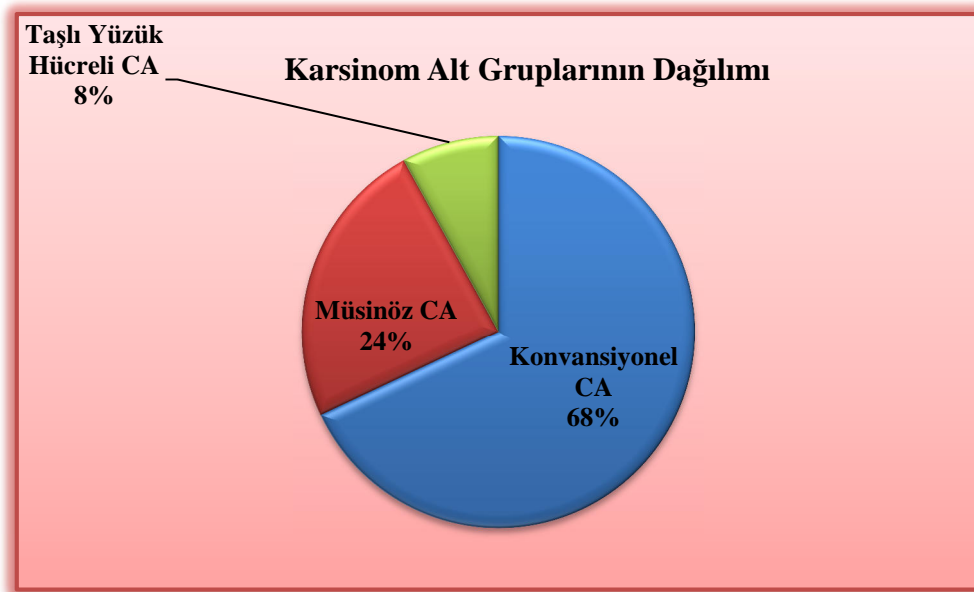
değerlendirilmiştir. Elde edilen farklı olarak ifade edilen gen setinin biyolojik anlamını çıkarmada DAVID sonrası analizlerde takip edilen yol bulgular bölümünde açıklanmıştır.

## 5.ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışması kapsamında sonuçlar histopatolojik, demografik ve klinikopatolojik bulguların ardından gen ifade analiz bulguları, kopya sayısı değişikliği analiz bulguları ve bu iki başlığın entegrasyonu olmak üzere altı ayrı ana başlık altında sunulmaktadır.

### 5.1.Histopatolojik Bulgular

Tez çalışmasına katılan toplam 50 olgunun tamamı karsinomlardan oluşmuştur. Olgular 2010 WHO sınıflamasına göre klasifiye edildiğinde, karsinomların % 72'sinin (n=34) Konvansiyonel CA, % 22'sinin (n=12) müsinöz adenokarsinom ve % 6'sının (n=4) taşlı yüzük hücreli adenokarsinomdan oluştuğu görülmektedir (Şekil 5.1.).

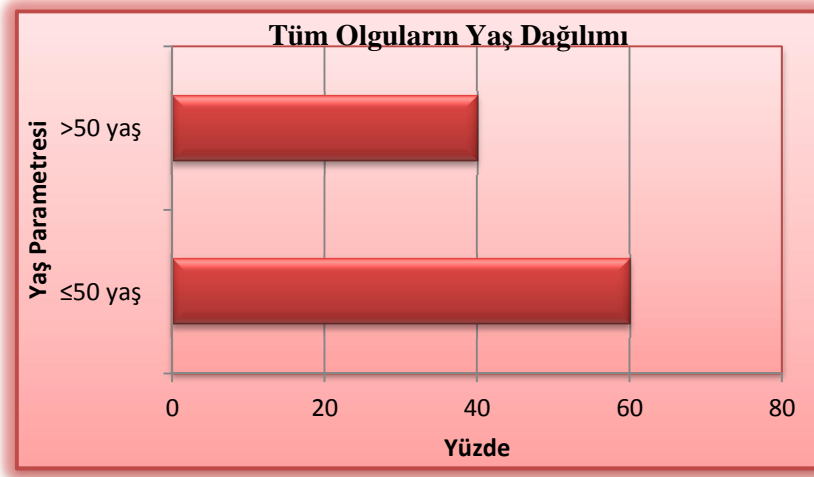


Şekil 5.1. Karsinom olgularında alt grupların dağılımı

## 5.2. Demografik Bulgular

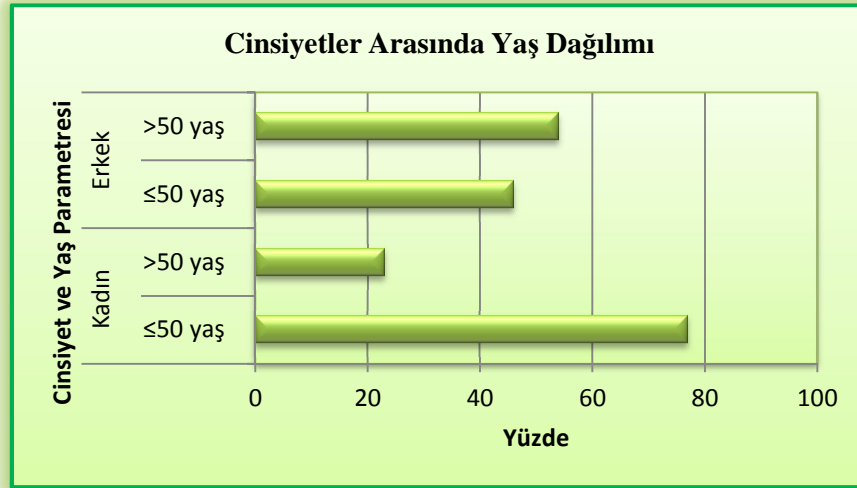
### 5.2.1. Yaş

Olguların yaş dağılımı 18-80 arasında olup, ortalama yaş 45,28'dir. Erken ve geç yaşta görülme durumlarını değerlendirebilmek adına kolorektal kanser olguların görülme yaşı olarak kanserin en sık görüldüğü yaş grubu 50 dikkate alınarak olgular  $\leq 50$  yaş ve  $>50$  yaş olarak 2 gruba ayrılmıştır. Buna göre olguların toplamda %60'ı (n=30)  $\leq 50$  yaş olup; %40'ı (n=20)  $>50$  yaştır (Şekil 5.2.).



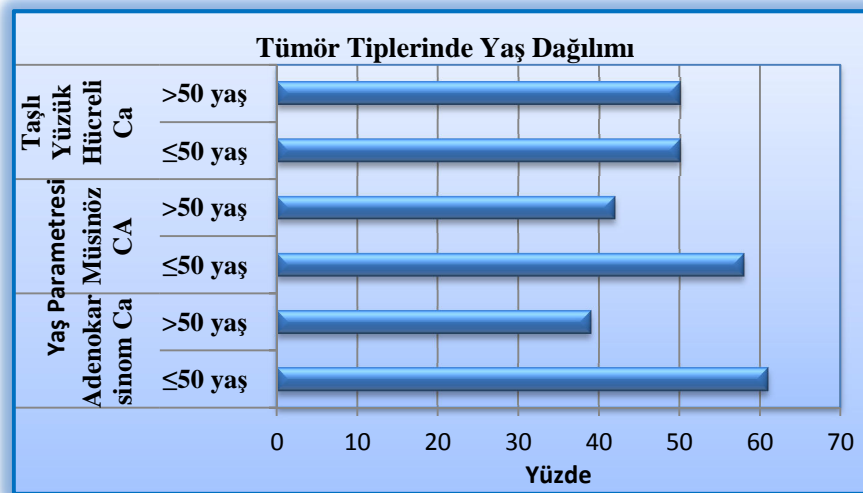
Şekil 5.2. Tüm olguların yaş dağılım grafiği

Belirlenen bu yaş kriteri çerçevesinde cinsiyet içinde yaş dağılımı değerlendirildiğinde kadınların %77'si (n=17)  $\leq 50$  yaş, %23'ü (n=5)  $>50$  yaş grubunda yer almaktadır. Erkeklerin ise %46'sı (n=13)  $\leq 50$  yaş, %54'ü (n=15)  $>50$  yaş grubunda yer almaktadır (Şekil 5.3.).  $\leq 50$  yaş grubunda kadın olgular daha fazla görülürken  $>50$  yaş grubunda ise erkek olguların sayısı daha fazladır. Yaş gruplarında kadın-erkek oranlarının dağılımı bakımından fark bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 5.3.Cinsiyetler arasında yaş dağılımı**

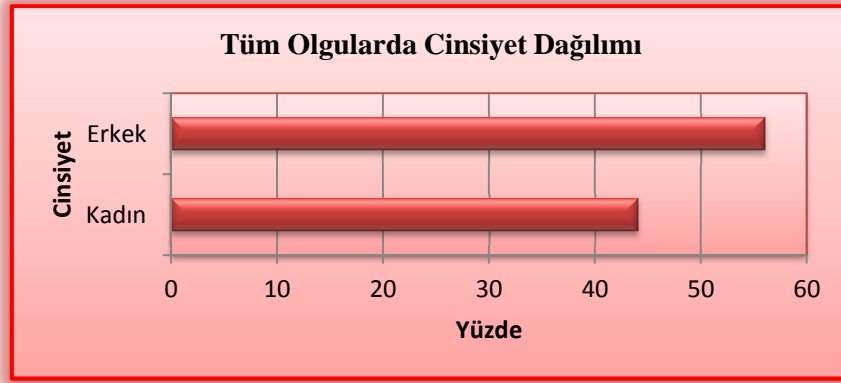
Tümör alt tipleri incelendiğinde  $\leq 50$  ve  $>50$  yaş olguların oranları sırasıyla, konvansiyonel CA'lar için %61 'si ( $n=21$ )  $\leq 50$  yaş olup; % 39'i ( $n=13$ )  $>50$  yaştır. Müsinöz CA'lar için %58 'si ( $n=7$ )  $\leq 50$  yaş olup; % 42'ü ( $n=5$ )  $>50$  yaştır. Taşlı yüzük hücreli adenokarsinoma olguların ise bu yaş değerlendirmesinde iki tarafta eşit sayıda olgu bulunmaktadır (Şekil 5.4.). Bu tez çalışmasında kullanılan olgular için karsinom alt gruplarında yaş dağılımları açısından benzer özellik gösterdikleri görülmektedir.  $\leq 50$  ve  $>50$  yaş dağılımı bakımından tümör tipleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).



**Şekil 5.4. Tümör alt tiplerinin yaş dağılım grafiği**

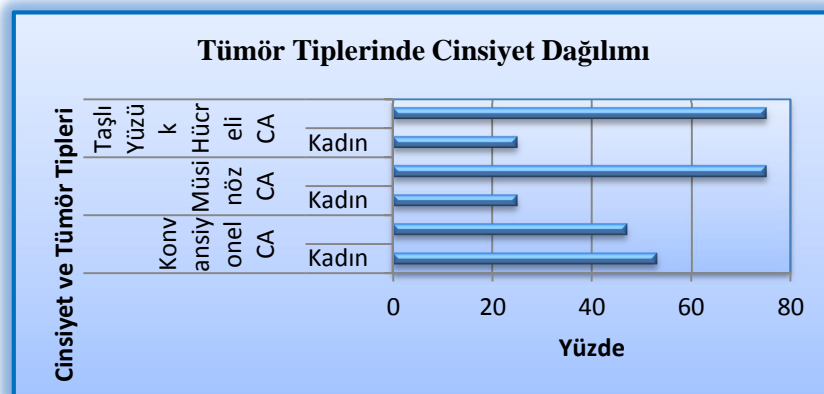
## 5.2.2. Cinsiyet

Olguların %56'sı (n=22) kadın, %44'ü (n=28) erkektir (Şekil 5.5.).



Şekil 5.5. Tüm karsinom olgularında cinsiyet dağılımı

Tümör tipleri arasındaki dağılım ise konvansiyonel adenokarsinom olgularının % 53'ü (n=18) kadın, %47'si (n=16) erkek; Müsinöz CA olgularının % 25'i (n=3) kadın, %75'i (n=9) erkek; Taşlı yüzük hücreli CA olgularının % 25'i (n=1) kadın, %75'i (n=3) (Şekil 5.6).erkek olup tümör tipleri arasında kadın-erkek dağılımı açısından Müsinöz CA'larda ve taşlı yüzük hücreli CA'larda (% 75), Konvansiyonel CA'lardan (% 47) daha belirgin olan erkek predominansı görülmekle birlikte kadın-erkek oranlarının dağılımı bakımından tümör tipleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Ancak özellikle taşlı yüzük hücreli olguların sayısının yetersiz olması da dikkat edilmesi gereken bir husustur.



Şekil 5.6. Tümör tiplerinde cinsiyet dağılımı



### 5.3.Klinikopatolojik Bulgular

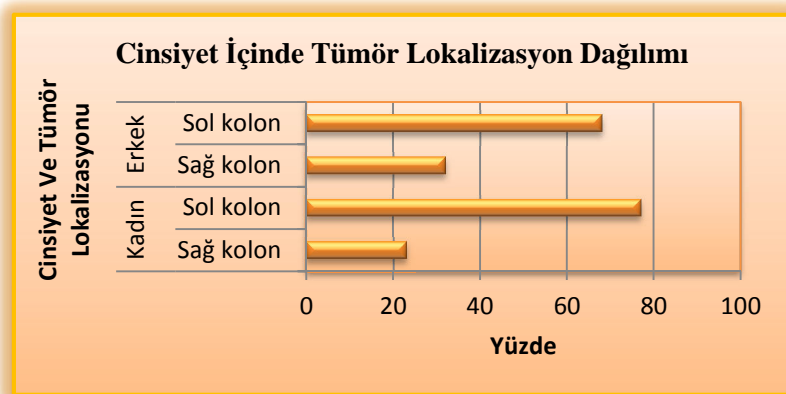
#### 5.3.1.Lokalizasyon

Tüm olguların % 24'ü (n=12) sağ kolon yerleşimli, % 76'sı (n=38) ise sol kolon yerleşimlidir (Şekil 5.7.).



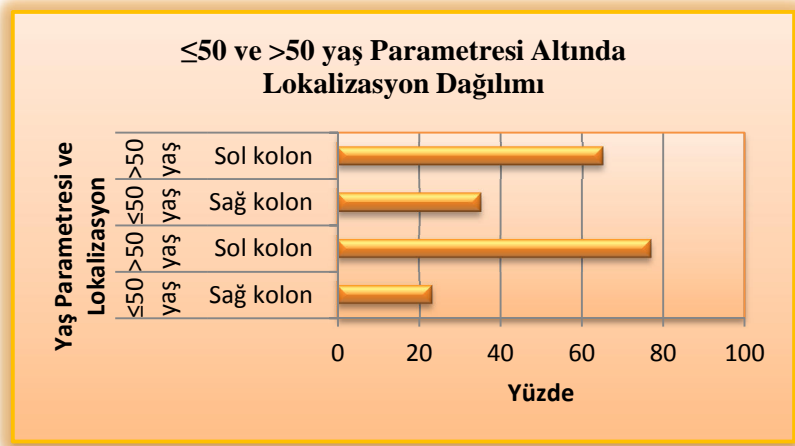
Şekil 5.7.Tüm olgularda lokalizasyon dağılımı

Cinsiyet içinde tümör lokalizasyon dağılımı değerlendirildiğinde kadınlarda tümörlerin % 23'ü (n=5) sağ kolon yerleşimli, % 77'si (n=17) sol kolon yerleşimli iken; erkeklerin % 32'si (n=9) sağ kolon yerleşimli ve % 68'i (n=19) sol kolon yerleşimlidir(Şekil 5.8.).İki cinsiyet grubunda ayrı ayrı değerlendirdiğimizde sol kolon yerleşimli tümörler daha fazla görülmekle birlikte sağ-sol kolon lokalizasyon oranları bakımından kadın ve erkekler arasında fark bulunmamıştır ( $P>0.05$ ).



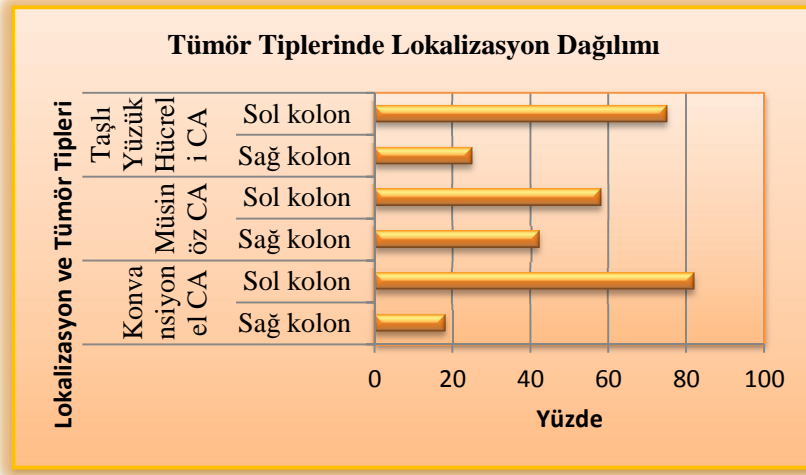
Şekil 5.8. Cinsiyetler arasında tümör lokalizasyon dağılımı

$\leq 50$  ve  $>50$  yaş parametresi altında tümör lokalizasyonlarını değerlendirdiğimizde  $\leq 50$  yaş olgularının % 23'ü (n=7) sağ kolon yerleşimli iken; % 77'si (n= 23) sol kolon yerleşimlidir.  $>50$  yaş olgularının ise % 35'i (n=7) sağ kolon yerleşimli iken; % 65'i (n= 13) sol kolon yerleşimlidir (Şekil 5.9.). $\leq 50$  ve  $>50$  yaş parametresi altında değerlendirilen lokalizasyon dağılımında ayrı ayrı bakıldığında sol kolon yerleşimli tümörler daha fazla görülmekle birlikte yaş grupları arasında lokalizasyon oranları bakımından anlamlı fark bulunmamıştır (P>0.05).



**Şekil 5.9.  $\leq 50$  ve  $>50$  yaş parametresi altında tümör lokalizasyon dağılımı**

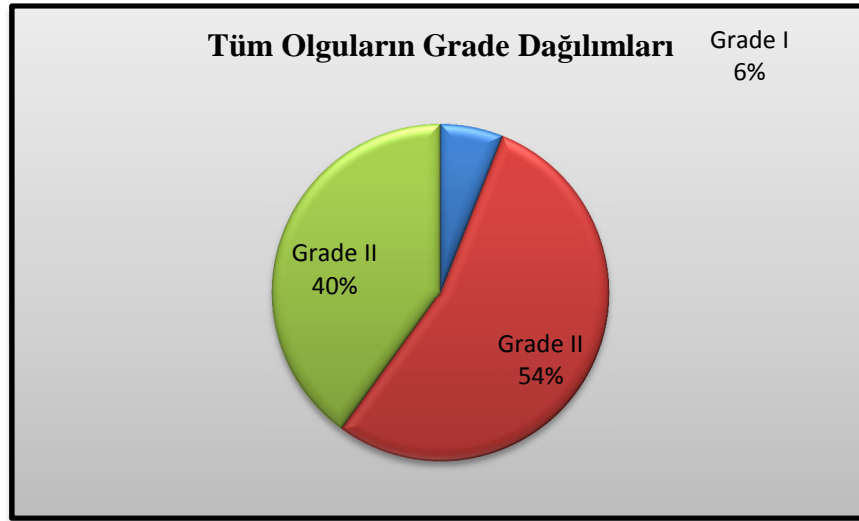
Karsinomların tipleri tümör lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde, Konvansiyonel CA'ların %18'inin (n=6) sağ, %82'sinin sol kolon yerleşimli; Müsinöz CA'ların %42'sinin (n=5) sağ, %58'inin (n=7) sol kolon yerleşimli olduğu görülmüş olup taşlı yüzük hücreli CA'ların ise % 25'i (n=1) sağ kolon yerleşimli, % 75'inin (n=3) ise sol kolon yerleşimli olduğu görülmüştür (Şekil 5.10.). Tüm olgularda olduğu gibi tümör tipleri arasında da sol kolon yerleşimli tümörler daha sık görülmekle birlikte karsinom tipleri arasında lokalizasyon oranları bakımından anlamlı fark bulunmamıştır (p>0.05).



Şekil 5.10. Tümör tiplerinde lokalizasyon dağılımı

### 5.3.2. Grade

Olguların % 6'sı (n=3) grade I, % 54'ü (n=27) grade II ve % 40'ı grade III olarak ayrılmıştır (Şekil 5.3.2.1.).



Şekil 5. 11.Tüm olguların grade dağılımları

Grade I tümörlerin % 33'ü (n=1) kadın, % 77 'si erkek (n=2), %100'ü (n=3) ≤ 50 yaş ve %100'ü (n=3) sol kolon yerleşimli, % 100'ü (n=3) konvansiyonel adenokarsinom oldukları belirlenmiştir. Grade II tümörlerin % 52'si (n=14) kadın, % 48'i erkek (n=13), % 52' si (n=14) ≤ 50 yaş , % 48'i (n=13) >50 yaş, %11'i(n=3) sağ kolon ve % 89'u (n=24) sol kolon yerleşimli, % 96'sı (n=26) konvansiyonel adenokarsinom, % 4'ü (n=1) taşlı yüzük hücreli CA iken grade III tümörlerin % 35'i (n=7) kadın, % 65 'i erkek (n=13), % 65'i

(n=13) ≤ 50 yaş, % 35'i (n=7) >50 yaş, %50'si(n=10) sağ kolon, % 50'sinin (n=10) sol kolon yerleşimli ve % 25'i (n=5) konvansiyonel CA, %60'ı (n=12) müsinöz CA ve %15'i (n=3) taşlı yüzük hücreli CA oldukları gözlenmiştir (Çizelge 5.1.).

**Çizelge 5. 1. Grade I, II ve III tümörlerin demografik ve klinikopatolojik bilgileri**

	Grade I (n=3)		Grade II (n=27)		Grade III (n=20)	
	n	%	n	%	n	%
Kadın	1	33	14	52	7	35
Erkek	2	77	13	48	13	65
≤50 yaş	3	100	14	52	13	65
>50 yaş	0	0	13	58	7	35
Sağ Kolon	0	0	3	11	10	50
Sol Kolon	3	100	24	89	10	50

Grade grupları arasında kadın-erkek oranları ve yaş gruplarının oranları bakımından anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Grade grupları arasında lokalizasyon oranlarının dağılımı bakımından anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Grade grupları ikili karşılaştırıldığında yalnızca grade II ve grade III arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

#### **5.4.Moleküler Bulgular**

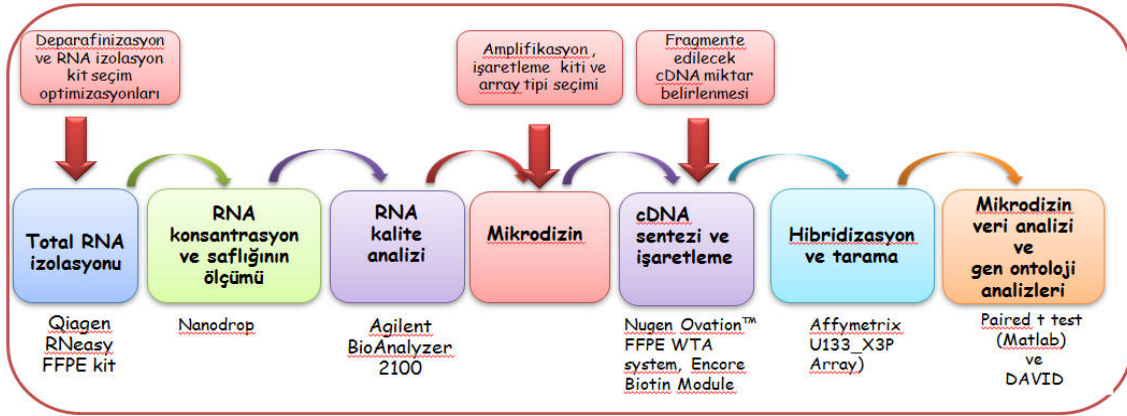
Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen genom ebadında gen ifade analizi ve kopya sayısı değişikliği analizleri mikrodizin teknolojisi ile gerçekleştirilmiştir. Mikrodizin analizlerin performansını ve hassasiyetini etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesinin çalışılacak biyolojik materyalin bütünlüğü olduğu düşünüldüğünde projede esas örneklerin çalışılmasından önce mümkün olan en kaliteli DNA ve RNA elde edilmesini sağlayacak izolasyon protokolünün seçilmesinde ve mikrodizin analizlerinin çeşitli deney aşamalarında optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Tez çalışmasının belirtilen hedeflere ulaşmasında ve çalışma boyunca materyal kaynaklı aksaklıkların önüne geçilmesinde sağlayacağı katkıların yanısıra daha verimli olacak sonuçların elde edilmesi amacıyla bu optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca mikrodizin analizlerinin bütçede en büyük paya sahip olduğu düşünüldüğünde yapılan optimizasyon çalışmalarının, materyal kaynaklı sorunların mikrodizin çalışmalarının deneysel tekrarını gerektirdiği durumlar gibi

olumsuzlukları da azaltacağı öngörülmüştür. Bu amaçlar doğrultusunda ana çalışmalarla birlikte optimizasyon çalışmalarının sonuçları da özet sonuçlar şeklinde sunulmuştur.

Sonuçların sunulmasında gen ifade analiz bulguları, kopya sayısı değişikliği analiz bulguları ve bu iki başlığın entegrasyonu olmak üzere ayrı başlıklar altında sunulmuştur.

#### 5.4.1.Genom ebadında gen ifade analizi bulguları

Global gen ifade analizinde kullanılan çalışma şeması şekil 5.12.'de sunulmuştur.

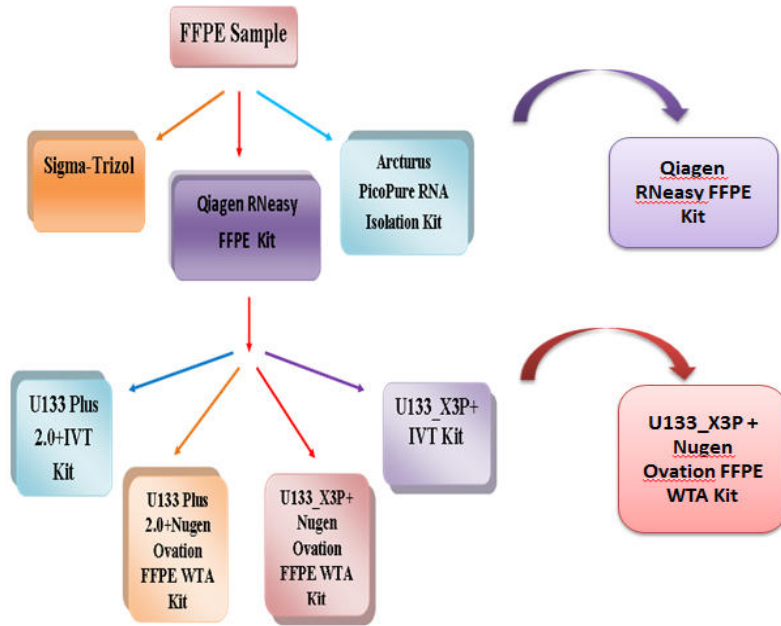


Şekil 5.12. Genom ebadında gen ifade analiz çalışmaları akış şeması

##### 5.4.1.1. Deparaffinizasyon, RNA izolasyonu ve mikrodizin optimizasyon uygulamaları

Tümörler için en geniş RNA kaynağını FFPE arşiv materyalleri oluşturmakla birlikte degradasyon arşiv materyalleri ile ilgili en önemli problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Şimdiye kadar mikrodizin analizlerinin çoğu taze kan ve doku örneklerinin kullanımı ile sınırlı kalmıştır. Arşiv materyallerinin mikrodizin çalışmalarında kullanımına yönelik çalışmalar ise çok yenidir. Mikrodizin analizlerin performansını ve hassasiyetini etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesinin çalışılacak biyolojik materyalin bütünlüğü olduğu düşünüldüğünde çalışmada esas örneklerin çalışılmasından önce kaliteli RNA örnekleri elde edilmesini sağlayacak izolasyon protokolünün seçilmesinde optimizasyon çalışmalarının yapılması, tez çalışmasının belirtilen hedeflere ulaşmasında ve çalışma boyunca materyal kaynaklı aksaklıkların önüne geçilmesinde sağlayacağı katkıların yanısıra daha verimli olacak sonuçların elde edilmesini de sağlayacaktır. Ayrıca

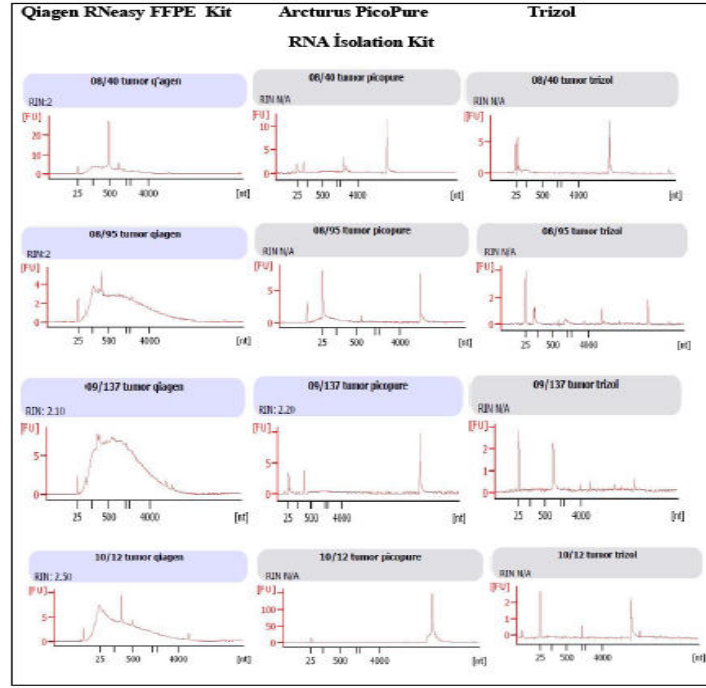
mikrodizin analizlerinin bütçede en büyük paya sahip olduğu düşünüldüğünde yapılan optimizasyon çalışmalarının, materyal kaynaklı sorunların mikrodizin çalışmalarının deneysel tekrarını gerektirdiği durumlar gibi olumsuzlukları da azaltacağı öngörülmüştür. Bu öngörüler ve çıkarımlar doğrultusunda 4 farklı örnekten RNA izolasyonu için disekte edilen tümör ve normal hücrelerden Trizol ve 2 farklı ticari kit (Qiagen RNeasy FFPE kit ve Arcturus PicoPure RNA isolation kit) denenmiştir (Şekil 5.13.). Sadece Qiagen marka ticari kit ile izole edilen RNA'lar ile mikrodizin deneylerinin purifikasyon adımında *array'e* hibridize edilecek istenen miktara ulaşılmıştır. Devamında; tez kapsamı dışında FFPE örneklerden nükleik asit izolasyonun öncesinde gerçekleştirilen deparaffinizasyon adımı için daha önce başarılı sonuçlar vermiş deparaffinizasyon metodu ve kitin kendi protokolünde yer alan deparffinizasyon adımı uygulanarak izolasyonlar gerçekleştirilmiştir ve sonuçta laboratuvarımızda uygulanan deparaffinizasyon metodu ile ilgili kit ile özellikle elde edilen RNA miktarı açısından daha başarılı sonuçlar alındığı görülmüştür.



Şekil 5.13. RNA izolasyonu ve mikrodizin uygulamaları için gerçekleştirilen optimizasyon akış şeması

**Çizelge 5.2. Üç farklı ticari kit (Qiagen RNeasy, PicoPure, Trizol) ile izole edilen RNA'lara ait spektrofotometre sonuçları**

Örnek	RNeasy			PicoPure			Trizol		
	ng/µl	260/280	260/230	ng/µl	260/280	260/230	ng/µl	260/280	260/230
08/40	114.9	21	1.92	2.69	4	0.1	268.51	2.02	0.51
08/95	131.22	2.12	2.18	9.55	2.08	0.17	26.05	1.74	0.29
09/137	258.99	2.13	2.08	4.48	2.11	0.46	282.42	2.04	0.5
10/12	166.82	2.08	2.17	0.62	-5.65	0.04	21.38	1.83	0.22



**Şekil 5.14 .3 farklı kit ile izole edilen RNA'lara ait elektroferogram görüntüleri (Agilent Bioanalyzer)**

Üç ticari kiti RNA izolasyon sonucu elde edilen RNA'ların spektrofotometrik ve elektroferogram sonuçları açısından değerlendirdiğimizde miktar ve özellikle saflık açısından Qiagen RNeasy FFPE tissue kit ile elde edilen sonuçların daha başarılı olduğu görülmektedir. Elde edilen bu sonuçların ardından yola bu kit ile devam edilmiştir.

Laboratuvarımızda daha önce bu kit ile yapılan bir çalışmada kite ait deparafinizasyon adımı yerine başka bir protokol ile gerçekleştirilen izolasyonlarda daha çok miktarda RNA elde edildiği gözlenmiştir. Tez çalışmasında tümör ve kontrol örnekler için preparatlarda sadece tümör ve normal hücrelerin disekte edileceği düşünüldüğünde ve bazı örnekler için

İlgili alanların boyutunun küçük olma durumu göz önünde bulundurulduğunda elde edilecek RNA'nın miktarı için bu durum büyük önem taşımıştır. Dolayısıyla ilgili kit ile, hem farklı bir deparaffinizasyon adımı eklenerek hem de kitin kendi deparaffinizasyon adımı değiştirilmeden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve spektrofotometrik ölçümleri değerlendirilmiştir.

**Çizelge 5.3. Qiagen RNeasy FFPE kit için kit protokolü ve modifiye deparaffinizasyon adımı eklenmiş protokol ile izole edilen RNA'lara ait spektrofotometre sonuçları**

Sample ID	Qiagen RNeasy FFPE Kit Kit deparaffinizasyon protokolü			Qiagen RNeasy FFPE Kit Genombilim deparaffinizasyon protokolü		
	ng/ul	260/280	260/230	ng/ul	260/280	260/230
9723 T	154.87	2.11	2.11	462.69	2.02	2.02
31399 T	13.89	1.94	1.48	44.89	2.09	1.91
16143 T	67.86	2.01	1.55	97.76	2.04	1.61
1485 T	197.06	1.86	1.3	276.99	2.05	1.96

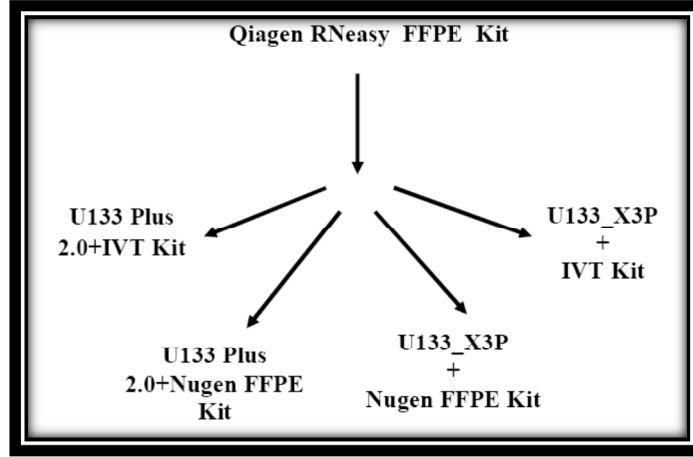
Daha önce elde edilen sonuçlar gibi çalışılan bu örnekler için modifiye deparaffinizasyon protokolü uygulanmış kit protokolü ile izole edilen RNA miktarları daha yüksektir.

**Bu sonuçların ardından tez çalışması kapsamında gerçekleştirilecek olan RNA izolasyonları değiştirilmiş deparaffinizasyon adımı içeren Qiagen RNeasy FFPE Tissue kit ile gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.**

#### 5.4.1.2. Mikrodizin optimizasyon uygulamaları

Literatür, yapılan çalışmalar ve FFPE materyal kaynaklı olumsuzluklar da dikkate alınarak en iyi sonuca ulaşabilmek adına aşağıda ifade edilen ve şekil 5.15.'de özetlenen denemeler gerçekleştirilmiştir.





Şekil 5.15. Mikrodizin optimizasyon uygulamaları şeması

İlgili platform kit ve *array*'leri yanında farklı bir kit ile de bazı mikrodizin denemeleri gerçekleştirilmiştir.

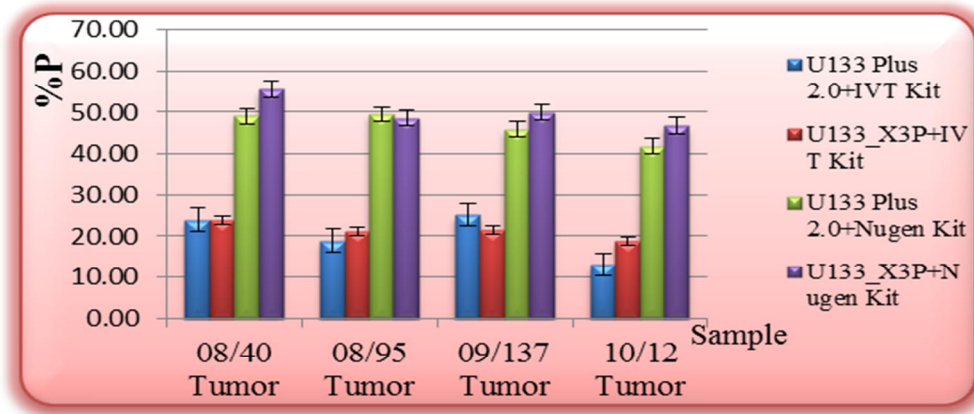
1. **HGU-133 Plus 2.0 array + 3'IVT kit** kullanılarak deneme yapılmış ve pürifikasyon adımının ardından *array*'e hibridize edilecek miktara ulaşılmasına rağmen "pozitif sinyal alınan prob yüzdesi" (number present ) için beklenilenden çok düşük bir değere ulaşılmıştır.
2. **U133-X3P + 3'IVT kit** ile 1 adımdaki deneme yapılan aynı örnek için daha yüksek "pozitif sinyal alınan prob yüzdesi" (number present ) değerine ulaşılmıştır.
3. **HGU-133 Plus 2.0 array + Nugen Ovation FFPE WTA Systemkit** kullanılarak deneme yapılan aynı örnekler için "pozitif sinyal alınan prob yüzdesi" (number present ) diğer iki karşılaştırmaya göre önemli düzeyde artmıştır.
4. **U133-X3P + Nugen Ovation FFPE WTA Systemkit** kullanılarak deneme yapılan aynı örnekler için "pozitif sinyal alınan prob yüzdesi" (number present ) FFPE materyaller için **çok iyi denebilecek bir değere ulaşılmıştır.**

Çizelge 5.4. 'de sonuçlar özetlenmiştir. Bu sonuçlar eşliğinde örnekler, U133-X3P *array* ve Nugen marka cDNA sentez kiti kullanılarak çalışılmıştır. Ayrıca FFPE örnekler ile mikrodizin çalışmalarının deneysel olarak başarılı bir şekilde yürütülebileceğini gösteren bu sonuçlar ve RNA izolasyon optimizasyon çalışmaları için bir teknik makale hazırlanmış ve "The Scientific World Journal" dergisine ilk değerlendirme için gönderilmiştir. Ayrıca bu çalışmalar 23-24 Kasım 2012 tarihleri arasında

düzenlenen Moleküler Biyoloji Derneği 1. Uluslararası Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

Çizelge 5.4. İfade analiz deneyleri kit ve array denemelerinin pozitif sinyal alınan prob yüzde değeri açısından karşılaştırmaları

Sample	HGU-133 Plus 2.0 Array + 3' IVT KIT	X3P Array + 3' IVT KIT	HGU-133 Plus 2.0 Array + Nugen Ovation FFPE WTA System Kit	X3P Array + Nugen Ovation FFPE WTA System Kit
08/40 Tumor	% 24.06	% 23.9	% 49.00	% 55.52
08/95 Tumor	% 18.96	% 21.2	% 49.52	% 48.64
09/137 Tumor	% 25.13	% 21.5	% 45,91	% 49.92
10/12 Tumor	% 13.0	% 18.7	% 41.81	% 46.72



Şekil 5.16. Mikrodizin optimizasyon uygulamaları sonucunda elde edilen pozitif sinyal alınan prob yüzde değerleri

Sonuçların en iyi gözlendiği U133-X3P array ve Nugen marka cDNA sentez kiti birlikteliği ile ifade analizine yönelik mikrodizin çalışmalarının yapılmasına karar

**verilmiş tez çalışmaları kapsamında belirtilen tüm örnekler (50 tümör / 50 kontrol) için ifade analizi çalışmaları tamalanmıştır.**

#### **5.4.1.3. RNA izolasyonu, miktar, saflık analizleri**

Tez çalışması kapsamında; çalışmada kullanılacak tüm örnekler için RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen tüm RNA örneklerinin nanodrop aracılığı ile temizlik ve miktar tayinleri yapılmış olup Agilent 2100 biyoanalizöründe RNA 6000 Nano kitleri kullanılarak bütünlük analizleri gerçekleştirilmiştir.

Nanodrop sonuçlarına göre RNA konsantrasyonları karşılaştırıldığında, tüm örneklerin RNA konsantrasyonlarının mikrodizin çalışmaları için gerekli olan 100 ng değerini rahatlıkla karşıladığı gözlenmiştir. RNA saflığı ve temizliği açısından değerlendirildiğinde örneklerin 260/280 ve 260/230 oranlarının istenen aralıklarda ve bazı örneklerde de istenen aralıkların biraz altında olduğu görülmektedir (Çizelge 5.6.). Sonuç olarak ifade analizi deneyleri için tüm örneklerin çalışılabilir nitelikte olduğu görülmektedir.

**Çizelge 5.5. İzole edilen RNA'lara ait miktar ve saflık değer aralıkları**

	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>Miktar (ng/ul)</b>
<b>Tümör Örnekleri (n=50)</b>	<b>1.64 - 2.08</b>	<b>1.34 - 2.13</b>	<b>27.02- 445.65</b>
<b>Kontrol Örnekleri (n=50)</b>	<b>1.58 – 2.06</b>	<b>1.4 – 2.02</b>	<b>24.68 – 193.29</b>

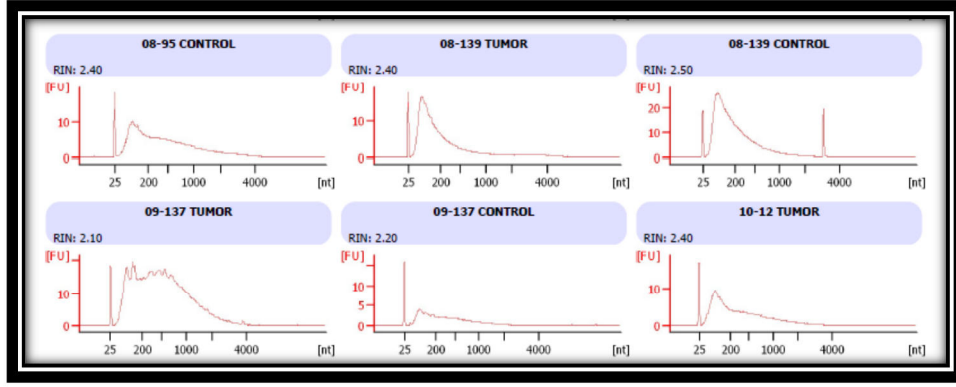
**Çizelge 5.6. İzole edilen RNA'lara ait temsili spektrofotometre sonuçları**

<b>Sample ID</b>	<b>ng/ul</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>08/102 TUMOR RNA</b>	<b>221,97</b>	<b>5,549</b>	<b>2,718</b>	<b>2,04</b>	<b>2,04</b>
<b>08/102 KONTROL RNA</b>	<b>42,73</b>	<b>1,068</b>	<b>0,537</b>	<b>1,99</b>	<b>1,7</b>
<b>08/125 TUMOR RNA</b>	<b>130,21</b>	<b>3,255</b>	<b>1,611</b>	<b>2,02</b>	<b>1,86</b>
<b>08/125 KONTROL RNA</b>	<b>149,68</b>	<b>3,742</b>	<b>1,854</b>	<b>2,02</b>	<b>1,9</b>
<b>08/140 TUMOR RNA</b>	<b>409,55</b>	<b>10,239</b>	<b>5,048</b>	<b>2,03</b>	<b>2,06</b>

08/140 KONTROL RNA	49,74	1,244	0,639	1,95	1,54
08/165 TUMOR RNA	340,57	8,514	4,138	2,06	2,11
09/19 TUMOR RNA	271,14	6,779	3,3	2,05	2,03
09/19 KONTROL RNA	50	1,25	0,617	2,03	1,71
09/93 TUMOR RNA	247,53	6,188	3,012	2,05	1,98
09/93 KONTROL RNA	47,71	1,193	0,582	2,05	1,57
09/140 TUMOR RNA	182,81	4,57	2,238	2,04	2
09/140 KONTROL RNA	96,44	2,411	1,203	2	1,9
09/305 TUMOR RNA	59,39	1,485	0,77	1,93	1,45
09/305 KONTROL RNA	25,15	0,629	0,332	1,89	1,36

#### 5.4.1.4. İzole edilen RNA örneklerinin bütünlük ve kalite analizi

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlük analizleri, Agilent 2100 Biyoanalizörü ile RNA 6000 Nano kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA Bütünlük Katsayısı (RNA Integrity Number – RIN) RNA örneklerinin bütünlüğünü karşılaştırmak için kullanılan bir algoritmadır. RNA'ların intakt olduğunu anlayabilmek için RIN değeri dikkate alındığı gibi 28S ve 18S bantlarının da düzgün pikler halinde görülmesi gerekmektedir. Ancak formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan elde edilen RNA'lar **degrade olduğundan** gerek iyi bir RIN değerinin görülmesi gerekse de düzgün 28S ve 18 S bant piklerinin izlenmesi mümkün olamamaktadır. Tez çalışmasında kullanılan örnekler için de tipik FFPE örnek profili gözlenmiştir. Bu şekilde değerlendirilen izole edilmiş RNA'lara ait agilent biyoanalizörden alınan temsili veri görüntüsü Şekil 5.17.'de sunulmuştur.



Şekil 5.17. İzole edilen RNA'lara ait temsili elektroferogram görüntüleri

#### 5.4.1.5. Genom ebadında gen ifade analizi

Mikrodizin optimizasyon uygulamalarının ardından sonuçların en iyi gözlendiği U133-X3P array ve Nugen marka cDNA sentez kiti birlikteliği ile ifade analizine yönelik mikrodizin çalışmalarının yapılmasına karar verilmiş ve tez kapsamında belirtilen tüm örnekler (50 tümör / 50 kontrol) için ifade analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ancak 1 tümör örneği mikrodizin deneylerinin son aşaması olan tarama basamağının ardından bu örneğe ait ilgili mikrodizin dosyası oluşturulamamıştır. Elimizde bu örneği tekrar edecek yeterli malzeme olmadığından ve eşli analizler yapılacak olmasından dolayı bu örnek ve eşli kontrolü çalışmadan çıkarılmıştır. Sonuç olarak çalışma 50 tümör / 50 kontrol ile tamamlanmış olmasına rağmen analizler 49 tümör / 49 kontrol üzerinden gerçekleştirilmiştir.

RNA izolasyonunun ardından gerçekleştirilen mikrodizin aşamalarına ait sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

##### 5.4.1.5.1. SPIA cDNA pürifikasyonu, hibridizasyon ve tarama

İlk zincir ve ikinci zincir cDNA sentezinin ardından cDNA sentez amplifikasyon işlemi gerçekleştirilir. Daha sonra amplifiye cDNA'nın pürifikasyon aşaması bulunmaktadır. Son olarak fragmente edilip işaretlenen örnekler *array*'e hibridize edilip taranır.

Amplifiye cDNA pürifikasyonunun ardından 3.5 µg'a ulaşılması gerekmektedir. Bu değere ulaşmayan örnekler için ilgili aşamalar tekrar edilmiştir.

**Çizelge 5.7. Pürifiye edilen amplifiye cDNA örneklerine ait temsili miktar ve kalite sonuçları**

Sample ID	µg Değeri	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
<b>08-86 TUMOR SPIA PURF</b>	5.32	197,18	5,975	3,039	1,97	2,34
<b>08-86 KONTROL SPIA PURF</b>	5.04	173,84	5,268	2,648	1,99	2,36
<b>08-98 TUMOR KONTROL SPIA PURF</b>	6.79	251,54	7,623	3,977	1,92	1,74
<b>08-98 KONTROL SPIA PURF</b>	6.61	220,31	6,676	3,425	1,95	2,31
<b>08-104 TUMOR SPIA PURF</b>	2.84	94,69	2,87	1,438	2	2,39
<b>08-104 KONTROL SPIA PURF</b>	5.22	174,18	5,278	2,656	1,99	2,4
<b>08-119 TUMOR SPIA PURF</b>	4.94	183,21	5,552	2,78	2	2,42
<b>08-119 KONTROL SPIA PURF</b>	4.27	158,35	4,799	2,414	1,99	2,4
<b>08-65 TUMOR SPIA PURF</b>	2.82	100,87	3,057	1,493	2,05	2,45
<b>08-65 KONTROL SPIA PURF</b>	3.4	121	3,667	1,829	2,01	2,35
<b>08-73 TUMOR SPIA PURF</b>	6.33	226,21	6,855	3,472	1,97	2,33

Elde edilen pozitif sinyal alınan prob yüzdesi” (number present ) değerlerinin özeti çizelge 5.8. ‘de temsili olarak sunulmuştur.

**Çizelge 5.8. Çalışılan örnekler için “pozitif sinyal alınan prob yüzdesi” (number present ) değerleri temsili tablosu**

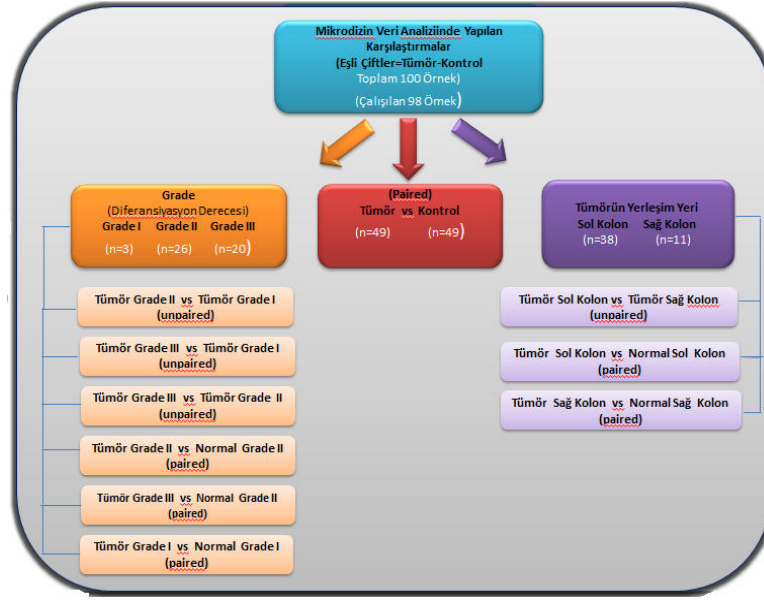
Örnek	Number of Present Değerleri-%
<b>08/86 Kontrol</b>	47.4
<b>08/86 Tümör</b>	53.27
<b>08/104 Kontrol</b>	49.25
<b>08/104 Tümör</b>	50.99
<b>08/119 Kontrol</b>	48.59
<b>08/119 Tümör</b>	50.49
<b>08/125 Kontrol</b>	48.54

<b>08/125 Tümör</b>	45.81
<b>09/93 Kontrol</b>	52.22
<b>09/93 Tümör</b>	53.81
<b>10/32 Kontrol</b>	54.43
<b>10/32 Tümör</b>	51.39

Pozitif sinyal alınan prob yüzdesi açısından değerlendirme yapıldığında FFPE materyallerin degrade doğaları gereği mikrodizin uygulamalarında kullanımları uygun değildir. Bununla birlikte gerçekleştirilen pek çok teknik çalışma ve bizim de gerçekleştirdiğimiz optimizasyon çalışmaları kapsamında FFPE örnekler ile başarılı mikrodizin sonuçları elde edilebileceği görülmüştür. Bu tez çalışması çerçevesinde elde edilen pozitif sinyal alınan prob yüzdesi değerleri de bu durumu doğrular niteliktedir.

#### **5.4.1.5.2. Genom ebadında gen ifade analizi biyoinformatik bulgular**

Genom ebadında gen ifade analizi başlığı altında gerçekleştirilen karşılaştırmaları için farklı olarak ifade edilen gen setlerinin belirlenmesi “paired t-test”, “unpaired t-test” ve “p-value” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan farklı analiz ve değerlendirmelerin ardından tüm karşılaştırmalar için kat değişimi değerlendirmesi için eşit eşik değeri alınmış ve ifade düzeyleri 2 kat artan/azalan genlere ait sonuçlar bu tez kapsamında sunulmuştur. Tez kapsamında gerçekleştirilen karşılaştırmalar şekil 5.19.’da sunulmuştur. Mikrodizin verilerine ait önışleme ve varyans filtreleme analizleri R platformunda gerçekleştirilirken farklı olarak ifade edilen gen setlerinin tespitinde kullanılan algoritmaya ait kodlar ve bu genlerin hiyerarşik yöntem ile kümeleme analizine ait kodlar matlab programlama dilinde yazılmıştır. Mikrodizin veri analizlerinin ardından tespit edilen farklı olarak ifade edilen gen setinde ifadesi azalan ve artan genler için gen ontoloji ve yolak ileri analizleri ise “DAVID” yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tümör–kontrol karşılaştırmasında yapılan tüm analizler, tablolar, şekiller ve değerlendirmeler diğer tüm karşılaştırmalar için de yapılmış olmakla birlikte tümör-kontrol analizi dışındaki diğer karşılaştırmalar için tez kapsamında sadece ana sonuçlar sunulmuştur.



**Şekil 5. 18. Genom ebadında gen ifade analizi kapsamında değerlendirilen tüm karşılaştırmalar**

Önişleme, varyans filtreleme işlemlerinin ardından paired t-test ile elde edilen farklı olarak ifade edilen gen setleri üzerinde gerçekleştirilen kümeleme analizleri ve ileri analizler ile tüm karşılaştırmalara ait hikayelere biyolojik anlam yüklenmeye çalışılmıştır. 2 kat artan/azalan farklı ifade edilen gen seti DAVID yazılımı kapsamında gen ontoloji, fonksiyonel anotasyon, zenginleşme ve yolak başlıkları altında değerlendirilmiştir. Bu süreçte elde edilen farklı olarak ifade edilen gen setleri üzerinden bu başlıklar çerçevesinde aşağıda ifade edilen sorular sorulmuş olup karşılaştırmalara ait moleküler mekanizmalarda önemli olabilecek genler tespit edilmeye çalışılmıştır.

### **Farklı olarak ifade edilen gen setleri üzerinden karşılaştırmalar için önemli olabilecek genlere ulaşmada izlenen yol**

1. Çalışmada kullanılan hipotez, literatür, elde edilen sonuçlar ve kabul edilen istatistiksel anlamlılıkta farklı olarak ifade edilen genler için belli eşik değerinde kat değişimi olan bir gen seti belirlenir.
2. Belirlenen eşik değeri çerçevesinde farklı olarak ifade edilen gen seti ile “DAVID” yazılımında elde edilen fonksiyonel anotasyon kümeleri üzerinden aşağıda bir örneği verilen Gen Adı, Gen Sembolü, Sitogenetik Lokalizasyon, KEGG/Biocarta Yolak, Kat Değişimi, Fonksiyonel Anotasyon Küme ve bu kümelere ait zenginleşme değerlerinin



olduğu kapsamlı bir tablo hazırlanmıştır. Bu tablo ile farklı ifade edilen gen seti içindeki genleri, hangi kromozomda ve hangi yolakda yer aldıkları, kat değişimlerinin ne olduğu, hangi fonksiyonel anotasyon kümesinde ne oranda zenginleştikleri ve hangi kümelerde kaç kez tekrar ettikleri görülebilmektedir.

Affy ID	Gen Adı	Gen Sembolü	Kromozom	Sitogenetik Lokali	KEGG/BioCarta Yolaklar	Kat Değişim	DAVID ANOTASYON KÜMELERİ			
							1	2	3	4
g5683748_3p_a_at	metallothionein 1F	MT1F	16	16q13,		-3,92	4,4			
g10835229_3p_a_at	metallothionein 1G	MT1G	16	16q13		-3,22	4,4			
g10835084_3p_x_at	metallothionein 1H	MT1H	16	16q13		-5,42	4,4			
Hs.74170.0.S1_3p_x_at	metallothionein 1L (gene/pseudogene); metallothionein 1E	MT1E, MT1J,	16	16q13, 20q11.2		-3,05	4,4			
Hs.188518.0.S1_3p_at, Hs.147924.0.A1_3p_at	metallothionein 1M	MT1M	16	16q13		7,05	6,58	4,4		
g13528881_3p_a_at, g11612	FXRD domain containing ion transport regulator 3	FXRD3	19	19q13.11-q13.12		2,82	5,24		2,29	
Hs.147924.0.A1_3p_at	anoctamin 7	ANO7	2	2q37.3		-5,17		2,29		
g4585468_3p_at	chloride channel accessory 1	CLCA1	1	1p31-p22	Olfactory transduction	-10,52		2,29		
g12025666_3p_at	chloride channel accessory 4	CLCA4	1	1p31-p22	Olfactory transduction	-13,57		2,29		
Hs.21103.0.S1_3p_at	chloride intracellular channel 5	CLIC5	6	6p21.1-p12.1		-5,87		2,29		
g4557534_3p_at, Hs.2.30675	solute carrier family 26, member 3	SLC26A3	7	7q31		9,93	10,30		2,29	
g695995_3p_at	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding domain)	CFTR	7	7q31.2,	ABC transporters, Vibrio cholerae	-2,21		2,29		2,11
Hs.89603.6.A1_3p_a_at	mucin 1, cell surface associated	MUC1	1	1q21		-2,67			2,22	
Hs.321571.0.S1_3p_at, Hs.321571.0.S1_3p_at	mucin 12, cell surface associated; similar to mucin 11	LOC100130714	7	7q22		2,17	2,11	6,55		2,22
g8923068_3p_a_at, Hs.5940	mucin 13, cell surface associated	MUC13	3	3q21.2		2,27			2,22	

3. Bu tablo üzerinden yola devam edilir ve elde edilen tabloda gen sayısı >3 olan yolaklar ve bu yolaklar içinde yer alan genler belirlenir.

4. DAVID yazılımı ile elde edilen fonksiyonel anotasyon kümelerinden >5 sayıda gen içeren fonksiyonel anotasyon kümeleri belirlenir.

5. Zenginleşme skoru  $\geq 1.3$  ve  $< 1.3$  olan kümeler tespit edilir.

6. Son olarak bu 5 madde çerçevesinde oluşacak tablo eşliğinde hikayenin birer parçası olabilecek genler belirlenir.

➤ **Bu tez çalışması kapsamında ortaya konan bu 6 maddelik kriterler çerçevesinde aşağıdaki sorulardan 3 veya daha fazlasının cevabını veren genler izlenen yolda ön plana çıkan genler olarak düşünülmüştür.**

**Kabül edilebilir belli istatistiksel anlamlılıktaki farklı olarak ifade edilen genler:**

1. Kat değişimi  $\leq 2$  /  $\geq 2$  mi?

2. 5 veya daha fazla sayıda gen içeren bir DAVID anotasyon teriminde yer alıyor mu?

3. Zenginleşme skoru  $\geq 1.3$  olan bir DAVID fonksiyonel anotasyon kümesinde yer alıyor mu?

4. 3 veya daha fazla sayıda DAVID anotasyon kümesinde tekrar ediyor mu?

## 5. 3 veya daha fazla sayıda yolakda görevli mi?

- Mikrodizin gen ifade analizine ait veriler oluşturulan bu 5 maddelik kriter ve yukarıda ifade edilen sorular çerçevesinde sunulmuştur.
- Şekil 5.18'de gösterilen tüm karşılaştırmalar için mikrodizin veri analiz sonuçları ayrı ayrı sunulmuştur.

### 5.4.1.5.2.1. Tümör- Kontrol paired karşılaştırmasına ait bulgular

Tez projesi kapsamında gen ifade analizi mikrodizin uygulamalarında çalışılan 50 örnek içerisinde bir tümör örneğine ait veri dosyası oluşturma işlemi sırasında hata oluşmuş ve bu örnek ve eş kontrolü çalışmadan çıkarılmıştır. Analizlere 49 tümör/49 kontrol üzerinden devam edilmiştir.

Mikrodizin verilerinin ön işleme analizleri ve varyans fitreleme işleminin ardından farklı olarak ifade edilen genlerin tespitinde farklı kat değişimleri ve farklı p değerleri kullanılarak genel bir tablo ortaya konmuş olup sonuçlar çizelge 5.9.'da sunulmuştur.

**Çizelge 5.9. Tümör vs Kontrol farklı kat değişimleri ve p değerleri ile birlikte farklı ifade edilen gen sayıları**

Tümör vs Kontrol Farklı Kat Değişimleri ve p Değerleri ile Birlikte Farklı İfade Edilen Gen Sayıları			
Kat Değişimi ve p Değeri	Farklı İfade Edilen Gen Sayısı	İfadesi Artan Gen Sayısı	İfadesi Azalan Gen Sayısı
$\geq 1.5$ kat $P < 0.001$	1493	639	854
$\geq 1.5$ kat $P < 0.0001$	1353	566	787
$\geq 1.5$ kat $P < 0.00001$	1154	459	695
$\geq 2$ kat $P < 0.001$	925	349	576
$\geq 2$ kat $P < 0.0001$	889	331	558
$\geq 2$ kat $P < 0.00001$	835	296	539
$\geq 3$ kat $P < 0.001$	474	148	326
$\geq 3$ kat $P < 0.0001$	469	147	322
$\geq 3$ kat $P < 0.00001$	464	144	320

Bu çizelgede yer alan sonuçlar çerçevesinde literatür, sonrasında yapılacak analizler ve Huang ve arkadaşlarının (220) belirttikleri rakamlar (100-200) dikkate alındığında sonraki analizlere 2 kat değişim ve p<0.001 kriteri ile ortaya çıkan 925 gen ile yola devam edilmiştir. 925 gene ait tam liste Ek-2’de sunulmuştur.

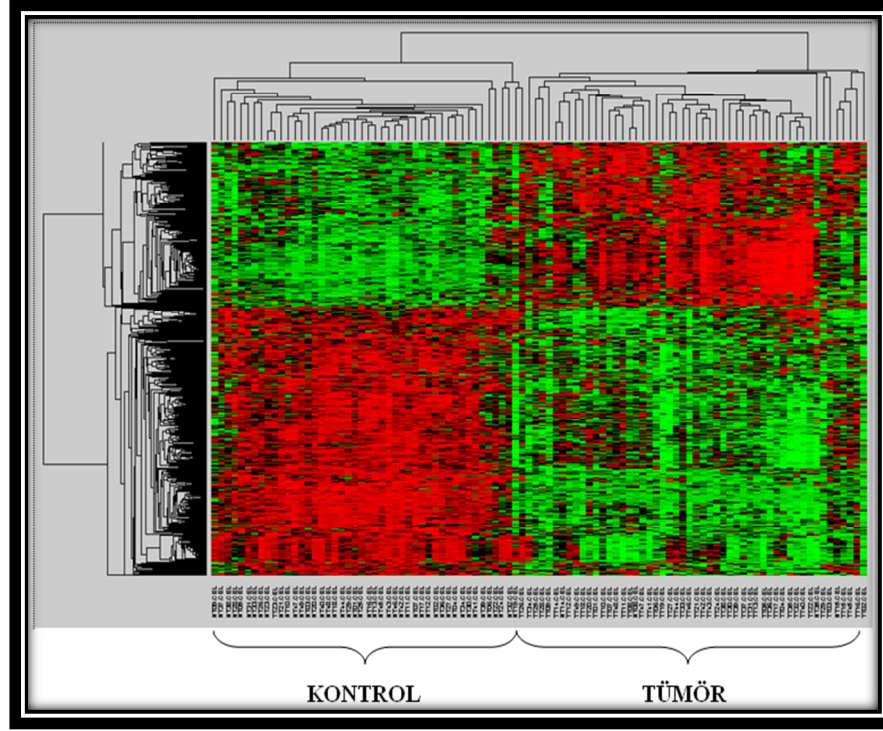
Tümör kontrol karşılaştırmasında 2 kat değişimi ile farklı olarak ifade edildiği tespit edilen 925 gen bir farklı ifade edilen gen setinin içermesi gereken özellikler açısından Huang ve arkadaşlarının belirlediği kriterlere uymaktadır.

Tümör vs kontrol karşılaştırmasında 2 kat değişimi ile farklı olarak ifade edilen 925 genin 349’unun ifade düzeyinde artış görülürken 576 genin ifade düzeyinde azalma görülmüştür. Sonuçlar Çizelge 5.10’da sunulmuştur.

Çizelge 5.10. Tümör vs Kontrol karşılaştırmasında artış/azalış gösteren gen sayıları

<b>Tümör vs Kontrol <math>\geq 2</math> Kat Artış/Azalış Gösteren Farklı İfade Edilen Gen Seti (p&lt; 0.001)</b>	
<b>Farklı İfade Edilen Gen Seti Sayısı</b>	925
<b>Up-Regüle Gen Sayısı</b>	349
<b>Down-Regüle Gen sayısı</b>	576

2 kat değişimi ile tümör ve kontrol grubu arasında farklı ifadelendiği tespit edilen 925 gen ile gerçekleştirilen kümeleme analizi sonucunda gen ifade paternlerine göre örneklerin tümör ve kontrol olmak üzere 2 gruba net bir şekilde birbirinden ayrıldığı görülmektedir. Bu sonuç değerlendirilen 925 genin anlamlılığını artırmıştır.



**Şekil 5.19. Tumor vs Kontrol karşılaştırması kümeleme analizi**

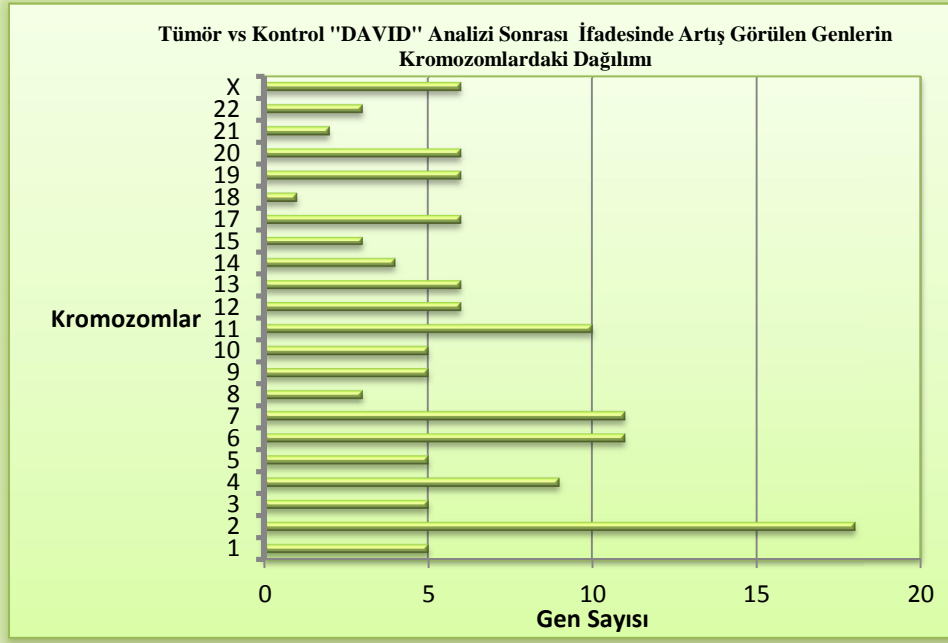
2 kat değişimi ile tumor ve kontrol grubu arasında farklı ifadelendiği tespit edilen 925 genin **ifadeleri artan ve azalan gen grupları için** DAVID yazılımı üzerinden gen ontoloji, fonksiyonel anotasyon, zenginleşme ve yolak analizleri **ayrı ayrı** gerçekleştirilmiş olup sonuçlar da artış ve azalış gösteren gen grupları için ayrı ayrı sunulmuştur.

#### **5.4.1.5.2.1.1. Tumor-Kontrol paired karşılaştırmasında ifadesinde artış görülen gen grubuna ait sonuçlar**

Tumor vs kontrol grubu karşılaştırmasında 925 farklı olarak ifade edilen gen setinde 349 tane genin ifadesinde artış görülmüştür.

2 kat değişimi ile farklı olarak ifade edilen gen seti ile DAVID yazılımında elde edilen fonksiyonel anotasyon kümeleri üzerinden Gen Adı, Gen Sembolü, Sitogenetik Lokalizasyon, KEGG/Biocarta Yolak, Kat Değişimi, Fonksiyonel Anotasyon Küme ve bu kümelere ait zenginleşme değerlerinin olduğu kapsamlı bir tablo hazırlanmıştır.

Tümör kontrol karşılaştırmasında 2 kat değişimi ile ifadesi artan gen grubunda DAVID analizleri sonrasında oluşan gen listesinde genlerin kromozomlardaki dağılımı şekil 5.20’de sunulmuştur.



**Şekil 5.20. Tümör-Kontrol karşılaştırmasında DAVID analizi sonrasında ifadesi artan genlerin kromozomlardaki dağılımı**

Bu tablodan da görüldüğü üzere ifadesi artan gen grubunda en fazla gen 2. kromozomda görülürken 6, 7 ve 11. kromozomlarda da gen sayısının fazlalığı dikkat çekmektedir.

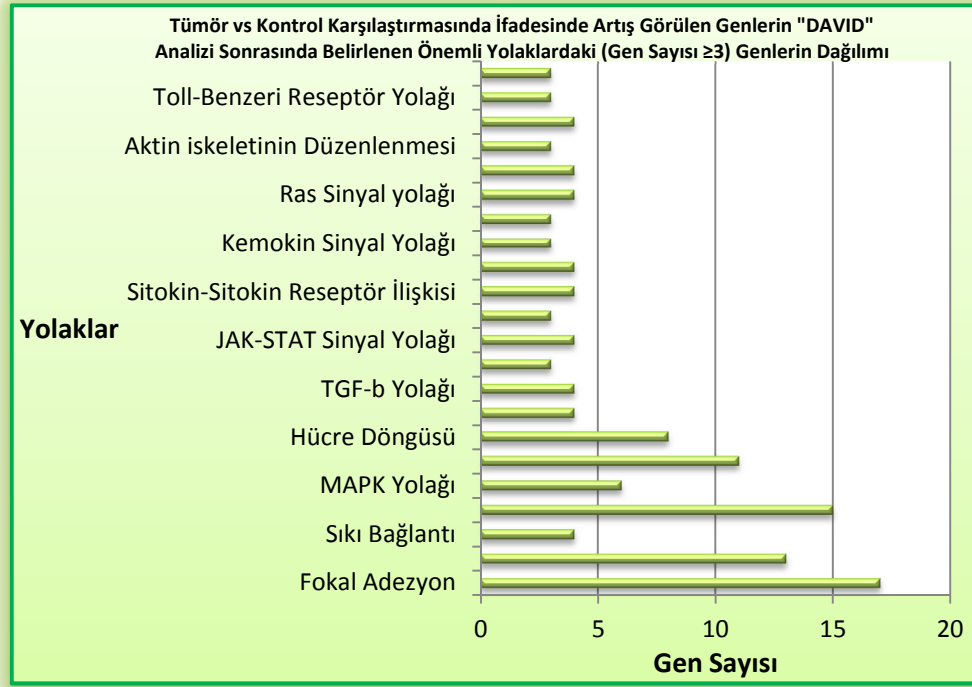
Tümör kontrol karşılaştırmasında 2 kat değişimi ile ifadesi artan gen grubunda 5 ve 5 ten fazla sayıda gen içeren küme çizelge 5.11’de sunulmuştur.

**Çizelge 5.11. Tümör-Kontrol grubu ifadesi artan genler için gen sayısı  $\geq 5$  olan DAVID anotasyon kümeleri**

DAVID Küme No	Zenginleşme Skoru	Anotasyon Küme Adı	Gen Sayısı
1	9,75	hydroxylysine	10
2	5,17	collagen metabolic process	7
3	5,11	propeptide:C-terminal propeptide	5
4	3,41	glycosaminoglycan binding	10
6	3,03	regulation of phosphorylation	18
7	2,97	negative regulation of apoptosis	15
9	2,51	regulation of protein kinase activity	14
11	2,34	platelet alpha granule lumen	5
14	1,89	reproductive structure development	7
15	1,88	ovulation cycle process	5
16	1,84	EGF-like calcium-binding	6
17	1,75	negative regulation of cell growth	6
18	1,71	lung development	6
19	1,62	positive regulation of protein kinase activity	9
20	1,57	positive regulation of RNA metabolic process	15
23	1,41	leucine-rich repeat, cysteine-rich flanking region, N-terminal	6
28	1,23	repeat:LRR 12	5
33	0,91	mitosis	7
36	0,89	repeat:LRR 6	7
42	0,78	calcium-binding region:2	5
44	0,72	hemopoiesis	7
48	0,61	serine-type endopeptidase activity	5
49	0,58	Immunoglobulin I-set	5
58	0,3	GTP binding	7
61	0,29	Pleckstrin homology	5
66	0,14	intracellular protein transport	6
67	0,12	GTPase regulator activity	5
68	0,1	Protein kinase, ATP binding site	6
70	0,08	cellular ion homeostasis	5
71	0,07	ion channel activity	5
72	0,05	ubiquitin-dependent protein catabolic process	7
73	0,03	purine ribonucleotide binding	22
74	0,02	ATP binding	17

Bu tabloda da görüldüğü üzere fosforilasyonun düzenlenmesi, apoptosiz, RNA metabolic prosesinin düzenlenmesi, protein kinaz aktivitesinin düzenlenmesi, glikozaminoglikan binding, hidroksilizin kümeleri genlerin en çok yoğunlaştığı kümelerdir.

Tümör kontrol karşılaştırmasında 2 kat değişimi ile ifadesi artan gen grubunda DAVID analizleri sonrasında oluşan gen listesinde daha önce ifade edildiği üzere gen sayısı  $\geq 3$  olan yolların dağılımı şekil 5.21’de sunulmuştur. Grafikte de görüldüğü üzere genel anlamda sinyal yollarının varlığı dikkat çekerken **fokal adezyon, ekstraselüler-matriks reseptör ilişkisi, kanser yolağı, p53 sinyal yolağı ve hücre döngüsü** genlerin en çok yoğunlaştığı yollardır.



**Şekil 5 21. Tümör-kontrol karşılaştırmasında ifadesinde artış görülen genlerin DAVID analizi sonrasında gen sayısı  $\geq 3$  olan yolakların dağılımı**

Bu değerlendirmelerin ardından daha önce ifade edilen ve tümör kontrol karşılaştırmasında ön plana çıkan genlerin belirlenmesinde oluşturulan kriterler ve sorular çerçevesinde hazırlanan tablo çizelge 5.12.'de sunulmuştur. Bu tabloda 2 kat artış ve  $p < 0.001$  kriterinde zenginleşme skoru  $> 1.3$  olan anotasyon kümesinde yer alan, 3 den fazla anotasyon kümesinde tekrar eden,  $\geq 5$  sayıda gen içeren anotasyon kümesinde olan 3 den fazla yolakta işlevi olan gibi belirlediğimiz tüm kriterleri görebilmekteyiz. Tabloda DAVID fonksiyonel anotasyon küme başlığı altında zenginleşme skoru  $> 1.3$  olan,  $> 5$  sayıda gen içeren anotasyon kümesi gibi kriterle farklı renklendirilerek gösterilmiştir. Daha önce ifade edildiği gibi önemli genlerin belirlenmesinde bu 5 kritein en az 3'ünü sağlaması gerektiği belirtilmiştir.

- Zenginleşme skoru  $> 1.3$  olan kümeler kırmızı renk
- Zenginleşme skoru  $> 1.3$  olan ve gen sayısı  $> 5$  olan anotasyon kümesinde yer alan mavi renk
- Zenginleşme skoru  $< 1.3$  olan kümeler siyah renk
- Zenginleşme skoru  $< 1.3$  olan kümeler ve gen sayısı  $> 5$  olan anotasyon kümesinde yer alan pembe renk



**Çizelge 5.12. Tümör kontrol karşılaştırmasında ifadesinde artış görülen gen grubunda ön plana çıkan genler**

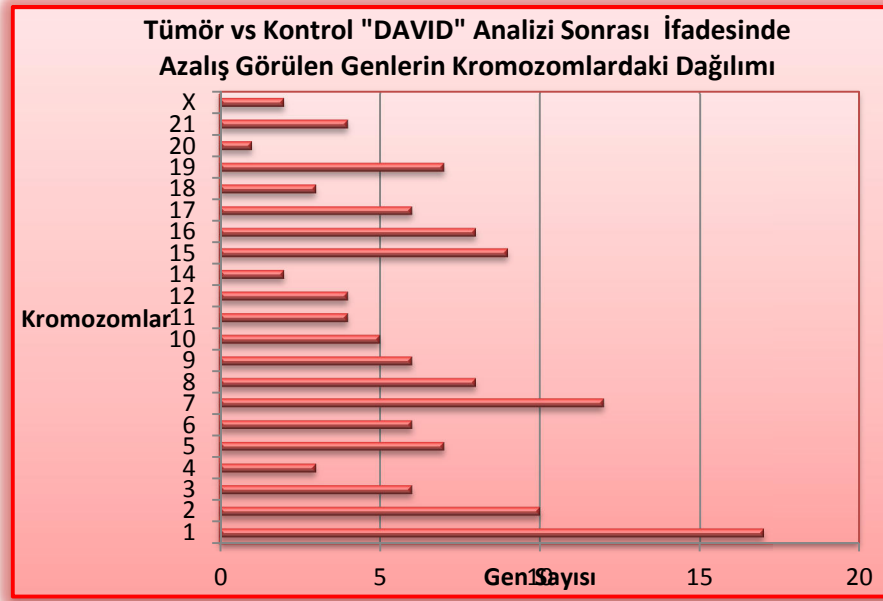
Tümör vs Kontrol Karşılaştırmasında İfadesinde Artış Görülen Genler için "DAVID" Analizi Sonrasında ≥ 3 Yolakta Görülen Genler					
Genin Adı	Genin Sembolü	Sitogenetik Lokasyonu	Kat Değişimi	DAVID Fonksiyonel Anotasyon Küme	Ait Olduğu Yolak Sayısı
collagen, type IV, alpha 2	COL4A2	13q34	3,58 2,33	1	4
fibronectin 1	FN1	2q34	2,27 3,03	4, 11, 13, 30	5
thrombospondin 2	THBS2	6q27	9,19	4, 11, 12	3
secreted phosphoprotein 1	SPP1	4q21-q25	11,05 11,57	17	3
vascular endothelial growth factor A	VEGFA	6p12	3,03 2,28	4, 7, 11, 14, 15, 18, 20, 27, 44	11
cyclin D1	CCND1	11q13	2,45	6, 9, 14, 19, 43, 45, 46, 47	24
met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase 2)	MET	7q31	3,30 2,27 2,27	6, 9, 19, 57, 68, 73, 74	12
ELK1, member of ETS oncogene family	ELK1	Xp11.2	2,74	20	23
guanine nucleotide binding protein (G protein-coupled receptor class B group 1)	GNAI2	3p21	2,3	6, 9, 19, 50, 58, 73	7
cyclin-dependent kinase 4	CDK4	12q14	2,3	45, 68, 73, 74	16
claudin 1	CLDN1	3q28-q29	8,48	70	4
matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	11q22.3	5,86	2, 21, 26	3
bone morphogenetic protein 4	BMP4	14q22-q23	2,21	4, 6, 14, 15, 18, 20, 27, 38, 43, 44	5
BCL-2 Like 1	BCL2L1	20q11.21	2,77	7, 14, 15, 47, 70	9
glutathione S-transferase pi 1	GSTP1	11q13	2,14	7	4
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p21, CIP1, WAF1)	CDKN2A	9p21	7,41	6, 9, 17, 35, 40, 45, 52, 53, 55, 62, 65	12
lymphoid enhancer-binding factor 1	LEF1	4q23-q25	6,03	20, 25, 38, 41, 54	13
run-related transcription factor 1	RUNX1	21q22.3	2,54	20, 25, 38, 41, 54	3
signal transducer and activator of transcription 1	STAT1	2q32.2	2,81 2,44	35	13
heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic class B) class B member 1	HSP90AB1	6p12	2,68	73, 74	3
heat shock 27kDa protein-like 2 pseudogene	Hspb1, HSP27	7q11.23, 9q21.13	2,04 2,39	7	4
cell division cycle 25 homolog B (S. pombe)	CDC25B	20p13	2,37	6, 9, 19, 33	3
growth arrest and DNA-damage-inducible transcript 4	GADD45B	19p13.3	2,02	6, 9, 19, 53	3
serpin peptidase inhibitor, clade E (neuroserpin) member 1	SERPINE1	7q21.3-q22	3,35 3,14 3,14	34, 48, 59	4
cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M1	CDK1	10q21.1	2,2	7, 33, 46, 52, 68, 72, 73, 74	5
budding uninhibited by benzimidazoles 1 (yeast)	BUB1	2q14	2,89	33, 68, 73, 74	3
CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	2q33-q34	2,03	7	4
suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	17q25.3	2,22	6, 7, 72	7
guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	GUCY1A3	4q31.3-q33, 4q31.3-q33	4,95	58, 73	4
glutathione peroxidase 1	GPX1	3p21.3	2,34	7, 35	3
plasminogen activator, urokinase	PLAU	10q24	4,54	48, 59	3
endothelin receptor type A	EDNRA	4q31.23	4,85	6, 9, 19, 25, 43, 50, 70	3
collagen, type I, alpha 1	COL1A1	17q21.33	5,28 4,14 6,14	1, 2, 3, 12	2
sterile alpha motif and leucine zipper class 1 domain containing 1	ZAK	2q24.2	3,07	6, 9, 19, 46, 57, 68, 73, 74	2
inhibin, beta A	INHBA	7p15-p13	11,31	6, 9, 14, 15, 17, 20, 27, 40, 44, 45	2
TIMP metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1	Xp11.3-p11.23	6,95	8, 11, 27, 44	2
matrix metalloproteinase 14 (membrane type 14 matrilysin)	MMP14	14q11-q12	3,01 3,01 3,01	14, 15, 18, 26	2

#### 5.4.1.5.2.1.2. Tümör-Kontrol paired karşılaştırmasında ifadesinde azalma görülen gen grubuna ait sonuçlar

Tümör vs kontrol grubu karşılaştırmasında 925 farklı olarak ifade edilen gen setinde 576 tane genin ifadesinde azalış görülmüştür. 2 kat değişimi ile farklı olarak ifade edilen gen seti ile DAVID yazılımında elde edilen fonksiyonel anotasyon kümeleri üzerinden Gen Adı, Gen Sembolü, Sitogenetik Lokalizasyon, KEGG/Biocarta Yolak, Kat Değişimi, Fonksiyonel Anotasyon Küme ve bu kümelere ait zenginleşme değerlerinin olduğu kapsamlı bir tablo hazırlanmıştır. Tümör kontrol karşılaştırmasında 2 kat değişimi ile



ifadesi azalan gen grubunda DAVID analizleri sonrasında oluşan gen listesinde genlerin kromozomlardaki dağılımı şekil 5.22’de sunulmuştur.



**Şekil 5.22. Tümör-Kontrol karşılaştırmasında DAVID analizi sonrasında ifadesi azalan genlerin kromozomlardaki dağılımı**

Bu tablodan da görüldüğü üzere ifadesi azalan gen grubunda en fazla gen 1. kromozomda görülürken 2 ve 7. kromozomlarda da gen sayısının fazlalığı dikkat çekmektedir.

Tümör kontrol karşılaştırmasında 2 kat değişimi ile ifadesi azalan gen grubunda 5 ve 5 ten fazla sayıda gen içeren küme çizelge 5.13’de sunulmuştur.

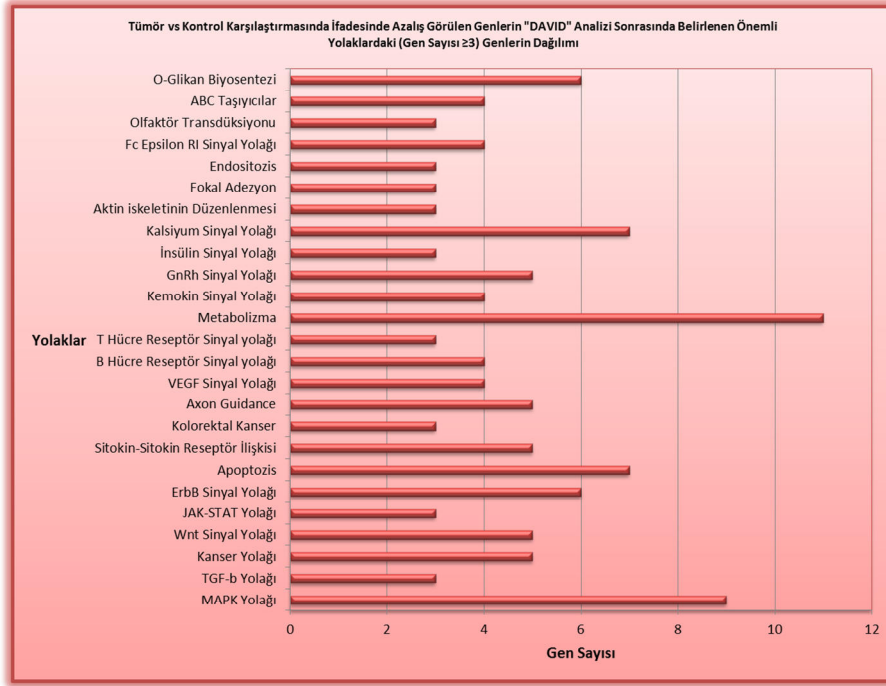
**Çizelge 5.13. Tümör-Kontrol grubu ifadesi azalan genler için gen sayısı  $\geq 5$  olan DAVID anotasyon kümeleri**

Tümör-Kontrol Grubu İfadesi Azalan Genler için Gen Sayısı $\geq 5$ Olan DAVID Anotasyon Kümeleri			
DAVID Küme No	Zenginleşme Skoru	Anotasyon Küme Adı	Gen Sayısı
1	4,4	cadmium ion binding	5
2	2,29	chloride ion binding	7
4	2,11	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances	8
5	2,01	regulation of cell migration	10
6	1,91	protein amino acid glycosylation	8
7	1,9	positive regulation of phosphorylation	7

10	1,53	negative regulation of cell migration	5
11	1,5	negative regulation of protein kinase activity	6
12	1,34	regulation of phosphorylation	16
14	1,29	glycosaminoglycan binding	7
18	1,2	cell migration	11
22	1,05	regulation of protein kinase activity	12
25	0,98	EGF-like	8
26	0,95	positive regulation of cell migration	5
27	0,92	calcium-binding region:1	7
29	0,88	cellular ion homeostasis	12
33	0,8	regulation of apoptosis	21
34	0,72	EF hand	6
37	0,66	ATP biosynthetic process	5
38	0,63	Lysosome	8
40	0,54	positive regulation of protein kinase activity	7
44	0,48	positive regulation of apoptosis	11
45	0,41	negative regulation of apoptosis	9
51	0,2	GTP binding	8
52	0,18	negative regulation of gene expression	10
53	0,16	cell projection morphogenesis	5
	0,01	cellular protein catabolic process	7

Bu tabloda da görüldüğü üzere hücre göçünün düzenlenmesi, fosforilasyonun düzenlenmesi, apoptozis, protein kinaz aktivitesinin düzenlenmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi kümeleri genlerin en çok yoğunlaştığı kümelerdir.

Tümör kontrol karşılaştırmasında 2 kat değişimi ile ifadesi azalan gen grubunda DAVID analizleri sonrasında oluşan gen listesinde daha önce ifade edildiği üzere gen sayısı  $\geq 3$  olan yolların dağılımı şekil 5.23’de sunulmuştur. Grafikte de görüldüğü üzere genel anlamda sinyal yollarının varlığı dikkat çekerken **metabolizma, kalsiyum sinyal yolağı, apoptozis ve MAPK sinyal yolağı** genlerin en çok yoğunlaştığı yollardır.



**Şekil 5.23. Tümör-kontrol karşılaştırmasında ifadesinde azalış görülen genlerin DAVID analizi sonrasında gen sayısı  $\geq 3$  olan yolakların dağılımı**

Bu değerlendirmelerin ardından daha önce ifade edilen ve tümör kontrol karşılaştırmasında ön plana çıkan genlerin belirlenmesinde oluşturulan kriterler ve sorular çerçevesinde hazırlanan tablo çizelge 5.14.'de sunulmuştur. Bu tabloda 2 kat artış ve  $p < 0.001$  kriterinde zenginleşme skoru  $> 1.3$  olan anotasyon kümesinde yer alan, 3 den fazla anotasyon kümesinde tekrar eden,  $\geq 5$  sayıda gen içeren anotasyon kümesinde olan 3 den fazla yolakda işlevi olan gibi belirlediğimiz tüm kriterleri görebilmekteyiz. Tabloda DAVID fonksiyonel anotasyon küme başlığı altında zenginleşme skoru  $> 1.3$  olan,  $> 5$  sayıda gen içeren anotasyon kümesi gibi kriterler farklı renklendirilerek gösterilmiştir. Daha önce ifade edildiği gibi önemli genlerin belirlenmesinde bu 5 kritein en az 3'ünü sağlaması gerektiği belirtilmişti.

- Zenginleşme skoru  $> 1.3$  olan kümeler kırmızı renk
- Zenginleşme skoru  $> 1.3$  olan ve gen sayısı  $> 5$  olan anotasyon kümesinde yer alan mavi renk
- Zenginleşme skoru  $< 1.3$  olan kümeler siyah renk
- Zenginleşme skoru  $< 1.3$  olan kümeler gen sayısı  $> 5$  olan anotasyon kümesinde yer alan pembe renk

**Çizelge 5.14. Tümör kontrol karşılaştırmasında ifadesinde azalış görülen gen grubunda ön plana çıkan genler**

Tümör vs Kontrol Karşılaştırmasında İfadesinde Azalış Görülen Genler için "DAVID" Analizi Sonrasında $\geq 3$ Yolakda Görülen Genler					
Genin Adı	Genin Sembolü	Sitogenetik Lokasyonu	Kat Değişimi	Ait Olduğu Yolak Sayısı	DAVID Fonksiyonel Anotasyon Küme
protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta	PRKACB	1p36.1	4,39 3,98	7	12, 22, 40, 41
fibroblast growth factor receptor 2	FGFR2	10q26	2,5 2,40 3,6	5	14
phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	PLA2G2A	1p35	-4,13	11	23
calcineurin B homologous protein 2	CHP2	16p12.1	-8,55	13	27, 34
epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukem)	EGFR	7p12	-2,18	35	5, 7, 12, 22, 26, 33, 40, 45, 53
mitogen-activated protein kinase kinase 6	MAP2K6	17q24.3	-2,23	11	12, 22, 33, 40, 44
ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5	RLPK	14q31-q32.1	-2,15	4	41, 60
phospholipase A2, group X	PLA2G10	16p13.1-p12	-3,77	11	53
thrombospondin 1	THBS1	15q15	-4,78	6	5, 7, 10, 12, 14, 17, 18, 20, 22, 25, 26, 33, 40, 45
bone morphogenetic protein 2	BMP2	20p12	4,96 7,27	6	7, 12, 36, 52
transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-bo	TCF7L2	10q25.3	2,05 2, 42	11	23, 33, 45
calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta	CAMK2D	4q26	2,33 2,09	9	29
interleukin 6 receptor	IL-6R	1q21	-2,58	5	5, 7, 12, 17, 18, 26, 33, 56
NADPH oxidase 1	NOX1	Xq22	2,42 3,11	3	18, 29
CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	CD79A	19q13.2	-5,29	3	32
phospholipase C, delta 3	PLCD3	17q21.31	4,12 4,14	3	27
phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypept	PIK3CG	7q22.3	-3,07	34	33, 45
protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor	PKIB	6q22.31	-11,13	3	11, 12, 22
protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalyti	PRKAG2	7q36.1	2,64 2,58	3	7, 11, 12, 22, 37, 39, 40
chemokine (C-C motif) ligand 28	CCL28	5p12	6,74 4,35	3	29
plasminogen activator, tissue	PLAT	8p12	-2,16	4	18, 25, 43, 48
cell division cycle 26 homolog (S. cerevisiae); cell divisi	CDC26	7q32.1, 9q32	2,03	3	59
activin A receptor type II-like 1	ACVRL1	12q11-q14	-2,72	2	5, 10, 18
neuregulin 1	NRG1	8p12	-7,27	1	12, 22, 25, 33, 40, 45, 52
B-cell CLL/lymphoma 10; hypothetical LOC646626	BCL10, LOC64	1p22, 1p22.3	3,07 3,42	2	7, 12, 33, 38, 44, 45

**5.4.1.5.2.1.3. Tümör-Kontrol paired karşılaştırmasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen gruplarının birlikte değerlendirilmesi**

Tümör kontrol karşılaştırmasında DAVID analizi sonrasında ifadesi artan gen grubu 349 gen den 136 gene zenginleşirken 576 ifadesi azalan gen ise 130 gene zenginleşmiştir. Zenginleşme skoru  $>1.3$  olan küme sayısı ifadesi artan gen grubu için daha fazladır. Sonuçlar Çizelge 5.15’de paylaşılmıştır.

**Çizelge 5.15. Tümör vs Kontrol karşılaştırmasında ifadesinde artış ve azalış gösteren genlere ait genel tablo**

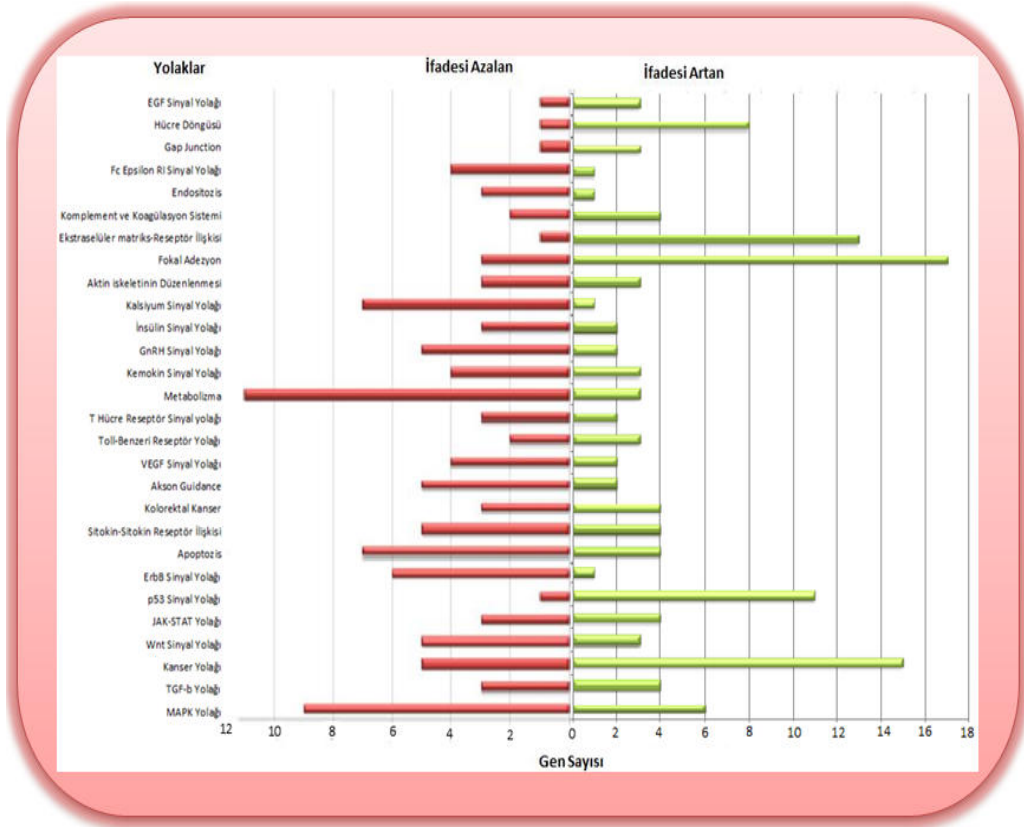
Parametre	İfadesi Azalan Genler	İfadesi Artan Genler
Gen Sayısı	576	349
"Highest" Kriterinde DAVID Fonksiyonel Küme Sayısı	62	74
"Highest" Kriterinde DAVID Fonksiyonel Kümelerinden Oluşturulan Listedeki Gen Sayısı	130	136
E.S. $\geq$ 1.3 Olan DAVID Küme Sayısı	12	26
E.S. $\geq$ 1.3 Olan DAVID Fonksiyonel Kümelerinden Oluşturulan Listedeki Gen Sayısı	56	85

Tümör kontrol karşılaştırmasında 2 kat değişimi ile DAVID analizi sonrasında ortaya çıkan ifadesinde artış ve azalış görülen gen grupları için ortak yolaklar ve bu yolaklardaki gen sayıları açısından değerlendirilmiştir.

**Çizelge 5.16. Tümör vs Kontrol karşılaştırmasında “DAVID” analizi sonrasında ifadesinde artış/azalış görülen gen grupları için ortak yolaklar ve gen sayıları**

Yolak Adı	Farklı İfade Olan Toplam Gen Sayısı	İfadesi Azalan Gen Sayısı	İfadesi Artan Gen Sayısı
Kanser Yolağı	20	5	15
Fokal Adezyon	20	3	17
MAPK Yolağı	15	9	6
Metabolizma	14	11	3
Ekstraselüler matris-Reseptör ilişkisi	14	1	13
p53 Sinyal Yolağı	12	1	11
Apoptozis	11	7	4
Sitokin-Sitokin Reseptör ilişkisi	9	5	4
Hücre Döngüsü	9	1	8
Wnt Sinyal Yolağı	8	5	3
Kalsiyum Sinyal Yolağı	8	7	1
TGF- $\beta$ Yolağı	7	3	4
JAK-STAT Yolağı	7	3	4
ErbB Sinyal Yolağı	7	6	1
Kolorektal Kanser	7	3	4
Alkon Guidance	7	5	2
Kemokin Sinyal Yolağı	7	4	3
GnRH Sinyal Yolağı	7	5	2
VEGF Sinyal Yolağı	6	4	2
Alkin iskeletinin Düzenlenmesi	6	3	3
Komplement ve Koagülasyon Sistemi	6	2	4
Toll-Benzeri Reseptör Yolağı	5	2	3
T Hücre Reseptör Sinyal yolağı	5	3	2
İnsülin Sinyal Yolağı	5	3	2
Fc Epsilon RI Sinyal Yolağı	5	4	1
Endositozis	4	3	1
Gap Junction	4	1	3
EGF Sinyal Yolağı	4	1	3

Tablodan da görüldüğü üzere tümör kontrol karşılaştırmasında 2 kat değişimi ile ön plana çıkan yolaklar genel resimde çeşitli sinyal yolakları olmakla birlikte kanser yolağı, fokal adezyon, MAPK sinyal yolağı, ekstraselüler matris-reseptör ilişkisi, metabolizma, apoptosis ve hücre döngüsü genlerin en çok yoğunlaştığı yolaklardır. Bu yolakların ifadesi azalan/artan gruplardaki durumu şekil 5.24.’de gösterilmiştir.



**Şekil 5.24. Tümör vs Kontrol karşılaştırmasında “DAVID” analizi sonrasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen grupları için ortak yollar ve gen sayıları**

Bu 2 grup için ortak yollardaki genler “KEGG Pathway” yolak şemaları üzerinde gösterilmiştir. Burada örnek ve temsili olarak p53 sinyal yolu gösterilmiştir. Öne çıkan diğer yolak şemaları Ek-3’de sunulmuştur.





**Çizelge 5.17. Tümör-kontrol karşılaştırmasına ait gen ontoloji, zenginleşme, yolak ve önemli genleri içeren özet değerlendirme**

	<b>Tümör vs Kontrol <u>up-regüle</u> genler</b>	<b>Tümör vs Kontrol <u>down-regüle</u> genler</b>
<b>Gen Sayısı</b>	349	576
<b>İfadesinde en fazla değişim görülen 10 gen</b>	COL10A1, SPP1,FAP,INHBA,MMP11, COL12A1,THBS2,CLDN1,CDKN2A,FNDC1	CA1,CLCA4,CA2,ABCC13,SCNN1B,PKIB,CLCA1,SLC26A3SS T,CHP2
<b>Gen sayısı <math>\geq 5</math> ve ES <math>\geq 1.3</math> olan Fonksiyonel Anotasyon Küme Sayısı</b>	33/16	27/9
<b>Gen Sayısı Açısından Öne Çıkan Anotasyon Küme Terimleri (<math>\geq 10</math>)</b>	Hidroksilizin,apoptozis regülasyonu,GAG bağlanması,nükleotid biyosentezi, fosforilasyonun ve protein kinaz aktivitesinin düzenlenmesi, ATP bağlanması,	Hücre göçü ve düzenlenmesi,fosforilasyon ve protein kinaz aktivitesinin düzenlenmesi,apoptozisin düzenlenmesi, transkripsiyonun düzenlenmesi,hücre sel iyon dengesi
<b>Genlerin Yoğunlaştığı Kromozomlar (<math>\geq 10</math>)</b>	2,6,7,11	1,2,12
<b><math>\geq 3</math> gen İçeren Yolak Sayısı</b>	22	25
<b>Gen Sayısı Açısından Öne Çıkan Yolaklar</b>	Fokal adezyon,ekstraselüler matriks reseptör ilişkisi,kanser yolağı,p53 sinyal yolağı,hücre döngüsü, MAPK sinyal yolağı	Metabolizma, MAPK sinyal yolağı, Apoptozis, ErbBsinyal yolağı, kalsiyum sinyal yolağı,
<b>Belirlenen 5 Kriterden En Az 3'ünü Sağlayan Gen Sayısı</b>	37	24
<b>Tüm Kriterleri Sağlayan Gen Sayısı</b>	18	8

#### **5.4.1.5.2.2. Tümör gradeleri arasında yapılan karşılaştırmalara ait bulgular**

Tez çalışması kapsamında örneklere ait grade bilgilerinden yararlanılarak grade'ler arası (tümör grade I (n=3)-tümör grade II (n=26)-tümör grade III (n =20)) paired ve unpaired karşılaştırmalar yapılarak değerlendirilmiştir. Grade I grubunda yer alan hasta sayısı analizlerin kasamı açısından yeterli olmamakla birlikte analizlerin imkan verdiği ölçüde bu grupla yapılabilecek karşılaştırmalar için fikir vermesi açısından değerlendirmeye alınmıştır. Unpaired karşılaştırmalarda çıkan gen sayıları ile DAVID analizleri gerçekleştirilememiştir. Genler DAVID yazılımında değerlendirildiğinde ya hiç fonksiyonel anotasyon kümesi oluşmamış yada hiç zenginleşme skoru  $>1.3$  küme oluşmamıştır. Bu nedenle unpaired karşılaştırmalar için farklı ifade edilen genler doğrudan değerlendirilmiştir..

#### **5.4.1.5.2.2.1. Unpaired karşılaştırmalara ait bulgular**

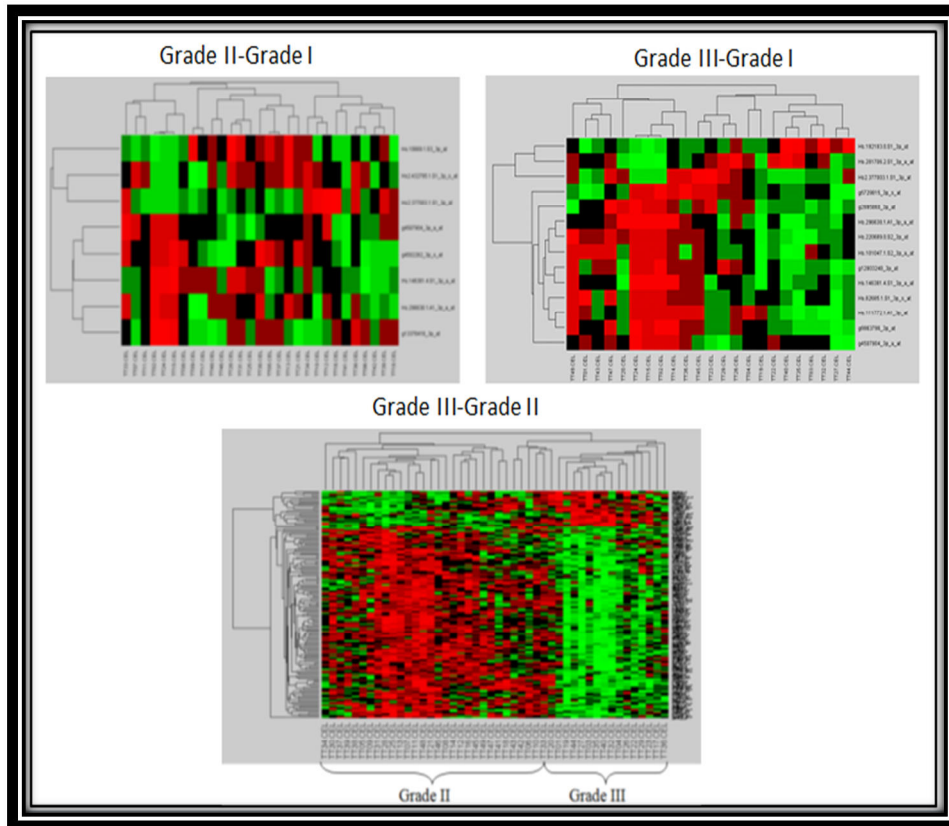
Tümör Grade II-Tümör Grade I  
Tümör Grade III-Tümör Grade I  
Tümör Grade III-Tümör Grade II

Tümör grade I-II-II arasında gerçekleştirilen unpaired karşılaştırmalarda farklı olarak ifade edilen genlerin tespitinde farklı kat değişimleri ve farklı p değerleri kullanılarak genel bir tablo ortaya konmuş olup sonuçlar tek bir tablo üzerinde çizelge 5.18.'de sunulmuştur. Bu karşılaştırmalar için sadece tabloda yer alan p değerleri ile bir sonuç elde edilebilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda tüm karşılaştırmalarda 2 kat değişimi ve  $p<0.05$  anlamlılıkta sonuçlar değerlendirilmiştir. grade II-I karşılaştırmasında 8 gen, grade III-I karşılaştırmasında 14 gen ve grade III-II karşılaştırmasında 153 gen farklı olarak ifade edilmiştir.

**Çizelge 5.18. 2 kat artış ile unpaired tümör grade karşılaştırmaları sonucu elde edilen farklı ifade edilen gen sayıları**

2 Kat Artış ile Unpaired Tümör Grade Karşılaştırmaları Sonucu Elde Edilen Farklı İfade Edilen Gen Sayıları						
FC	Tümör Grade II- Tümör Grade I Karşılaştırması Farklı İfade Edilen Gen Sayısı		Tümör Grade III- Tümör Grade I Karşılaştırması Farklı İfade Edilen Gen Sayısı		Tümör Grade III-Tümör Grade II Karşılaştırması Farklı İfade Edilen Gen Sayısı	
	$\geq 2$ $P < 0,05$	8		14		153
Artış		Azalış	Artış	Azalış	Artış	Azalış
3		5	3	11	24	129

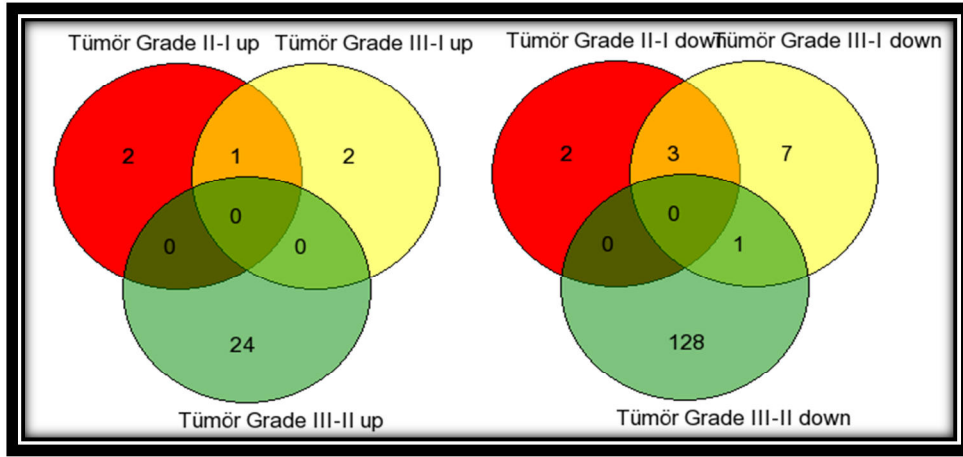
Farklı olarak ifade edilen gen setlerin belirlenmesinin ardından bu genler ile gerçekleştirilen kümeleme analiz sonuçları şekil 5.26.'da gösterilmiştir. Tüm karşılaştırmalara ait sonuçlar birlikte değerlendirilebilmek adına tek bir şekil üzerinde gösterilmiştir.



**Şekil 5.26. Tümör grade unpaired karşılaştırmalar kümeleme analiz görüntüleri**

Şekillerde de görüldüğü üzere sadece grade III-II karşılaştırmasında bu iki grubun gen ifade paternlerine göre ayrılabilirdiği gözlenmişken diğer iki karşılaştırmada örnekler için net kümeler oluşturabilen bir gen ifade paterni görülmemiş olup gruplar ayrılamamıştır. Bu noktada net bir profilin ortaya çıkamamasında grade I'deki hasta sayısının az olması bir etken olabilir. Grade III-II karşılaştırması farklı ifade edilen gen listesi Ek-4'de sunulmuştur.

Tüm karşılaştırmalar için ortak genler ve karşılaştırmalara özel genleri görebilmek için ifadesi **artan ve azalan gen listeri** ile “GeneVenn” internet tabanlı uygulama aracılığı ile **ayrı ayrı** ven şemaları çizdirilmiştir (Şekil 5.27.).



**Şekil 5.27. Tümör grade II-I, III-I ve III-II karşılaştırmalarında farklı ifade edilen ve ifadesinde artış ve azalış görülen genlere ait ven diyagramı**

Bu değerlendirme sonrasında grade II-I karşılaştırmasına özgü 4 gen, grade III-I karşılaştırmasına özgü 9 gen ve grade III-II karşılaştırmasına özgü 128 gen bulunmaktadır. Bu genlere ait listeler ek olarak sunulmuştur.

#### **5.4.1.5.2.2.2. Paired karşılaştırmalara ait bulgular**

- Tümör Grade I-Normal Grade I
- Tümör Grade II-Normal Grade II
- Tümör Grade III-Normal Grade III

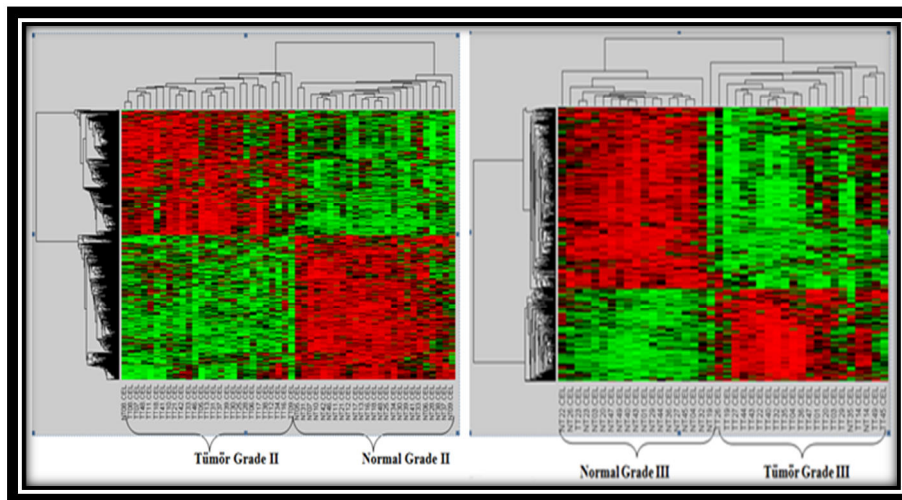
Tümör-normal grade I-II-II arasında gerçekleştirilen paired karşılaştırmaları arasında Tümör grade I- Normal grade I karşılaştırmasına ait anlamlı veri elde edilememiştir. Sadece diğer 2

paired karşılaştırmasına ait sonuçlar sunulmuştur. Bu karşılaştırmalar için farklı olarak ifade edilen genlerin tespitinde farklı kat değişimleri ve farklı p değerleri kullanılarak genel bir tablo ortaya konmuş olup; 2 kat ve  $p < 0.001$  parametreleri çerçevesinde elde edilen genler ile analize devam edilmiştir. Tüm karşılaştırmalar için bu parametreler çerçevesinde farklı olarak ifade edilen gen sayıları tek bir tablo üzerinde çizelge 5.19.'da sunulmuştur. Tümör Grade II-normal grade II karşılaştırmasında 1097 gen, Tümör grade III-Normal grade III karşılaştırmasında 487 gen farklı olarak ifade edilmiştir.

**Çizelge 5.17. 2 kat artış ile paired tümör –normal grade karşılaştırmaları sonucu elde edilen farklı ifade edilen gen sayıları**

2 Kat Artış ile Tümör Grade-Normal Grade Karşılaştırmaları Sonucu Elde Edilen Farklı İfade Edilen Gen Sayıları						
FC	Tümör Grade I- Normal Grade I Karşılaştırması Farklı İfade Edilen Gen Sayısı		Tümör Grade II- Normal Grade II Karşılaştırması Farklı İfade Edilen Gen Sayısı		Tümör Grade III-Normal Grade III Karşılaştırması Farklı İfade Edilen Gen Sayısı	
$\geq 2$ $P < 0.001$	Anlamlı Sonuç Yok		1097		487	
	Artış	Azalış	Artış	Azalış	Artış	Azalış
			509	588	165	322

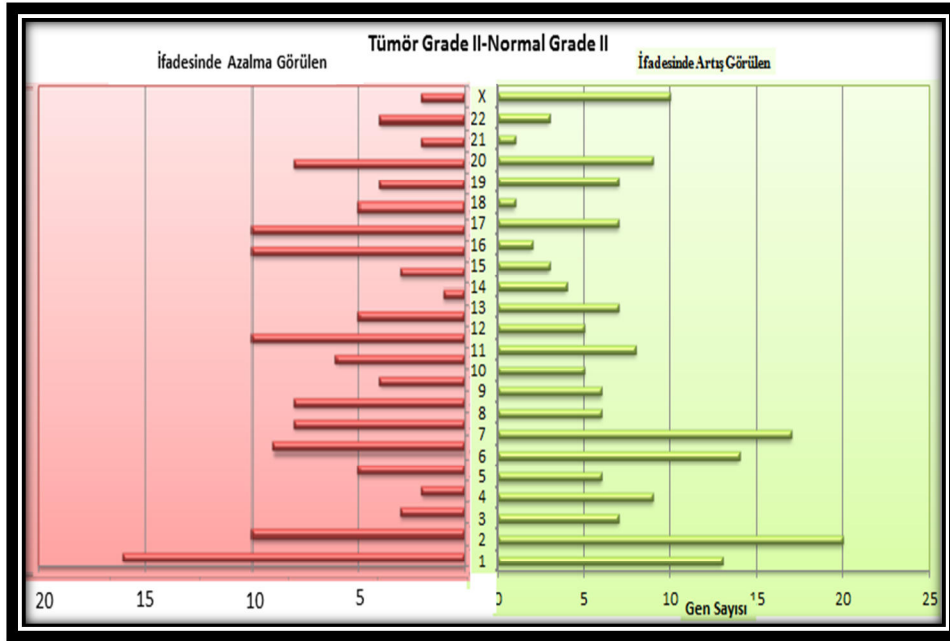
Farklı olarak ifade edilen gen setlerin belirlenmesinin ardından bu genler ile gerçekleştirilen kümeleme analiz sonuçları şekil 5.28.'de gösterilmiştir. Tüm karşılaştırmalara ait sonuçlar birlikte değerlendirebilmek adına tek bir şekil üzerinde gösterilmiştir.



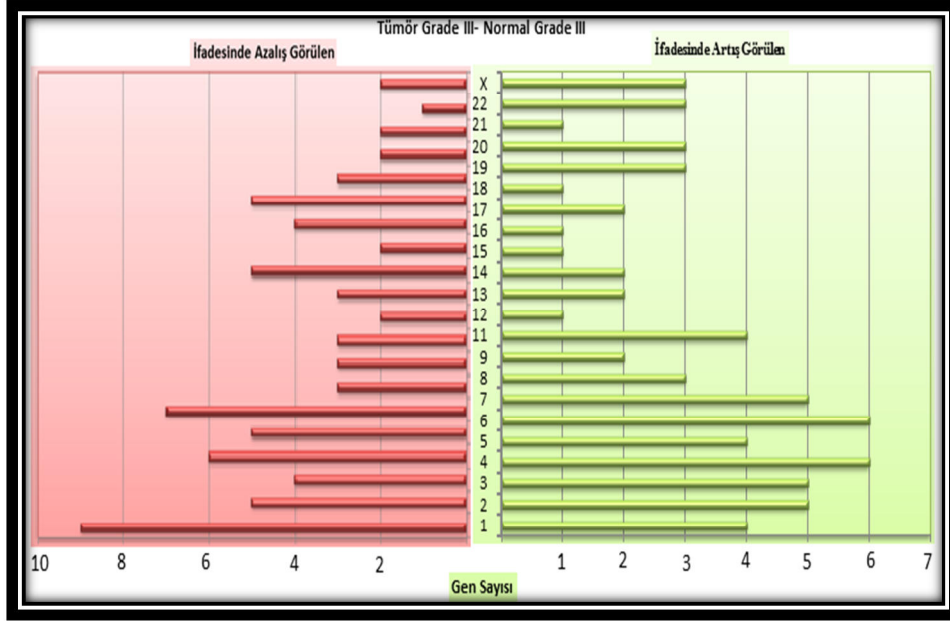
**Şekil 5.28. Grade II,III Tümör-kontrol karşılaştırması kümeleme analiz görüntüleri**

Şekillerde de görüldüğü üzere tümör grade II, III ve normal eşleri ile gerçekleştirilen karşılaştırmalarda elde edilen farklı ifade edilen gen setleri ile gerçekleştirilen kümeleme analizlerinde 2 karşılaştırmada 2 ayrı grup için belirli gen ifade paternleri ortaya çıkmış ve örneklerin bu patern çerçevesinde tümör ve normal olarak 2 ayrı gruba kümelendiği gözlenmektedir.

Tümör grade II-Normal grade II karşılaştırmasında DAVID analizleri sonrasında en fazla gen 2. kromozomda görülürken 1, 6, 7, 11, 15, 16 ve X kromozomu da genlerin yoğunlaştığı ( $\geq 10$  gen) diğer kromozomlardır. Tümör grade III-Normal grade III karşılaştırmasında DAVID analizleri sonrasında Grade II karşılaştırmasındaki kadar gen yoğunluğu olmasa da 1, 2, 4, 6, 7, 15 ve 18. kromozomlar genlerin yoğunlaştığı kromozomlardır. Her iki karşılaştırma için kromozomların genlerdeki dağılımı şekil 5.29 ve 5.30'da sunulmuştur.



Şekil 5.29. Tümör grade II-normal grade II genlerin kromozomlardaki dağılımı

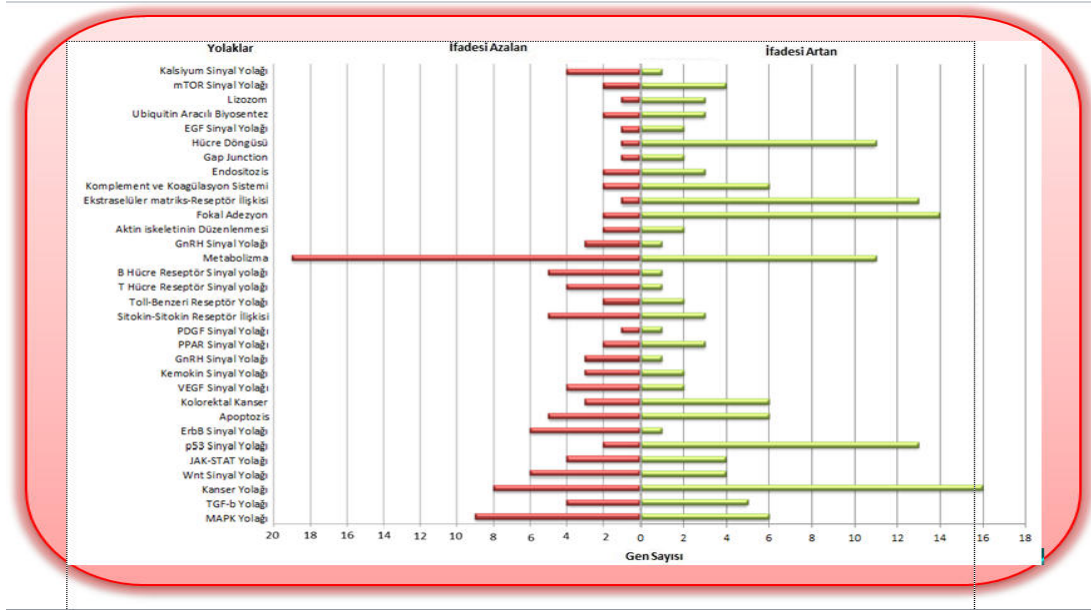


Şekil 5.30. Tümör grade III-normal grade III genlerin kromozomlardaki dağılımı

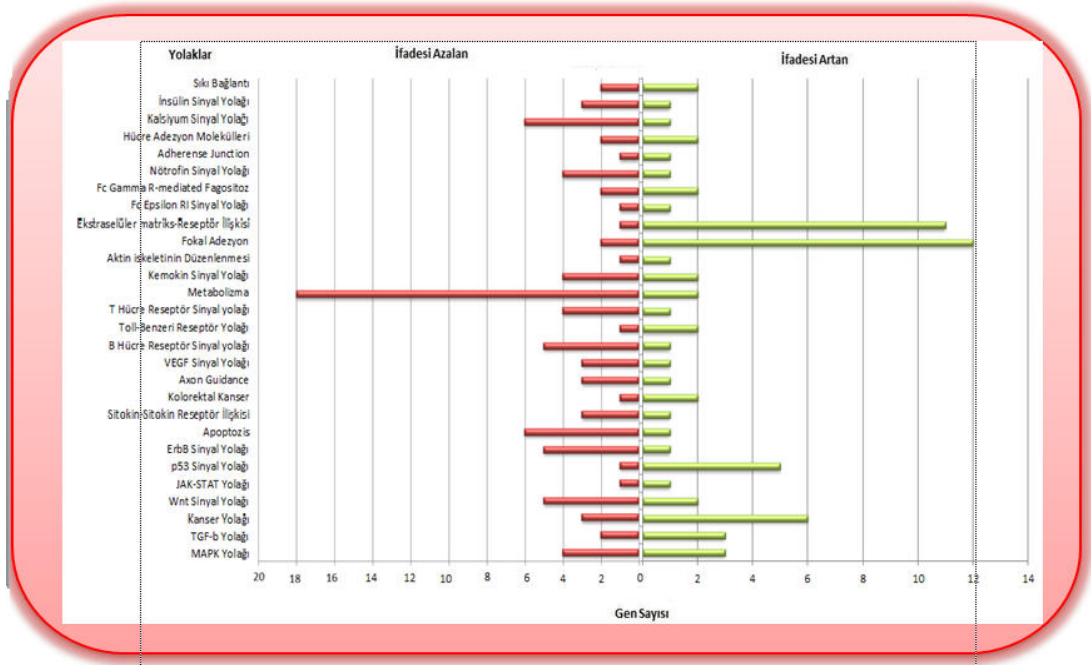
DAVID yazılımı ile gerçekleştirilen analizlerde oluşan fonksiyonel anotasyon kümelerine baktığımızda ön plana çıkan terimler ( $\geq 10$  gen) Tümör Grade II-normal grade II karşılaştırmasında fosforilasyonun düzenlenmesi, apoptozisin düzenlenmesi, hücre göçü, hidrosilizin, glikozaminoglikan bağlanması, protein kinaz aktivitesinin düzenlenmesi, transkripsiyonun düzenlenmesi nükleozid bağlanması başlıkları genlerin en çok yoğunlaştığı küme terimleri olarak dikkat çekerken Tümör Grade III-normal grade III karşılaştırmasında ise up regüle gen listesi için hemen hemen aynı terimler (hidrosilizin, apoptozis regülasyonu, transkripsiyon regülasyonu, ribonükleotid bağlanması) görülürken down regüle gen listesinde sadece 3 terim ön plana çıkmaktadır. Bunlar: hücresel iyon homeostazı, fosforilasyonun regülasyonu ve apoptozisdir. Hücresel iyon homeostazisi ilk defa bu karşılaştırmada ön plana çıkmıştır.

Tümör Grade II, III ve eşli normalleri ile gerçekleştirilen karşılaştırmalarda DAVID analizleri sonrasında oluşan gen listesinde görülen yollar değerlendirilmiş olup 2 karşılaştırmada yolların ve yollardaki genlerin dağılımı şekil 5.31. ve 5.32.'de sunulmuştur. Grafikler de görüldüğü iki karşılaştırmada da benzer yollar görülmekte olup genel anlamda sinyal yollarının varlığı dikkat çekmektedir. **Her iki yolda da metabolizma en fazla gen barındıran yola olmuştur. Dikkat çeken bir ayrıntı çok benzer yollar iki karşılaştırmada da görülmekle birlikte grade II karşılaştırmasında yollardaki gen sayıları daha fazladır. İki karşılaştırmada da en çok dikkat çeken yollar kanser**

yolağı, metabolizma, fokal adezyon, ekstraselüler matris reseptör ilişkisi, Apoptozis, p53 sinyal yolağı vs...



Şekil 5.31. Tümör grade II-normal grade II karşılaştırmasında “DAVID” analizi sonrasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen grupları için ortak yolaklar ve gen sayıları



Şekil 5.32. Tümör grade III-normal grade III karşılaştırmasında “DAVID” analizi sonrasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen grupları için ortak yolaklar ve gen sayıları

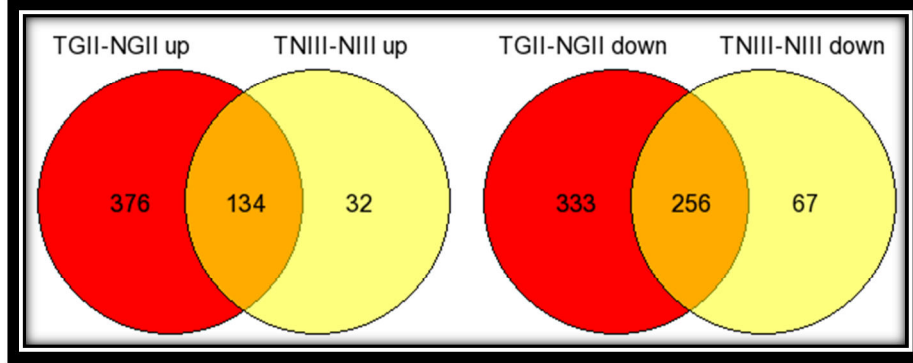


Bu iki karşılaştırmalara ait yapılan tüm değerlendirmelerin genel özeti çizelge 5.20.'de sunulmuştur.

**Çizelge 5. 20. Grade II ve III tümör-kontrol karşılaştırmalarına ait gen ontoloji, zenginleşme, yolak ve önemli genleri içeren özet tablo**

	<b>Tümör Grade II-Normal Grade II <u>up-regüle</u> genler</b>	<b>Tümör Grade II-Normal Grade II <u>down-regüle</u> genler</b>	<b>Tümör Grade III-Normal Grade III <u>up-regüle</u> genler</b>	<b>Tümör Grade III-Normal Grade III <u>down-regüle</u> genler</b>
<b>Gen Sayısı</b>	509	588	165	322
<b>İfadesinde en çok değişim görülen 10 gen</b>	COL10A1,FAP,INHBA,MMP11,SPP1,COL12A1,CLDN1,THBS2,CDKN2A,TIMP1	CLCA4,CA1,CA2,CLCA1,GUCA2A,PKIB,ABCC13,SST,SCNN1B,UGT2D17	SPP1,INHBA,COL10A1,MMP11,COL12A1,THBS2,TIMP1,CDKN2A	CA1,CLCA4,SLC26A3,SCNN1B,PKIB,ABCC13,CLDN8,CA2,BMP2,CLCA1
<b>Gen sayısı <math>\geq 5</math> / ES <math>\geq 1.3</math> olan Fonksiyonel Anotasyon Küme Sayısı</b>	42/15	27/9	21/11	18/2
<b>Gen Sayısı Açısından Öne Çıkan Anotasyon Küme Terimleri (<math>\geq 10</math>)</b>	Hidroksilizin,apoptozis regülasyonu,GAG bağlanması,nükleotid biyosentezi, EGF like type3, fosforilasyonun ve protein kinaz aktivitesinin düzenlenmesi	Hücre göçü vedüzenlenmesi,fosforilasyon ve protein kinaz aktivitesinin düzenlenmesi,apoptozisin düzenlenmesi, transkripsiyonun düzenlenmesi	Hidroksilizin,apoptozis regülasyonu,transkripsiyon regülasyonu, ribonükleotid bağlanması	Hüresel İyon Hemostazı,Fosforilasyonun Regülasyonu, Apoptozis
<b>Genlerin Yoğunlaştığı Kromozomlar (<math>\geq 10</math>)</b>	1,2,6,7,X	1,2,11,15,16	2,3,4,6,7 ( $\geq 5$ gen)	1,2,4,5,6,15,18 ( $\geq 5$ gen)
<b><math>\geq 3</math> gen İçeren Yolak Sayısı</b>	27	24	8	18
<b>Gen Sayısı Açısından Öne Çıkan Yolaklar</b>	Fokal adezyon,ekstraselüler matriks reseptör ilişkisi,kanser yolağı,p53 sinyal yolağı,hücre döngüsü, metabolizma	Metabolizma, MAPK sinyal yolağı, ErbBsinyal yolağı, kanser yolağı, Wnt sinyal yolağı	Fokal adezyon,ekstraselüler matriks reseptör ilişkisi,kanser yolağı,p53 sinyal yolağı,	Metabolizma, apoptozis, ErbBsinyal yolağı, Wnt sinyal yolağı, kalsiyum sinyal yolağı, B-hücre reseptör sinyal yolağı
<b>Belirlenen 5 Kriterden En Az 3'ünü Sağlayan Gen Sayısı</b>	46	35	26	22
<b>Tüm Kriterleri Sağlayan Gen Sayısı</b>	22	10	7	4
<b>Tüm Kriterleri Sağlayan Genler</b>	MYC, THBS2, VEGFA, CCND1, MET, MMP1, BMP4, BCL2L1, CDKN2A, STAT1, CDC25B, GADD45B, CDK1, GPX1, PLAU, EDNRA, IRAK1, NME1, MSH2, LYN, RIPK2, INBA	PRKACB, THBS1, BMP2, IL6R, IL6ST, PKIB, PRKAG2, CDKN1A, PSEN1, ACVRL1	THBS2, SPP1, BCL2L1, CDKN2A, GPX1, RIPK2, INHBA	PPARD, NEDD4I, CAMK2D, NOX1

Tüm karşılaştırmalar için ortak genler ve karşılaştırmalara özel genleri görebilmek için ifadesi artan ve azalan gen listeri ile “GeneVenn” internet tabanlı uygulama aracılığı ile ayrı ayrı ven şemaları çizdirilmiştir (şekil 5.33.).



Şekil 5.33. Tümör grade II-normal grade II ve tümör grade III-normal grade III karşılaştırmalarında farklı ifade edilen ve ifadesinde artma ve azalma görülen genlere ait ven diyagramı

Bu değerlendirmede sadece tümör grade II-normal grade II karşılaştırmasında özgü 709 gen bulunurken sadece tümör grade III-normal grade III karşılaştırmasında özgü 99 gen bulunmaktadır. Bu iki diyagramdan hem ifadesinde artış hem de azalma görülen gruplar için karşılaştırmalara özel genler çıkarılmıştır.

#### **5.4.1.5.2.3. Tümör lokasyonu ile ilgili karşılatırmaların gen ifade analizi verilerine ait bulgular**

Bu tez çalışmasında çalışılan tümör örneklerin % 76'sı (n=38) sol kolon yerleşimli iken % 24'ü sağ kolon (n=11) yerleşimlidir. Kanserin bulgu ve belirtilerin tümörün lokalizasyonuna bağlı olarak da değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Bu değişikliğin altında yatan nedenlere moleküler açıdan bakmak için sol ve sağ kolon yerleşimli tümörler arası gen ifade profil farklılıklarını değerlendirebilmek adına paired ve unpaired karşılaştırmalar yapılmıştır. Karşılaştırmalar sonucunda farklı olarak ifade edilen genler DAVID yazılımı kapsamında değerlendirilmiştir.

Unpaired karşılaştırmalarda çıkan gen sayısı ile DAVID analizleri gerçekleştirilememiştir. Genler DAVID yazılımında değerlendirildiğinde hiç fonksiyonel anotasyon kümesi oluşmamıştır. Bu nedenle unpaired karşılaştırmalar için farklı ifade edilen genler doğrudan değerlendirilmiştir. Yapılan karşılaştırmalar aşağıda sunulmuştur.

#### **Unpaired karşılaştırmalar:**

Tümör Sol kolon-Tümör Sağ Kolon

#### **Paired karşılaştırmalar:**

Tümör Sol Kolon-Normal Sol Kolon

Tümör Sağ Kolon-Normal Sağ Kolon

#### **5.4.1.5.2.3.1.Unpaired tümörsol kolon-tümör sağ kolon karşılaştırmalarına ait bulgular**

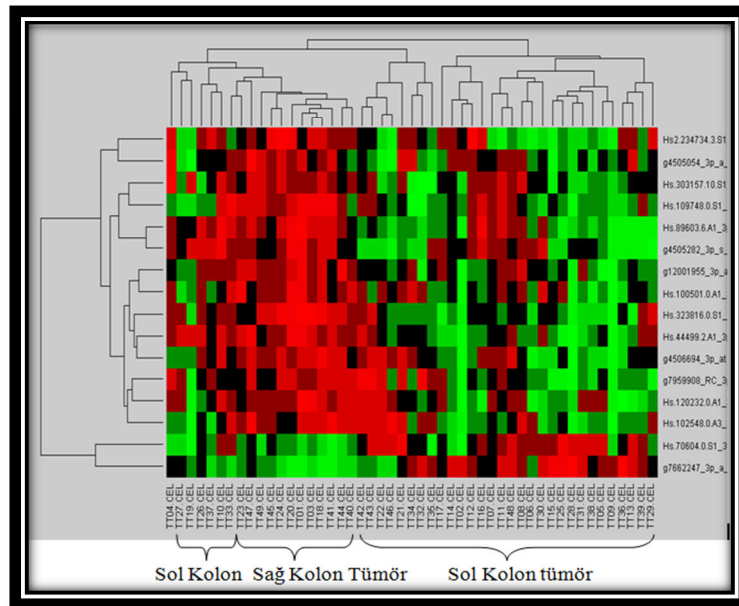
Farklı olarak ifade edilen genlerin tespitinde farklı kat değişimleri ve farklı p değerleri kullanılarak genel bir tablo ortaya konmuş olup sonuçlar çizelge 5.21.'de sunulmuştur. Yapılan analizler sonucunda sadece  $p < 0.05$  anlamlılıkta gen elde edilmiştir. Karşılaştırma için fikir vermesi açısından tüm karşılaştırmalarda kat değişimi için kullanılan 2 kat değişimi ile ( $p < 0.05$ ) farklı olarak ifade edilen 16 gen değerlendirmeye alınmıştır. Bu 16 genin 2 tanesinin ifadesinde artma görülürken 14 genin ise ifadesinde azalma görülmüştür.

İlgili gen listesi çizelge 5.22.'de sunulmuştur. Çizelgede ifadesinde azalma görülen genler kırmızı renkle artış görülen genler ise yeşil renk ile gösterilmiştir.

**Çizelge 5.21. Tümör sol kolon-tümör sağ kolon karşılaştırmasında farklı kat değişimleri ve p değerleri ile birlikte farklı olarak ifade edilen gen sayıları**

Tümör Sol Kolon vs Tümör Sağ Kolon Farklı Kat Değişimleri ve p Değerleri ile Birlikte Farklı Olarak İfade Edilen Gen Sayıları			
Kat Değişimi ve p Değeri	Farklı İfade Edilen Gen Sayısı	İfadesi Artan Gen Sayısı	İfadesi Azalan Gen Sayısı
$\geq 1.5$ kat P < 0.05	35	2	33
$\geq 1.8$ kat P < 0.05	24	2	22
$\geq 2$ kat P < 0.05	16	2	14
$\geq 2.5$ kat P < 0.01	9	1	8

2 kat değişimi ile tümör ve kontrol grubu arasında farklı ifadelendiği tespit edilen 16 gen ile gerçekleştirilen kümeleme analizi sonucunda sol ve sağ kolon arasında belirli bir ayırıcı gen ifade paterni yakalanamamıştır.



**Şekil 5.34. Tümör sol kolon-tümör sağ kolon karşılaştırması hiyerarşik kümeleme grafiği**

**Çizelge 5.22. Tümör sol kolon-tümör sağ kolon karşılaştırmasında farklı olarak ifade edilen 16 gene ait genel tablo**

Probe Set ID	Gen Sembolü	Gen Adı	Sitogenetik Lokasyon	Kat Değişimi	Artış/Azalış	p Değeri	GO Biyolojik Proses Terimi
g12001955_3p_at	MPDU1	mannose-P-dolichol utilization defect 1	17p13.1-p12	-2,59	Azalış	0,04	protein folding /// dolichol-linked oligosaccharide biosynthetic process /
g4505054_3p_a_at	LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncog	8q13	-2,20	Azalış	0,05	B cell homeostasis /// B cell homeostasis /// regulation of cytokine produ
g4505282_3p_s_at	MUC1	mucin 1, cell surface associated	1q21	-2,96	Azalış	0,04	anti-apoptosis /// DNA damage response, signal transduction by p53 class
g4506694_3p_at	RPS19	ribosomal protein S19	19q13.2	-2,83	Azalış	0,05	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay /
g7662247_3p_a_at	PHACTR2	phosphatase and actin regulator 2	6q24.2	2,75	Artış	0,05	---
g7959908_RC_3p_s_at	PDLIM5	PDZ and LIM domain 5	4q22	-2,72	Azalış	0,05	regulation of synapse assembly /// regulation of synapse assembly /// re
Hs.100501.0.A1_3p_at	LOC100505549	uncharacterized LOC100505549	18	-2,48	Azalış	0,04	---
Hs.102548.0.A3_3p_a_at	ARHGAP35	Rho GTPase activating protein 35	19q13.3	-2,26	Azalış	0,04	transcription, DNA-dependent /// transcription, DNA-dependent /// regu
Hs.109748.0.S1_3p_x_at	TMEM54	transmembrane protein 54	1p35-p34	-3,04	Azalış	0,04	---
Hs.120232.0.A1_3p_at	---	---		-2,08	Azalış	0,05	---
Hs.303157.10.S1_3p_x_at	PRSS3	protease, serine, 3	9p11.2	-3,24	Azalış	0,04	proteolysis /// proteolysis /// proteolysis /// proteolysis /// digestion ///
Hs.323816.0.S1_3p_at	C17orf28	chromosome 17 open reading frame 28	17q25.1	-3,54	Azalış	0,05	---
Hs.44499.2.A1_3p_s_at	C15orf63 /// MIR12	chromosome 15 open reading frame 63 /// micro	15q15.3	-2,14	Azalış	0,02	nuclear mRNA splicing, via spliceosome /// transcription, DNA-dependen
Hs.70604.0.S1_3p_at	ATP9A	ATPase, class II, type 9A	20q13.2	2,12	Artış	0,04	cation transport /// metabolic process /// phospholipid transport /// pho
Hs.89603.6.A1_3p_a_at	MUC1	mucin 1, cell surface associated	1q21	-5,31	Azalış	0,03	anti-apoptosis /// DNA damage response, signal transduction by p53 class
Hs2.234734.3.S1_3p_s_at	LYZ	lysozyme	12q15	-2,47	Azalış	0,05	inflammatory response /// metabolic process /// cell wall macromolecul

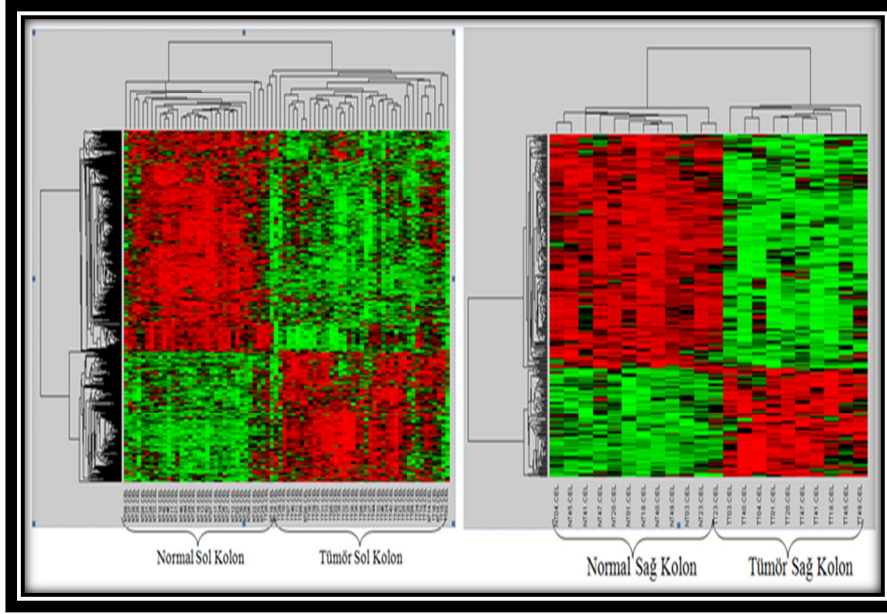
#### 5.4.1.5.2.3.2. Paired tümör-normal lokasyon karşılaştırması gen ifade analizi verilerine ait bulgular

Sol ve sağ yerleşimli tümör örnekleri ile bunların eşli normal örnekleri arasında gerçekleştirilen paired karşılaştırmaları arasında farklı olarak ifade edilen genlerin tespitinde farklı kat değişimleri ve farklı p değerleri kullanılarak genel bir tablo ortaya konmuştur. Belirlenen 2 kat artış/azalış çerçevesinde sonuçlar tek bir tablo üzerinde çizelge 5.23.'de sunulmuştur. Tümör sağ kolon-normal sağ kolon karşılaştırmasında 337 gen, Tümör sol kolon-normal sol kolon karşılaştırmasında 900 gen farklı olarak ifade edilmiştir.

**Çizelge 5.23. 2 kat artış ile tüm tümör lokalizasyon karşılaştırmaları için farklı olarak ifade edilen gen sayıları**

FC	Tümör Sağ Kolon-Normal Sağ Kolon Karşılaştırması Farklı İfade Edilen Gen Sayısı P< 0,05		Tümör Sol Kolon- Normal Sol Kolon Karşılaştırması Farklı İfade Edilen Gen Sayısı P< 0,001	
	Artış	Azalış	Artış	Azalış
≥2 Kat	337		900	
	107	230	333	567

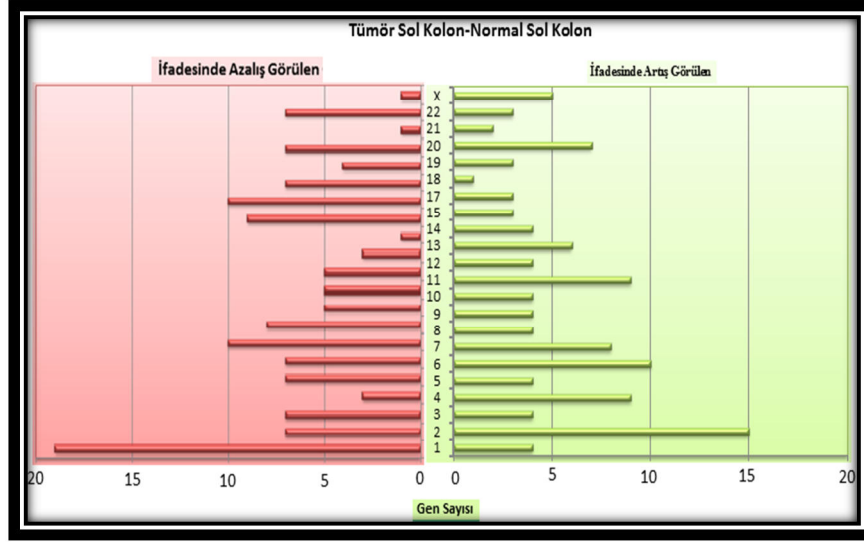
Farklı olarak ifade edilen gen setlerin belirlenmesinin ardından bu genler ile gerçekleştirilen kümeleme analiz sonuçları şekil 5.35.'de gösterilmiştir. Tüm karşılaştırmalara ait sonuçlar birlikte değerlendirebilmek adına tek bir şekil üzerinde gösterilmiştir.



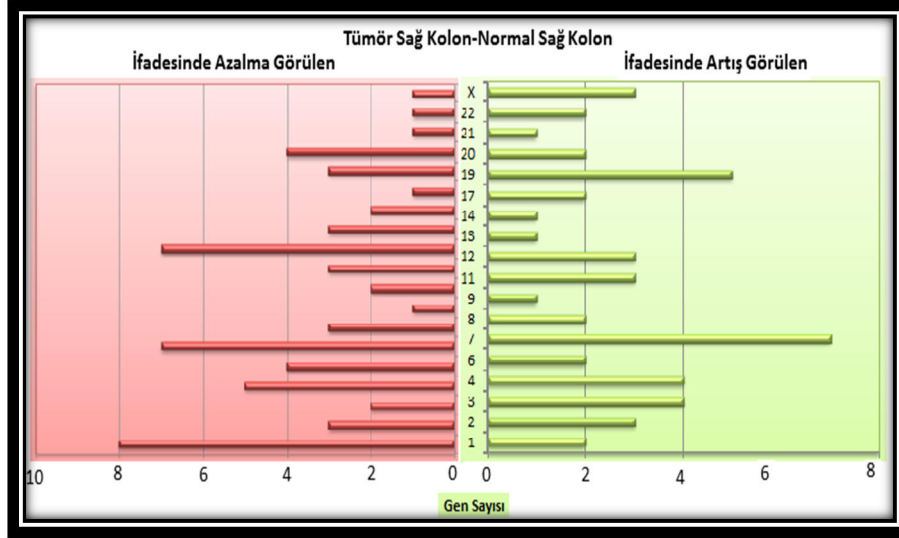
**Şekil 5.35. Sol kolon, sağ kolon Tümör-normal eşli karşılaştırması kümeleme analiz görüntüleri**

Şekillerde de görüldüğü üzere sol ve sağ kolon yerleşimli örnekler ve normal eşleri ile gerçekleştirilen karşılaştırmalarda elde edilen farklı ifade edilen gen setleri ile gerçekleştirilen kümeleme analizlerinde 2 karşılaştırmada 2 ayrı grup için belirli gen ifade paternleri ortaya çıkmış ve örneklerin tümör ve normal olarak 2 ayrı gruba kümelendiği gözlenmektedir.

Tümör sol kolon-Normal sol karşılaştırmasında DAVID analizleri sonrasında en fazla gen 2 ve 6. kromozomlarda genlerin yoğunlaştığı ( $\geq 10$  gen) gözlenirken 4 ve 11 nolu kromozomlarda 9 gen ise ön plana çıkan diğer kromozomlardır. Tümör sağ kolon-normal sağ kolon karşılaştırmasında DAVID analizleri sonrasında 1, 7, 15 ve 16. kromozomlar genlerin yoğunlaştığı kromozomlardır. Her iki karşılaştırma için kromozomların genlerdeki dağılımı şekil 5.36 ve 5.37’de sunulmuştur.



Şekil 5.36. Tümör sol kolon-normal sol kolon genlerin kromozomlardaki dağılımı

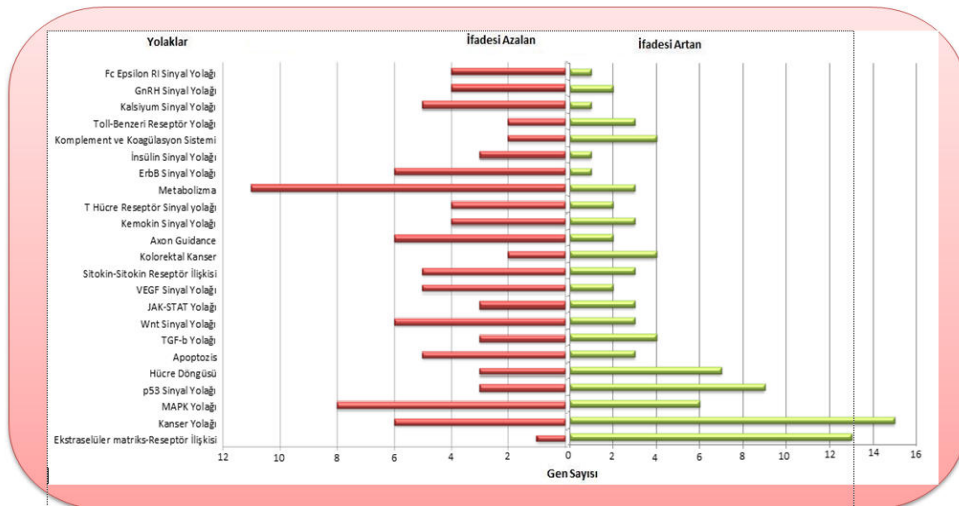


Şekil 5.37. Tümör sağ kolon-normal sağ kolon genlerin kromozomlardaki dağılımı

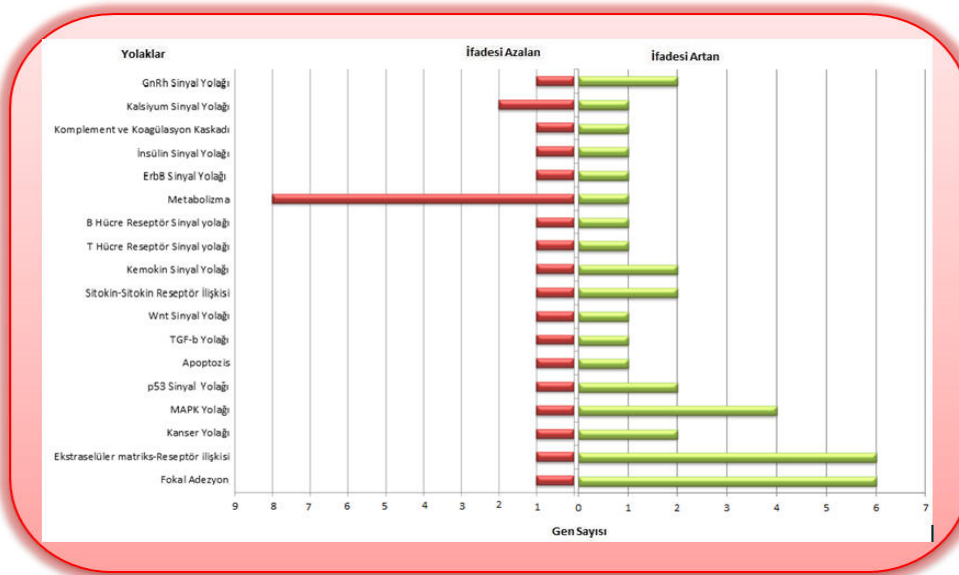
DAVID yazılımı ile gerçekleştirilen analizlerde oluşan fonksiyonel anotasyon kümelerine baktığımızda ön plana çıkan terimler ( $\geq 10$  gen) Tümör sol kolon-normal sol kolon karşılaştırmasında fosforilasyonun düzenlenmesi, apoptozisin düzenlenmesi, hücre göçü, hidroksilizin, glikozaminoglikan bağlanması, protein kinaz aktivitesinin düzenlenmesi, transkripsiyonun düzenlenmesi nükleozid bağlanması başlıkları genlerin en çok yoğunlaştığı küme terimleri olarak dikkat çekerken Tümör sağ kolon-normal sağ kolon karşılaştırmasında ise apoptozisin regülasyonu, transkripsiyonun regülasyonu ve metal iyon bağlanması terimleri ön plana çıkmaktadır.



Tümör sol, sağ kolon ve eşli normalleri ile gerçekleştirilen karşılaştırmalarda DAVID analizleri sonrasında oluşan gen listesinde görülen yollar değerlendirilmiş olup 2 karşılaştırmada yolların ve yollardaki genlerin dağılımı şekil 5.38. ve 5.39.’de sunulmuştur. Grafikler de görüldüğü iki karşılaştırmada da benzer yollar görülmekte olup genel anlamda sinyal yollarının varlığı dikkat çekmektedir. Sağ kolonda en ön plana çıkan yolak metabolizmadır ve bu yoldaki genlerin %90’ının ifadesinde azalma görülmüştür. Bunu fokal adezyon ve ekstraselüler matriks reseptör ilişkisi takip etmiştir. Sol kolon da ise ön plana çıkan yollar hücre döngüsü, kanser yolağı, MAPK sinyal yolağı p53 ve Wnt sinyal yolağıdır.



Şekil 5.38. Tümör sol kolon-normal sol kolon karşılaştırmasında “DAVID” analizisonrasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen grupları için ortak yollar ve gen sayıları

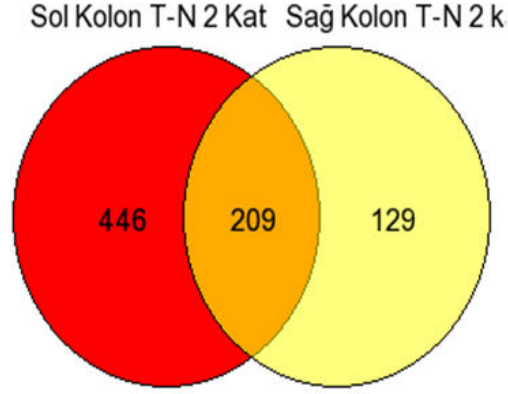


Şekil 5.39. Tümör sağ kolon-normal sağ kolon karşılaştırmasında “DAVID” analizi sonrasında ifadesinde artış ve azalış görülen gen grupları için ortak yollar ve gen sayıları

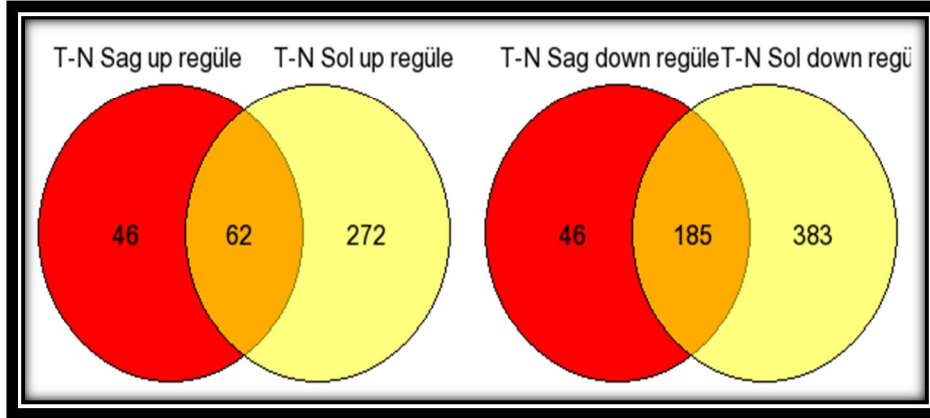
**Çizelge 5.24. Sol kolon ve sağ kolon yerleşimli tümör örnekleri ile eşli normal örneklerin karşılaştırmalarına ait gen ontoloji, zenginleşme, yolak ve önemli genleri içeren özet çizelge**

	<b>Tümör Sol Kolon-Normal Sol Kolon <u>up-regüle</u> genler</b>	<b>Tümör Sol Kolon-Normal Sol Kolon <u>down-regüle</u> genler</b>	<b>Tümör Sağ Kolon-Normal Sağ Kolon <u>up-regüle</u> genler</b>	<b>Tümör Sağ Kolon-Normal Sağ Kolon <u>down-regüle</u> genler</b>
<b>Gen Sayısı</b>	333	567	107	230
<b>İfadesinde En çok değişim göslenen 10 gen</b>	COL10A1,SPP1,FAP,INHBA,MMP11, COL12A1,THBS2,CLDN1, FNDC1,CDKN2A	CLCA4,CA1,CLDN8,CA2,CLCA1,ABCC13,SCNN1B,PKIB,SST,SLC26A3	SPP1, FAP, INHBA, COL12A1,IL-8,GRIN2D,TIMP1,CLDN1,THY1,COL1A1	ZG16,SLC26A3,CLCA4,SCNN13,PKIB,PCK1,SLC26A2,IGH
<b>Gen sayısı <math>\geq 5</math> / ES <math>\geq 1.3</math> olan Fonksiyonel Anotasyon Küme Sayısı</b>	31/18	27/12	11/5	9/2
<b>Gen Sayısı Açısından Öne Çıkan Anotasyon Küme Terimleri (<math>\geq 10</math>)</b>	Hidroksilizin, GAG,EGF-like, fosforilasyonun regülasyonu, apoptozisin regülasyonu, protein kinaz aktivitesini regülasyonu, gen ekspresyonunun regülasyonu	Fosforilasyonun regülasyonu, protein kinaz aktivitesini regülasyonu, hücre göçü, apoptozisin regülasyonu, hücre iyon hemeostazi, gen ekspresyonun regülasyonu, hücre biyosentez	Apoptozisin regülasyonu, transkripsiyon, metal iyon bağlanması	Transkripsiyonun düzenlenmesi
<b>Genlerin Yoğunlaştığı Kromozomlar (<math>\geq 10</math>)</b>	2,6,4	1,7,15,16	7,9 ( $\geq 5$ )	1,6,14 ( $\geq 5$ )
<b><math>\geq 3</math> gen İçeren Yolak Sayısı</b>	20	23	4	4
<b>Gen Sayısı Açısından Öne Çıkan Yolaklar</b>	Fokal adezyon, ekstraselüler matriks-reseptör ilişkisi, kanser yolağı, p53 sinyal yolağı, hücre döngüsü	MAPK sinyal yolağı, kanser yolağı, wnt sinyal yolağı, metabolizma, ErbB sinyal yolağı, axon guidance	Fokal adezyon, ekstraselüler matriks reseptör ilişkisi, MAPK sinyal yolağı, Toll-like benzeri reseptör yolağı	Metabolizma, PPAR sinyal yolağı, sitrat döngüsü, aldesteron düzenleyicili sodyum yeniden emilimi
<b>Belirlenen 5 Kriterden En Az 3'ünü Sağlayan Gen Sayısı</b>	35	27	10	10
<b>Tüm Kriterleri Sağlayan Gen Sayısı</b>	18	10	6	2
<b>Tüm Kriterleri Sağlayan Genler</b>	FN1, THBS2, VEGFA, CCND1, MET, GNA12, CDK4, BMP4, BCL2L1, CDKN2A, LEF1, RUNX1, CDC25B, GADD45B, PRKDC, PLAU, EDNRA, INHBA	PRKACB, FGFR2, THBS1, BMP2, IL-6R, PKIB, PRKAG2, PLAT, CDKN1A, SFN	ELK1, RUNX1, INHBA, IL8, LYN, RIPK2	CAT, BCL10

Tüm paired karşılaştırmalar için ortak genler ve karşılaştırmalara özel genleri görebilmek için ifadesi artan ve azalan gen listeri ile “GeneVenn” internet tabanlı uygulama aracılığı ile ayrı ayrı ven şemaları çizdirilmiştir (şekil 5.40. ve 5.41.).



Şekil 5.40. Tümör –normal sol kolon ve tümör-normal sağ kolon karşılaştırmalarında farklı ifade edilen genlere ait ven diyagramı

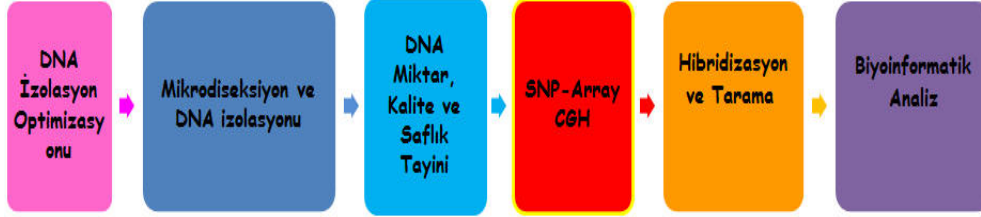


Şekil 5.41. Tümör –normal sol kolon ve tümör-normal sağ kolon karşılaştırmalarında ifadesinde artma /azalma gözlenen genlere ait ven diyagramı

Bu iki diyagramdan hem ifadesinde artış hem de azalma görülen gruplar için karşılaştırmalara özel genler çıkarılmıştır.

## 5.4.2.Genom ebadında kopya sayısı değişikliği analiz bulguları

Global kopya sayısı değişikliği analizinde takip edilen genel çalışma şeması şekil 5.42.'de sunulmuştur.

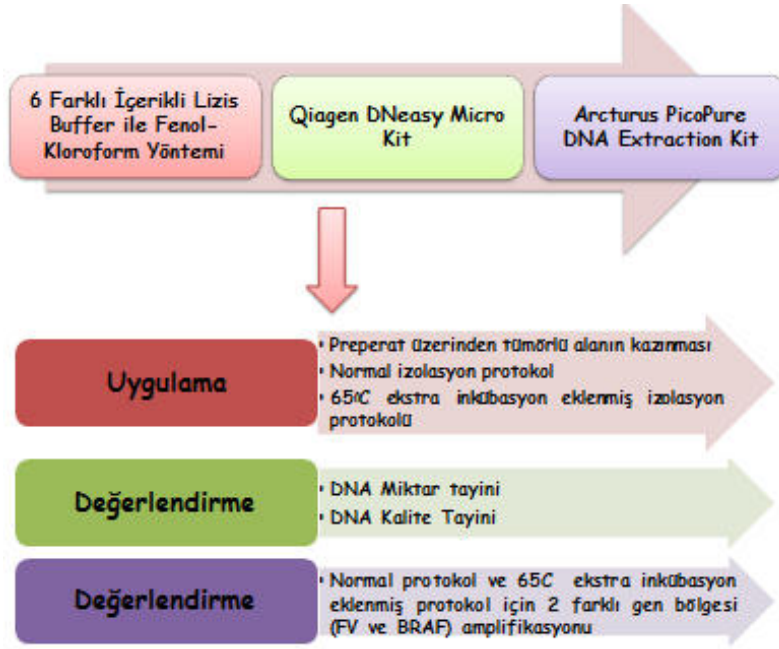


şekil 5. 42. Genom ebadında kopya sayısı değişiklik analizi çalışmaları akış şeması

### 5.4.2.1. DNA izolasyonu optimizasyon uygulamaları

Tümörler için en geniş DNA kaynağını FFPE arşiv materyalleri oluşturmakla birlikte degradasyon arşiv materyalleri ile ilgili en önemli problem olarak karşımıza çıkmaktadır. şimdiye kadar mikrodizin analizlerinin çoğu taze kan ve doku örneklerinin kullanımı ile sınırlı kalmıştır. Arşiv materyallerinin mikrodizin çalışmalarında kullanımına yönelik çalışmalar ise çok yenidir. Mikrodizin analizlerin performansını ve hassasiyetini etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesinin çalışılacak biyolojik materyalin bütünlüğü olduğu düşünöldüğünde çalışmada esas örneklerin çalışılmasından önce kaliteli DNA örnekleri elde edilmesini sağlayacak izolasyon protokolünün seçilmesinde optimizasyon çalışmalarının yapılması, tez çalışmasının belirtilen hedeflere ulaşmasında ve çalışma boyunca materyal kaynaklı aksaklıkların önüne geçilmesinde önemli katkılar sağlamıştır. Ayrıca mikrodizin analizlerinin bütçede en büyük paya sahip olduğu düşünöldüğünde yapılan optimizasyon çalışmalarının, materyal kaynaklı sorunların mikrodizin çalışmalarının deneysel tekrarını gerektirdiği durumlar gibi olumsuzlukları da azaltacağı öngörölmüştür. Bu öngörüler ve çıkarımlar doğrultusunda değişik lizis solusyonları ve ticari kitlerin denenmesi yanında bazı modifikasyonların uygulanması ile DNA izolasyon optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (şekil 5.43.). Gerçekleştirilen optimizasyon uygulamaları aşağıda sunulmuştur.

- 1) Çalışma 11 FFPE örnek ile gerçekleştirilmiştir. Değişik kaynaklardan elde edilen 6 farklı içerikli lizis solüsyonlarının kullanıldığı fenol-kloroform yöntemi ve 2 farklı ticari kitin (*Qiagen QIAmp micro kit*, *Arcturus PicoPure DNA extraction kit*) kullanımının elde edilecek DNA materyalinin miktar ve kalitesi üzerinde etkisinin araştırılması
- 2) Arşiv materyallerinde formalin ile fiksasyonun proteinler ve nükleik asitler arasında oluşturduğu çapraz bağlar nedeni ile PZR, reverse transkripsiyon gibi reaksiyonlar önemli derecede olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu çapraz bağların geri çevrilmesi için 1. madde de bahsi geçen uygulamaların yanısıra kromatin immünopresipitasyon yönteminde formalin uygulaması ile oluşturulan çapraz bağın geri çevrilmesi basamağında kullanılan ısı uygulamasının izolasyon protokollerine eklenmesi ve elde edilecek DNA materyalinin miktar ve kalitesi üzerinde etkisinin araştırılması
- 3) Elde edilen DNA örneklerinin temizlik ve miktar tayinlerinin nanodrop aracılığı ile spektrofotometrik olarak belirlenmesi ve izole edilen DNA örneklerinin %1'lik agaroz jel kullanılarak bütünlük analizinin yapılması
- 4) 6 farklı içerikli lizis solüsyonlarının kullanılacağı fenol-kloroform yöntemi ve ticari kitlerin normal protokolleri ile birlikte yapılan modifikasyonların PZR reaksiyonu üzerindeki etkisinin 2 farklı gen bölgesinin (BRAF ve FV) amplifikasyonunu ile değerlendirilmesi
- 5) İzolasyon protokolüne eklenen modifikasyonunun çapraz bağların kırılması üzerine etkisini değerlendirmek için normal protokoller ve modifiye protokoller ile elde edilen DNA'lar ile kurulan 2 farklı genin amplifikasyonunun gerçekleştirildiği PZR ürünlerinin %2'lik jelde yürütülüp değerlendirilmeye alınması



Şekil 5.43. DNA izolasyon optimizasyon uygulamaları

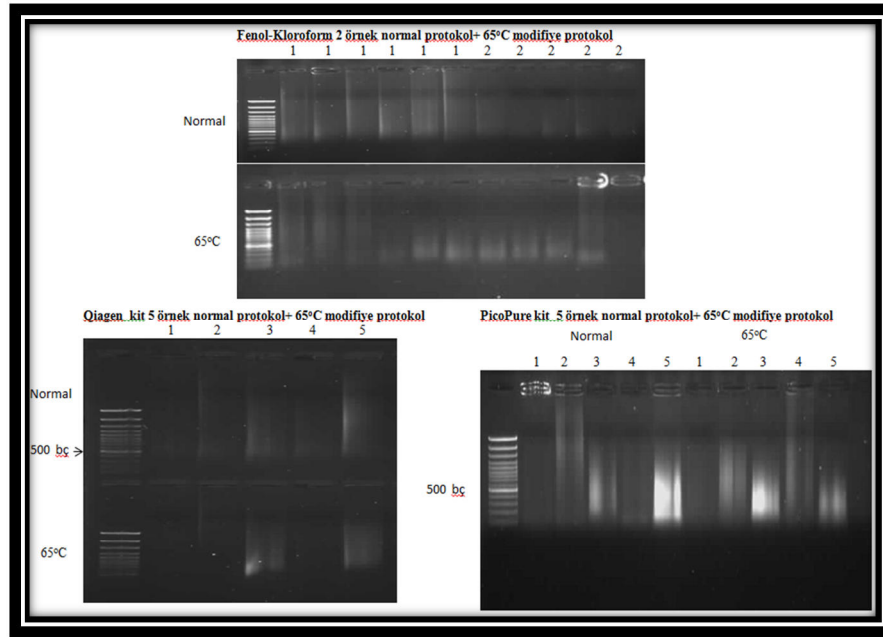
Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarına ait tüm sonuçlar tezin kapsamı gereği sunulmamıştır. Tez kapsamında optimizasyon uygulamalarının bütün içeriğini temsil edecek özet sonuçlar sunulmuştur.

Çizelge 5.25. Bir örnek için tüm metodlarla ve modifikasyonlu/suz izole edilen DNA'lara ait temsili spektrofotometrik ölçümler

Fenol-Kloroform Normal Protokol				Fenol-Kloroform 65°C			
Sample ID	ng/ul	260/280	260/230	Sample ID	ng/ul	260/280	260/230
167 normal-1	104,96	1,57	1,59	167-1 65 C	126,73	1,68	1,75
167 normal-2	42,25	1,65	1,91	167-2 65 C	87,37	1,71	1,69
167 normal-3	55,18	1,72	1,31	167-3 65 C	119,64	1,74	1,9
167 normal-4	59,78	1,62	0,6	167-4 65 C	58,09	1,78	1,64
167 normal-5	38,23	1,74	1,9	167-5 65 C	60,52	1,77	1,75
167 normal-6	30,35	1,68	0,63	167-6 65 C	101,53	1,73	1,86
Qiagen Kit Normal+65°C				PicoPure Kit Normal+65°C			
Sample ID	ng/ul	260/280	260/230	Sample ID	ng/ul	260/280	260/230
167 Qiagen Normal Protokol	81,32	1,92	1,23	167 PicoPure Normal Protokol	875,18	1,38	0,47
167 Qiagen 65 C	76,05	2	1,56	167 PicoPure 65 C	592,93	1,34	0,74

Çalışılan tüm örnekler için spektrofotometrik ölçümler değerlendirildiğinde 65°C modifikasyonun Qiagen marka kit hariç izole edilen miktar için olumlu etkileri olduğu söylenebilir. Bu metodlar içinde ise en tutarlı sonuçlar fenol-kloroform yöntemi ile elde edilmiştir. Miktar açısından Picopure izolasyon kiti daha iyi görünse de saflık ölçümleri bu kitin önemini düşürmüştür.

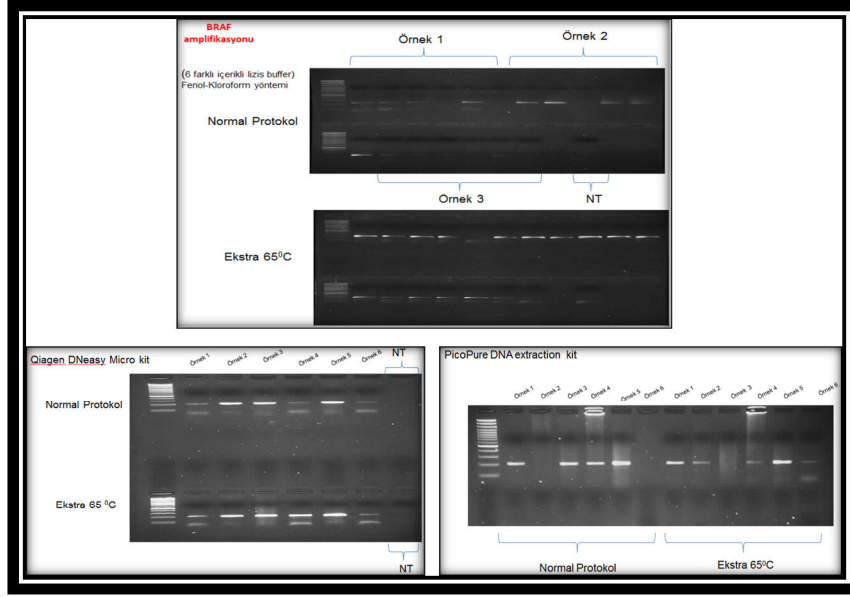
Her bir yöntem için izole edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.



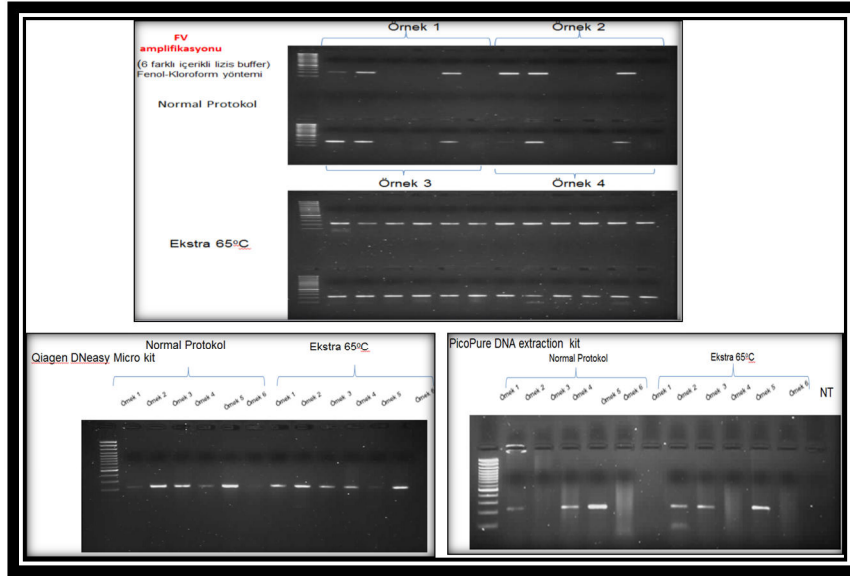
Şekil 5. 44. Tüm metodlar için izole edilen DNA'lara ait agaroz jel elektroforez temsili görüntüsü

Daha önce de ifade edildiği üzere arşiv materyallerinde formalin ile fiksasyonun proteinler ve nükleik asitler arasında oluşturduğu çapraz bağlar nedeni ile PZR, reverse transkripsiyon gibi reaksiyonlar önemli derecede olumsuz yönde etkilenmektedir. Tez çalışmasında kopya sayısı değişikliği çalışmalarının ana basamağı olan mikrodizin uygulamasının PZR, restriksiyon enzim kesimi gibi pek çok enzimsel reaksiyonu içerdiği düşünüldüğünde gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları mikrodizin basamağı ve çalışmanın etkinliği açısından büyük önem arz etmektedir. Bu noktada çeşitli izolasyon yöntemleri ile elde edilen DNA'lar ve gerçekleştirilen optimizasyonların etkinliği 2 farklı gen bölgesinin (BRAF ve FV) amplifiye edildiği PZR reaksiyonu ile test edilmiştir. PZR reaksiyonlarına ait sonuçlar %2'lik agaroz jel görüntüleri eşliğinde sunulmuştur.





Şekil 5.45. Tüm metodlarla izole edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen BRAF geni amplifikasyonu (PZR) agaroz jel görüntüsü



Şekil 5.46. Tüm metodlarla izole edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen FV geni amplifikasyonu (PZR) agaroz jel görüntüsü

PZR görüntülerinde özellikle de fenol-kloroform yöntemi ile izole edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen PZR reaksiyonlarında 65°C ısı modifikasyonunun eklendiği protokolle izole edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen PZR verimlerinin daha iyi oldukları görülmektedir. Bu noktadan sonra daha tutarlı sonuçların alındığı 65°C ısı modifikasyonu eklenmiş fenol-kloroform yöntemi ile izolasyonların gerçekleştirilmesine karar verilmiş olup tez örneklerinin izolasyonları



tamamlanmıştır. Bir teknik makale olarak değerlendirilmesi planlanarak ilgili optimizasyon denemeleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar için ilgili makale yazım aşamasındadır. Ayrıca bu çalışmalar 26-30 Ekim 2011 tarihleri arasında düzenlenen 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

Proje kapsamında çalışılan 50+3 hastanın tümör ve normal hücrelerinin ayrıştırılması proje ekibimizdeki tecrübeli patologlar ile mikroskop altında manuel mikrodiseksiyon ile gerçekleştirilmiş ve akabinde tüm örneklerin DNA izolasyonları tamamlanmıştır. İzole edilen tüm DNA örneklerinin nanodrop aracılığı ile temizlik ve miktar tayinleri yapılmış olup %1' lik agaroz jel elektroforezinde de yürütülerek bütünlük analizleri gerçekleştirilmiştir.

#### 5.4.2.2.DNA izolasyonu, miktar, saflık tayini

Nanodrop sonuçlarına göre DNA konsantrasyonları karşılaştırıldığında, tüm örneklerin DNA konsantrasyonlarının mikrodizin çalışmaları için gerekli olan 500 ng değerini rahatlıkla karşıladığı gözlenmiştir. DNA saflığı ve temizliği açısından değerlendirildiğinde örneklerin 260/280 ve 260/230 oranlarının ise istenen aralıklarda ve bazı örneklerde de istenen aralıklara çok yakın olduğu görülmektedir (çizelge 5.27). Sonuç olarak tüm örnekler için DNA'nın aCGH analizine uygun yeterli kalite ve miktarda olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 5.26. İzole edilen DNA'lara ait miktar ve saflık değer aralıkları

	260/280	260/230	Miktar (ng/ul)
Tümör Örnekleri(n=53)	1.62 - 1.9	1.65 - 2.08	87.78 - 778.63
Kontrol örnekleri (n=53)	1.6 - 1.85	1.61 - 2.04	75.8 - 449.44

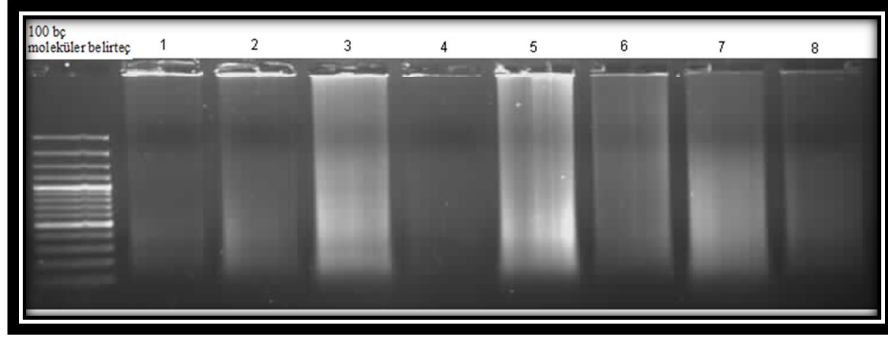
İzole edilen örneklerin miktar ve kalite değerlerine ait temsili bir tablo :

**Çizelge 5.27. İzole edilen DNA'lara ait temsili spektrofotometre sonuçları**

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
10/35 TUMOR DNA	123,06	2,461	1,448	1,7	1,61
10/35 KONTROL DNA	163,02	3,26	1,834	1,78	1,77
12/08 TUMOR DNA	162,07	3,241	1,741	1,86	1,89
12/08 TUMOR DNA	169,91	3,398	1,83	1,86	1,91
12/08 KONTROL DNA	172,71	3,454	1,854	1,86	1,89
12/08 KONTROL DNA	449,44	8,989	4,987	1,8	1,74
12/09 TUMOR DNA	301,95	6,039	3,478	1,74	1,99
12/09 KONTROL DNA	465,81	9,316	5,296	1,76	1,93
12/11 TUMOR DNA	495,14	9,903	5,304	1,87	2,08
12/11 KONTROL DNA	149,81	2,996	1,728	1,73	1,93
12/14 TUMOR DNA	512,61	10,252	5,504	1,86	2,04
12/14 KONTROL DNA	253,91	5,078	2,806	1,81	2,06
12/16 TUMOR DNA	221,99	4,44	2,463	1,8	2,02
12/16 KONTROL DNA	286,37	5,727	3,275	1,75	2,03
12/17 TUMOR DNA	611,98	12,24	6,773	1,81	1,98
12/17 KONTROL DNA	296,51	5,93	3,273	1,81	1,98
08/40 TUMOR DNA	236,74	4,735	2,75	1,72	1,92
08/40 KONTROL DNA	121,74	2,435	1,484	1,64	1,69
08/74 TUMOR DNA	87,78	1,756	1,061	1,65	1,87
08/74 KONTROL DNA	231,84	4,637	2,657	1,74	2,01

#### 5.4.2.3. DNA Bütünlük Tayini (% 1'lik Agaroz jel Görüntüleri)

İzole edilen DNA örneklerinin bütünlük analizleri, %1'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi sonucunda genomik DNA'nın intakt olduğunu anlayabilmek için jelde tek bant izlenmesi gerekmektedir. Ancak formalinde fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan elde edilen DNA'lar degrade olduğundan tek bant izlemek mümkün olamamaktadır. Bu nedenle parafin dokulardan yapılan izolasyonlarda degradasyonun derecesinin belirlenmesi amacıyla tüm olgulardan izole edilen DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve 100 bp'lik moleküler belirteç kullanılarak degrade DNA'nın hangi aralıkta DNA fragmanları içerdiği belirlenmiştir. Tez çalışmasında izole edilen DNA'lar için tipik FFPE örnek profili gözlenmiştir. Bu şekilde değerlendirilen izole edilmiş DNA'lara ait temsili agaroz jel görüntüsü Şekil 5.47 'de sunulmuştur.

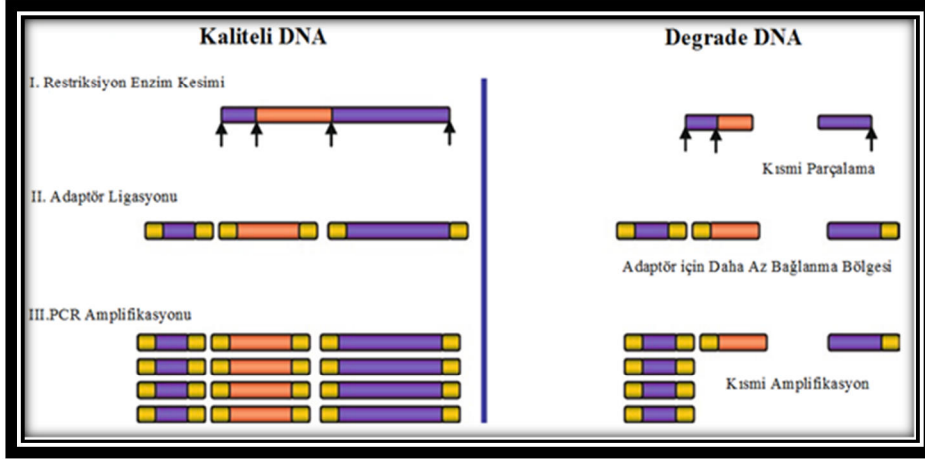


Şekil 5.47. İzole edilen DNA örneklerine ait temsili agaroz jel fotoğrafı

#### 5.4.2.4. Genom ebadında kopya sayısı değişikliği analiz bulguları

Gerçekleştirilen DNA izolasyonlarının ardından kopya sayısı değişikliği analizi için mikrodizin uygulamalarına geçilmiştir. Öncelikle bir örnek için aCGH çalışması yapılmış ve mikrodizin çalışmasının tüm aşamaları bu örnek ile denenmiştir. Bu deneme sonucunda PZR aşamasında protokolden (bir örnek için 7 PZR) farklı olarak **bir örnek için 15 PZR reaksiyonu** yapılmıştır. PZR purifikasyon ve fragmentasyon aşamalarında FFPE örneklerindeki degradasyon durumu dikkate alınarak Tueffered ve arkadaşlarının önerdiği şekilde değişiklik yapılmıştır (124). Diğer örneklerde bu değişiklikler göz önüne alınarak çalışılmıştır. Tez çalışması kapsamında **çalışılması planlanan 100 örnek (50 tümör + 50 kontrol) içerisinde pek çok tekrar yapılmasına rağmen mikrodizin fragmentasyon basamağı için gerekli miktara ulaşamayan 4 örnek dışında kalan tüm örneklerin (96 Örnek=48 tümör+48 kontrol) aCGH tüm mikrodizin deneyleri tamamlanmıştır.**

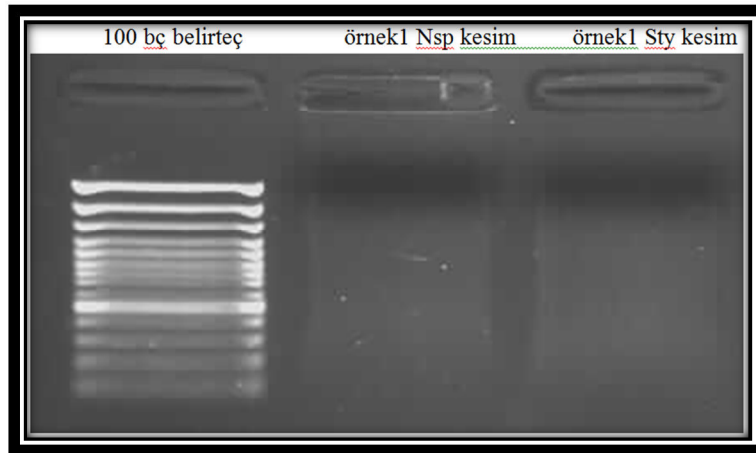
Çalışma kapsamındaki pek çok örnek için kitin protokolünde belirtilenden daha fazla PZR reaksiyonu kurulmuştur. İlgili 4 örnek için de belirtilenden çok daha fazla amplifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmesine rağmen fragmentasyon adımı için gerekli olan rakamlara ulaşamamıştır. Bu nedenle bu 4 örnek çalışmadan çıkarılmıştır. Materyal tipinden kaynaklı olduğu düşünülen bu durum enzimsel reaksiyonlarda örnekler arasında verimlilik farkı yaratabilmektedir. Şekil 5.46'da gösterildiği gibi bu 4 örnekte restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri degradasyona uğramış ve bir sonraki adım olan ligasyon reaksiyonunda beklenen oranda adaptör bağlanması gerçekleşmemiş olabilir; dolayısıyla PZR basamağının adaptör takılı DNA fragmentlerinin amplifikasyon aşaması olduğu düşünüldüğünde amplifikasyonda beklenen verimin altında kalması muhtemeldir.



Şekil 5.48. Kesim, ligasyon ve PZR reaksiyonlarının kaliteli DNA ve degrade DNA arasındaki farkları

#### 5.4.2.4.1. SNP 6.0 restriksiyon enzim kesimi, PZR, PZR pürifikasyon, hibridizasyon ve tarama bulguları

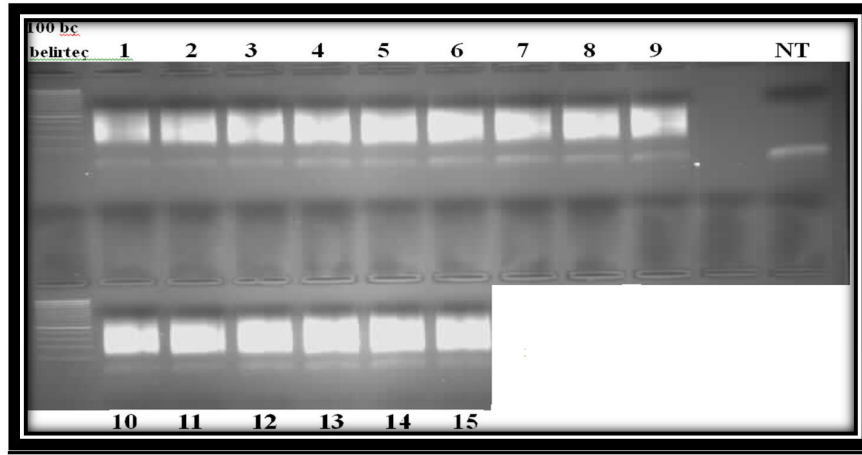
100 örnek (50 Tümör + 50 Kontrol) için SNP 6.0 Nsp ve Sty restriksiyon enzim kesim reaksiyonları tamamlanmıştır. Bu reaksiyonlar protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kesilen tüm örnekler için jel görüntüsü benzerdir. Kesim reaksiyonu tamamlanmış DNA'lara ait temsili agaroz jel görüntüsü Şekil 5.49 'da sunulmuştur.



Şekil 5.49. SNP 6.0 Nsp ve Sty Restriksiyon enzim kesim reaksiyonuna ait temsili agaroz jel fotoğrafı

100 örnek (50 Tümör + 50 Kontrol) için 500 ng genomik DNA NspI ve StyI restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra 4 baz çiftlik “overhang”leri tanıyan adaptörlerin (Nsp adaptör/Sty adaptör) bağlanma reaksiyonları da tamamlanmıştır.

100 adet örnek (50 tümör + 50 kontrol) için PZR ve PZR pürifikasyon aşaması tamamlanmıştır. PZR aşamasında her bir örnek için 15 adet PZR reaksiyonu kurulmuştur. PZR reaksiyonun ardından gerçekleştirilen pürifikasyon adımı sonucunda bir sonraki aşama olan fragmentasyon için gerekli en küçük rakam olan 202,5 µg değerine ulaşılmıştır. PZR agaroz jel görüntüsü ve pürifiye edilen örneklere ait miktar ve kalite değerlerini içeren spektrofotometrik ölçüm sonucu aşağıdaki gibidir.

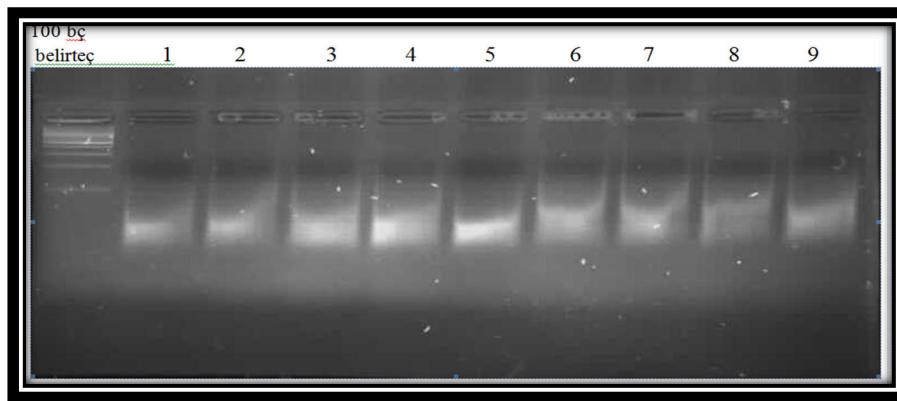


**Şekil 5.50. SNP 6.0 PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü (ilk 8 görüntü Nsp kesimi ile elde edilen fargmentlerin amplifikasyonunu içerirken son 7 görüntü Sty kesimi ile elde edilen fragmentlerin amplifikasyon görüntüsüdür)**

**Çizelge 5.18. PZR pürifikasyon aşaması temsili miktar ve kalite sonuçları**

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
10/145 TUMOR PCR PURF	1510,37	30,207	15,663	1,93	2,17
10/145 KONTROL PCR PURF	962,45	19,249	9,891	1,95	2,11
10/130 TUMOR PCR PURF	993,48	19,87	10,222	1,94	2,12
10/130 KONTROL PCR PURF	847,05	16,941	8,636	1,96	2,13
08/166 TUMOR PCR PURF	700,61	14,012	7,151	1,96	2,12
08/166 KONTROL PCR PURF	557,46	11,149	5,857	1,9	2,07
08/98 TUMOR PCR PURF	1018,62	20,372	10,418	1,96	2,12
08/98 KONTROL PCR PURF	975,91	19,518	9,993	1,95	2,12
08/86 TUMOR PCR PURF	964,85	19,297	9,895	1,95	2,12
08/86 KONTROL PCR PURF	1020,78	20,416	10,46	1,95	2,14

PZR pürifikasyon adımını ardından fragmentasyon aşaması gelmektedir. Pürifiye PZR ürünleri, fragmentasyon reaktifi kullanılarak fragmente edilir. Hibridizasyon adımı için gerekli 200 ug değerine ulaşan **96 örnek fragmente edilmiştir**. Bu fragmente edilen örnekler %4 lük agaroz jelde yürütülerek fragmentasyon durumu kontrol edildiğinde fragment ürünlerin olması gerektiği gibi  $\leq 200$  bç olduğu görülmüştür. Fragmente edilmiş örneklere ait %4'lük agaroz jel görüntüsü aşağıdaki gibidir.



**Şekil 5.51. Fragmente edilen örneklere ait temsili %4'lük agaroz jel görüntüsü**

Bu adımın ardından fragmente örnek işaretlenir. İşaretlenen 96 örnek *Array*'e hybridize edildikten sonra taranmıştır. SNP 6.0 arraylerde kullanılan genotiplendirme algoritması

“Birdseed V2” dir. Çalışılan 96 örnek için elde edilen call rate temsili oranları çizelge 5.29.’da sunulmuştur.

**Çizelge 5.29. Çalışılan örnekler için genotiplendirilebilen SNP sayısını gösteren call rate oranlarının temsili gösterimi**

No	Örnek Adı	Cinsiyet	Call_rate (%)	Contrast QC
1	10-145 KONTROL	Erkek	74.87	-0.06
2	08-86 KONTROL	Kadın	76.39	0.00
3	08-86 TUMOR	Kadın	77.05	0.00
4	08-98 KONTROL	Kadın	75.43	0.00
5	08-98 TUMOR	Kadın	76.22	-0.02
6	08-166 KONTROL	unknown	74.57	-0.11
7	08-166 TUMOR	Kadın	76.07	0.00
8	10-130 KONTROL	Kadın	75.11	0.00
9	10-130 TUMOR	Kadın	78.56	0.00
10	10-145 TUMOR	Erkek	77.81	-0.11
11	08-65 KONTROL	Erkek	73.83	-0.21
12	08-65 TUMOR	Erkek	73.88	-0.34
13	08-102 KONTROL	Kadın	77.79	-0.05
14	08-102 TUMOR	unknown	75.88	-0.06

FFPE materyallerin degrade doğaları gereği mikrodizin uygulamalarında kullanımları uygun değildir. Bununla birlikte FFPE materyallerinin mikrodizin çalışmalarında kullanılabilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bizim de gerçekleştirdiğimiz çalışma da bunlardan biri olarak literatürde yer alabilecektir. Elde edilen call rate oranları ise şimdiye kadar yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında genel anlamda benzerlik taşımaktadır.

#### 5.4.2.4.2.Genom ebadında kopya sayısı değişiklik analizi biyoinformatik bulguları

Genom ebedında kopya sayısı değişiklik analizi başlığı altında eşli tümör-kontrol karşılaştırması için değişiklik görülen bölgelerin tespiti aroma.affymetrix ile gerçekleştirilmiş olup segmentasyon analizleri “DNAcopy” R paketi ile yine aroma.affymetrix paketi kapsamında değerlendirilmiştir. Analiz sırasında 2 örnekten sonuç alınamadığı için veri değerlendirmesi 46 örnek üzerinden yapılmıştır. Yapılan segmentasyon analizinin ardından literatür kapsamında değişiklikler için  $2\pm 0.35$  eşik değeri olarak belirlenmiştir. Bu çerçeve içine giren değişiklikler bu çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Tespit edilen ham kopya sayısı değişiklik verilerinden anlamlı sonuçların tespitinde literatür (226-229) dikkate alınarak izlenen yol aşağıda özetlenmiştir.

##### 5.4.2.4.2.1. Kopya Sayisi Değişikliği Verisi Filtrasyonu

1. Mikrodizin ham verisinden ilgili algoritmalar kullanılarak kopya sayısı değişiklik bölgeleri (KSD) belirlenir.
2. Ortaya çıkan ana değişikliklerde normal'den ayırabilmek ve kopya sayısı değişikliği diyebilmek için bir eşik değeri belirlenir ( $2\pm 0.35$ ,  $2\pm 0.5$  gibi).
3. Bu eşik değeri kapsamında değerlendirilmeye alınan değişiklikler her kromozom için aşağıdaki başlıkları içeren bir tablo şeklindeki veriye dönüştürülür.

Değişiklik Görülen Bölge Aralığı	Sitogenetik Lokasyon	Değişiklik Görülen Bölgedeki Genler	Değişiklik Görülen Bölgenin Uzunluğu	Değişikliğin Frekansı (amp)	Değişikliğin Frekansı (del)

4. Bu belirlenen eşik değeri üzerindeki değişiklikler için aşağıdaki tablo kapsamında değişikliklerin hastalardaki görölme sıklık (frekans) bilgisi çıkarılır.

Parametre	CNV frekansı	Amp. Frekansı	Del. Frekansı
1 bireyde bulunan KSD'ler			
2 bireyde bulunan KSD'ler			
3 bireyde bulunan KSD'ler			
>3 bireyde bulunan KSD'ler			



5. Çalışma kapsamına ve sonuçlara göre en az 3 bireyde ya da > 3 bireyde görülen KSD'lerin boyut dağılımı aşağıdaki tablodaki bilgiler çerçevesinde çıkarılır.

Değişiklik Boyutu(kb)	Kazanç (%)	Kayıp (%)
0-1 kb		
1-10 kb		
10-50 kb		
50-100 kb		
100-500 kb		
500-1000 kb		
>1000 kb		
Toplam		

6.4. ve 5. maddelerdeki bilgiler sonuçlar çerçevesinde değerlendirilerek birleştirilir ve değişiklikler bu birleştirme kapsamında sınırlandırılır.

Örnek: 4. tablodan 3 bireyde bulunan kopya sayısı değişiklikleri ve 5. tablodan >10 kb daki değişiklikler birleştirilip yeni bir veri elde edilir. Yani en az 3 bireyde görülen ve 10 kb ve üstündeki değişiklikler alınır ve değerlendirilir. Bu veri artık çalışma kapsamında değerlendirilecek bilgidir. **Bu tez çalışmasında > 3 bireyde görülen ve 500-100 kb boyutundaki değişiklik verisi değerlendirilmeye alınmıştır.**

7. 3. tabloda her kromozom ve her değişiklik bölgesinde yer alan genler bilgisi mevcuttur. Değişiklik görülen bölgedeki gen bilgisi 6. maddede çıkarılan son veri için amplifikasyon ve delesyon olmak üzere 2 ayrı başlık altında sitogenetik lokasyon bilgisi ile birlikte çıkarılır. İlgili gen listesi çıkarılırken ana listede tekrar eden sitogenetik lokasyonlar ve dolayısıyla tekrar eden genler teke indirilir ve alt alta sıralanmış aşağıda örneği verilen tablodaki başlıkları içeren bir gen listesi elde edilir.

≥3 Kişide Görülen ve ≥ 10 kb Boyutunda Amplifikasyon Değişiklikleri			
Gen Sembolü	Frekansı	Kromozom No	Sitogenetik Lokasyon

≥3 Kişide Görülen ve ≥ 10 kb Boyutunda Delesyon Değişiklikleri			
Gen Sembolü	Frekansı	Kromozom No	Sitogenetik Lokasyon

8. 7. tablodan sonuçlar çerçevesinde en sık amplifikasyon ve delesyon görülen (örneğin %10 veya %20 üstü sıklıkta) kromozom bölgeler çıkarılır. Böylece hastalıkla ilişkili olabilecek en önemli bölgelere kayıp ve kazanç olarak ayrı başlıklar altında rahatlıkla ulaşabiliriz. İstenildiğinde ilgili bölgedeki genler de bu tablodan çıkarılabilir.

9. Son olarak  $\geq 3$  kişide görülen.  $\geq 10$  kb boyutunda amplifikasyon /delesyon değişiklikleri ve %10/%20 frekansa görülen değişiklikleri içeren genler tek bir liste halinde amplifikasyon ve delesyon başlığı altında elde edilir. Daha sonra bu gen listesi ile DAVID yazılımı üzerinden ileri analizler gerçekleştirilir. DAVID de yapılan analizler sonucunda zenginleşen yolaklar ve bu yolaklardaki genler ekspresyon verisinden elde edilen aynı bilgi ile karşılaştırılır.

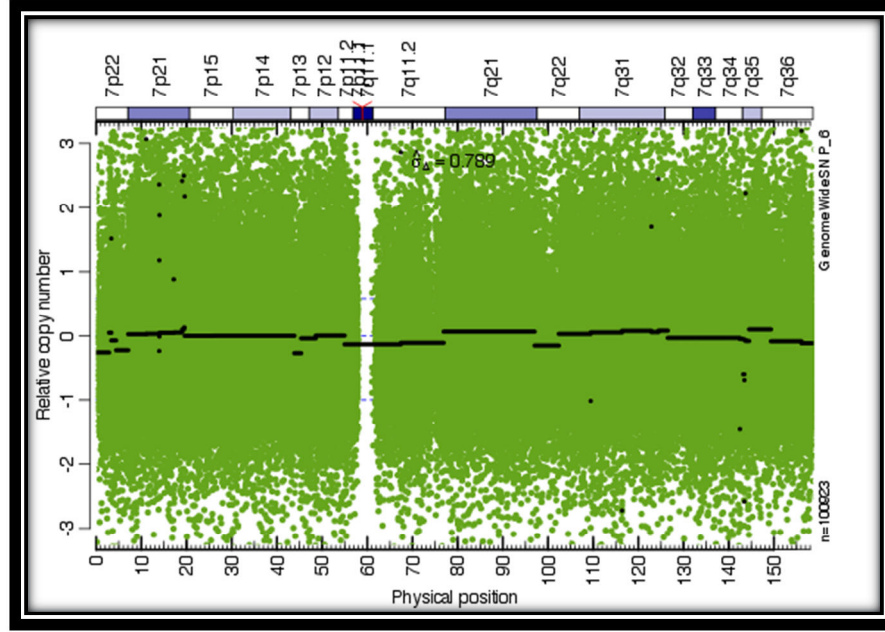
Bu filtrasyon şemasından hareketle tez çalışması kopya sayısı değişiklik veri analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada  $>3$  bireyde görülen ve 500-1000 kb boyutundaki değişiklikler üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır.

23 kromozom boyunca analiz edilen kopya sayısı değişiklikleri sonucunda 20.894 adet segment tespit edilmiştir. Bu segmentlerden en az 3 bireyde bulunan amplifikasyon segment sayısı 4632 iken delesyon segment sayısı 4903 dür. 3 'den büyük bireyde görülen değişikliklerden amplifikasyon segment sayısı 13564 iken delesyon segment sayısı 12335 dir. Bu frekans değerlendirmesinde amplifiye olan ve delesyona uğramış bölgeler açısından bir fark gözlenmemiştir.  $>3$  bireyde görülen toplam 25899 segmenti boyut dağılımı açısından değerlendirdiğimizde en fazla değişiklik segmenti 10-50 kb (%24.7) aralığında görülürken bunu 1-10 kb (%24.2) ve 500-1000 kb (%22.6) aralıkları takip etmektedir. En az değişiklik segmentinin görüldüğü boyut aralığı ise  $>1000$ kb (%1.6) olarak tespit edilmiştir. Amplifiye olan ve delesyona uğramış bölgeleri boyut aralığı açısından değerlendirdiğimizde ise aralarında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu verilerin ardından kopya sayısı değişiklik analizi ortaya çıkan rakamlar çerçevesinde  $>3$  birey ve 500-1000 kb arasındaki değişiklikler üzerinden analizlere devam edilmiştir. Bu değişiklikleri içeren segmentlerin gen içeriklerine baktığımızda amplifikasyon görülen bölgelerdeki gen sayısı 8120 iken delesyon görülen bölgedeki gen sayısı 7035 dir. Bu genlerin kromozomlardaki dağılımında hem amplifiye hem de delesyon bölgeleri genleri

en fazla 1 ve 17. kromozomlarda bulunmaktadır. Biraz daha ilerlediğimizde amplifikasyon ve delesyon bölgelerini ortak değerlendirebildiğimiz en sık (%20) sitogenetik lokasyonlar amplifikasyon:5q15.33, 7p22.3, 8q24.3, 11q13.1, 11q13.3, 9q34.3, 20q13.12, 20q13.13 ve 20q113.33. Delesyon: 6p22.1 ve 17q25.1 dir. Bu verilere ait çizelge ve grafikler aşağıda sunulmuştur.

**Çizelge 5.30. Tümör kontrol karşılaştırması kopya sayısı değişiklikleri temsili sonuç tablosu (1. Kromozom)**

START	STOP	DISTANCE	% NORMAL	% GAIN	% LOSS	BAND	GENES
61736	62152	417	68,08510638	19,14893617	12,76595745	p36.33	
804457	850687	46231	65,95744681	17,0212766	17,0212766	p36.33	FAM41C TUBB8P11 AL645608.2 RP11-5407.1 RP11-5407.2
850688	1039097	188410	65,95744681	17,0212766	17,0212766	p36.33	RP11-5407.3 SAMD11 AL645608.1 NOC2L KLHL17 PLEKHN1 C1orf170
1039098	1130081	90984	65,95744681	17,0212766	17,0212766	p36.33	C1orf159 RP11-465B22.5 MIR200B MIR200A MIR429 TTLL10-AS1 TTLL10
1130082	1213280	83199	65,95744681	17,0212766	17,0212766	p36.33	TTLL10 TNFRSF18 TNFRSF4 SDF4 B3GALT6 FAM13 UBE2J2
1213281	1213297	17	63,82978723	19,14893617	17,0212766	p36.33	RP5-902P8.10
1213298	1217057	3760	65,95744681	19,14893617	14,89361702	p36.33	RP5-902P8.10 SCNN1D
1217058	1650062	433005	65,95744681	19,14893617	14,89361702	p36.33	SCNN1D ACAP3 PUS CDK11B SLC35 MMP23A CDK11A RP1-283E3.8
1650063	1702986	52924	65,95744681	19,14893617	14,89361702	p36.33	CDK11A RP1-283E3.8 RP1-283E3.4 SLC35E2 NADK
1702987	1755167	52181	65,95744681	19,14893617	14,89361702	p36.33	NADK GNB1
1755168	1759096	3929	65,95744681	17,0212766	17,0212766	p36.33	GNB1
6742281	6784010	41730	80,85106383	10,63829787	8,510638298	p36.31	DNAJC11
12179308	12194450	15143	74,46808511	14,89361702	10,63829787	p36.22	TNFRSF8
17011451	17017530	6080	76,59574468	10,63829787	12,76595745	p36.13	EIF1AXP1 ESPNP
22444710	22453323	8614	78,72340426	10,63829787	10,63829787	p36.12	WNT4
22453324	22494626	41303	76,59574468	10,63829787	12,76595745	p36.12	WNT4
41821779	42208515	386737	78,72340426	10,63829787	10,63829787	p34.2	FOXO6 RP11-399E6.4 RNA5SP45 EDN2 HIVEP3 RP11-486B10.3 RP11-486B10.4
84550775	84594398	43624	80,85106383	8,510638298	10,63829787	p31.1	PRKACB RP11-486G15.1
87641902	87798565	156664	87,23404255	4,255319149	8,510638298	p22.3	LMO4
92160886	92161990	1105	87,23404255	2,127659574	10,63829787	p22.1	TGFBR3
92161991	92358530	196540	89,36170213	2,127659574	8,510638298	p22.1	TGFBR3 RN7SL653P
1,79E+08	1,79E+08	1165	82,9787234	8,510638298	8,510638298	q25.2	ABL2
1,87E+08	1,87E+08	74279	85,10638298	6,382978723	8,510638298	q31.1	PLA2G4A



Şekil 5.52. Bir örneğe ait bağıl kopya sayısı değişikliğinin (tümör-kontrol) kromozom 7 için segmente edilmiş veri görüntüsü

Çizelge 5.31. Belirlenen kopya sayısı değişikliklerinin tümör örneklerindeki amplifikasyon ve delesyon frekans bilgileri

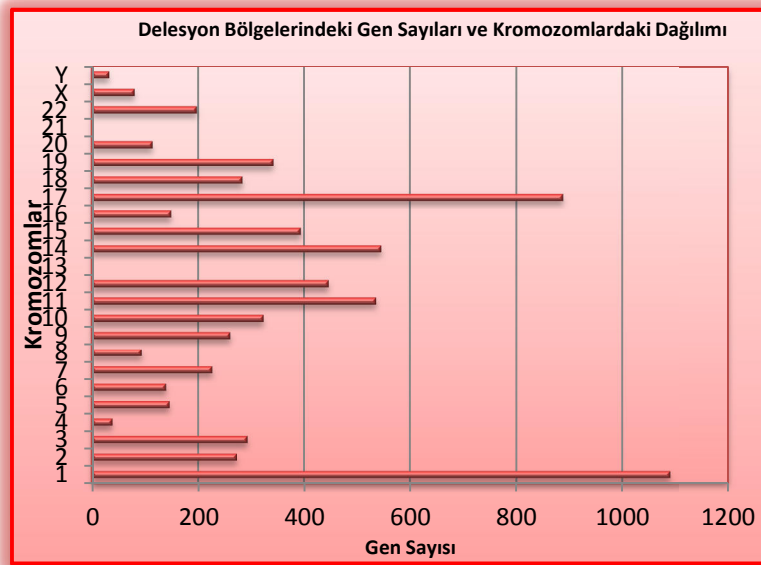
Parametre	Kopya Sayısı Değişikliği Segment Sayısı	Amplifikasyon Segment Sayısı	Delesyon Segment Sayısı
1 bireyde bulunan <u>KSD'ler</u>	920	495	425
2 bireyde bulunan <u>KSD'ler</u>	5425	2194	3231
3 bireyde bulunan <u>KSD'ler</u>	9535	4632	4903
>3 bireyde bulunan <u>KSD'ler</u>	25899	13564	12335

Çizelgede görülen sonuçların ardından >3 bireyde bulunan kopya sayısı değişiklikleri sonuçları ile devam edilmiştir.

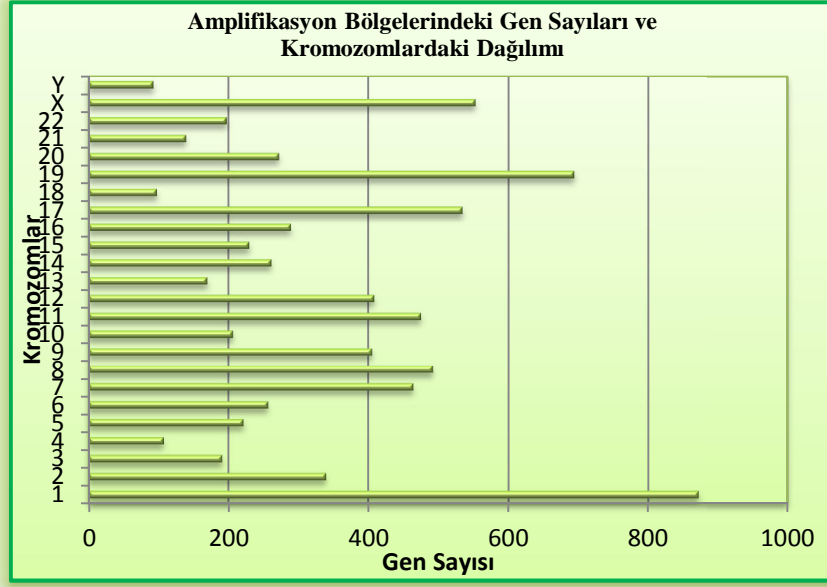
Çizelge 5.32 >3 bireyde bulunan kopya sayısı değişikliklerinin boyut dağılımı

Değişiklik Boyutu(kb)	Kazanç (%)	Kayıp (%)
0-1 kb	1437 (5.5)	1397 (5.4)
1-10 kb	3221 (12.4)	3029 (11.8)
10-50 kb	3313 (12.8)	3094 (11.9)
50-100 kb	1666 (6.4)	1531 (5.9)
100-500 kb	3109 (12)	2740 (10.6)
500-1000 kb	546 (2.1)	405 (1.6)
>1000 kb	272 (1.1)	139 (0.5)
<b>Toplam</b>	<b>13564 (%52.3)</b>	<b>12335 (%47.7)</b>

Kopya sayısı değişikliği veri filtrasyonu başlığı altında gerçekleştirilen değerlendirmelerden de yola çıkarak tez çalışmasında >3 bireyde görülen ve 500-1000kb arasında görülen değişiklikler değerlendirilmiştir.



Şekil 5.53. > 3 kişi ve 500-1000 kb parametreleri kapsamındaki delesyon kopya sayısı değişiklik bölgelerinin içerdiği gen sayılarının kromozomlardaki dağılımı



**Şekil 5.54 .-> 3 kişi ve 500-1000 kb parametreleri kapsamındaki amplifikasyon kopya sayısı değişiklik bölgelerinin içerdiği gen sayılarının kromozomlardaki dağılımı**

Gen sayıları açısından delesyon bölgelerinde 1 ve 17. Kromozomlar dikkat çekmektedir. Bu kromozomları 11, 12 ve 14. kromozomlar takip etmektedir. Amplifikasyon bölgelerinde ise 1, 7, 8, 11, 17, 19 ve X kromozomları gen sayıları bakımından en fazla gen içeren kromozomlardır.

**Çizelge 5.33. Veri filtrasyonu sonucu elde edilen değişikliklerin farklı görülme sıklıklarında amplifikasyon ve delesyon bölgelerindeki gen sayıları**

Tümör Örneklerinde Görülme Sıklığı	Amplifikasyon Bölgelerindeki Gen Sayısı	Delesyon Bölgelerindeki Gen Sayısı
<b>% 8 Sıklıkla Görülen</b>	8120	7035
<b>% 11 Sıklıkla Görülen</b>	4407	3391
<b>% 15 Sıklıkla Görülen</b>	1389	579
<b>% 17 Sıklıkla Görülen</b>	655	291
<b>% 20 Sıklıkla Görülen</b>	331	117
<b>% 22 Sıklıkla Görülen</b>	151	0
<b>% 26 Sıklıkla Görülen</b>	27	0
<b>% 31 Sıklıkla Görülen</b>	27	0

%20 sıklık parametresinden sonra gen içeren delesyon bölgesi bulunmamaktadır. %20 sıklıkla amplifiye olan ve delesyona uğrayan bölgelerdeki genlere ait bilgiler sırasıyla çizelge 5.34 ve 5.35’de sunulmuştur. Bu genlere ait tam listeler Ek-5 ve Ek-6 da verilmiştir.

**Çizelge 5.34. %20 sıklıkla amplifiye olan bölgelerdeki genler (temsili tablo)**

Gen Sembolü	Frekans	Kromozom	Sitogenetik Lokasyon
TRPT1	19.62	11	q13.1
NUDT22	19.62	11	q13.1
RP11-783K16.14	19.62	11	q13.1
DNAJC4	19.62	11	q13.1
VEGFB	19.62	11	q13.1
FKBP2	19.62	11	q13.1
BAD	19.62	11	q13.1
MIR1237	19.62	11	q13.1
NFATC2	19.62	20	q13.13
MIR3194	19.62	20	q13.13
ATP9A	19.62	20	q13.13
TP53RK	21.80	20	q13.12
RP1-28H20.3	21.80	20	q13.12
SLC2A10	21.80	20	q13.12
MIR3196	30.52	20	q13.33
NKAIN4	30.52	20	q13.33
ARFGAP1	30.52	20	q13.33
MIR4326	30.52	20	q13.33
BRD9	19.62	5	p15.33
TRIP13	19.62	5	p15.33
NKD2	19.62	5	p15.33
SLC12A7	19.62	5	p15.33
MIR4635	19.62	5	p15.33
CTD-3080P12.3	19.62	5	p15.33
SLC6A19	19.62	5	p15.33
PDGFA	19.62	7	p22.3
PRKAR1B	19.62	7	p22.3
COX19	19.62	7	p22.3
CYP2W1	19.62	7	p22.3
C7orf50	19.62	7	p22.3
MIR339	19.62	7	p22.3
EIF3B	19.62	7	p22.3
AC004840.9	19.62	7	p22.3
GRIFIN	19.62	7	p22.3
IQCE	19.62	7	p22.3
MAPK15	19.62	8	q24.3



Çizelge 5.35. %20 sıklıkla delesyona uğramış bölgelerdeki genler (temsili tablo)

Gen Sembolü	Frekans	Kromozom	Sitogenetik Lokasyon
KCTD2	19.62	17	q25.1
GRB2	19.62	17	q25.1
MYO15B	19.62	17	q25.1
ITGB4	19.62	17	q25.1
GALK1	19.62	17	q25.1
H3F3B	19.62	17	q25.1
MIR4738	19.62	17	q25.1
CDK3	19.62	17	q25.1
MICD	19.62	6	p22.1
HLA-J	19.62	6	p22.1
PPP1R11	19.62	6	p22.1
HLA-N	19.62	6	p22.1
HCG19P	19.62	6	p22.1
UBQLN1P1	19.62	6	p22.1
MICC	19.62	6	p22.1
TMPOP1	19.62	6	p22.1
SUCLA2P1	19.62	6	p22.1
RANP1	19.62	6	p22.1
HLA-E	19.62	6	p22.1
GNL1	19.62	6	p22.1
PRR3	19.62	6	p22.1
ABCF1	19.62	6	p22.1
MIR877	19.62	6	p22.1
PPP1R10	19.62	6	p22.1
AL662800.1	19.62	6	p22.1
MRPS18B	19.62	6	p22.1
ATAT1	19.62	6	p22.1
PTMAP1	19.62	6	p22.1
C6orf136	19.62	6	p22.1
AL662800.2	19.62	6	p22.1
DHX16	19.62	6	p22.1
PPP1R18	19.62	6	p22.1
NRM	19.62	6	p22.1
RPL7P4	19.62	6	p22.1
MDC1	19.62	6	p22.1
MDC1-AS1	19.62	6	p22.1
TUBB	19.62	6	p22.1

### 5.4.3.Genom ebadında gen ifade profili ve kopya sayısı değışiklikleri verilerinin entegrasyonu

Tez çalışması kapsamında sporadik kolorektal kanser örneklerinde tümör-kontrol karşılaştırması için global gen ifade profilleri ve kopya sayısı değışikliklerinin ayrı ayrı değerlendirilmesinin ardından bu 2 kapsamlı verinin entegrasyonu gerçekleştirilmiştir. Entegrasyon şekil 5.55. kapsamında değerlendirilmiştir.



Şekil 5. 55. Entegre edilen genomik ve transkriptomik veriler

İlk olarak 2 kat değışim gösteren ( $p<0.001$ ) farklı ifade edilen gen listesi herhangi bir filtre uygulanmamış kopya sayısı verisiyle entegre edilmiştir. “PHP scripting” dili kullanılarak yazılan kodlar çerçevesinde bir kromozom bölgesinde hangi kopya sayısı değışikliklerinin hangi genlerin ekspresyon seviyelerini etkilediği tespit edilmiştir. Daha sonra aynı yönde değışiklik (gain-up regulation/loss-down regulation) gösteren gen ifade değışimleri ve kopya sayısı değışiklikleri belirlenmiştir.

**Çizelge 5.19. Gen ifade verisi ve filtrelenmemiş kopya sayısı değişikliği verisi entegrasyonu**

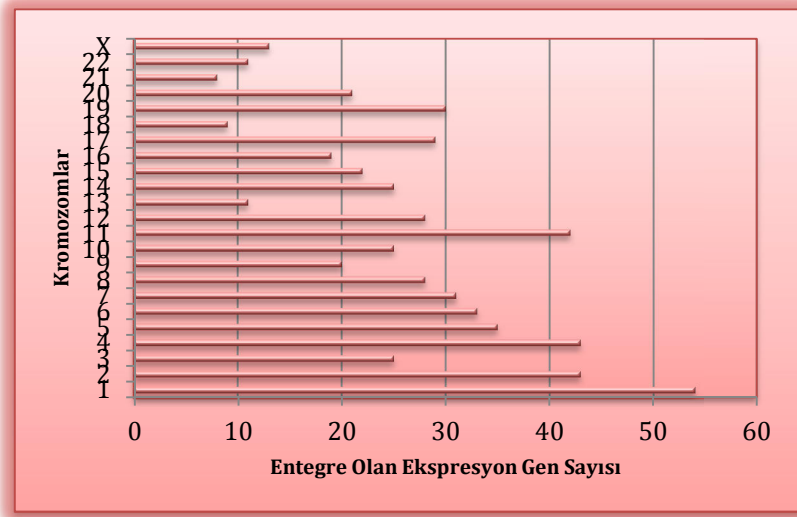
Kromozom	Sitogenetik Lokalizasyon	Entegre Gen Sayısı	Entegre Olan Ekspresyon Verisi Genleri	Kat Değişimi	DEĞİŞİKLİK
1	p12	2	FAM46C/HMGCS2	(-)/4,05/-4,97	KAYIP
1	p13.2	1	ST17L	-2,18	KAYIP
1	p22.3	3	BCL10,CLCA1,CLCA4	(-)/3,42/-10,52/-13,57	KAYIP
1	p31.1	1	PRKACB	-4,39	KAYIP
1	p31.3	1	SLC35D1	-3,68	KAYIP
1	p33	1	TSPAN1	-5,51	KAYIP
1	p34.2	1	GUCA2A	-11,53	KAYIP
1	p35.1	1	TMEM54	-2,46	KAYIP
1	p35.3	1	IFI6	2,31	KAZANÇ
1	p36.12	4	PLA2G2A,HSPG2,TCEA3,FUCA1	(-)/4,13/2,48/-2,62/-3,62	KAYIP/KAZANÇ
1	p36.13	3	NBPFLMFAP2,PADI2	(-)/2,35/8,32/-6,73	KAYIP/KAZANÇ
1	p36.31	1	KCNAB2	2,24	KAZANÇ
1	q21.2	1	MTMR11	-2,36	KAYIP
1	q21.3	6	CTSS,CTSK,SELENBP1,S100A10,IL6R,MUC1	(-)/2,01/4,06/-4,24/-3,61/-2,58/-2,62	KAYIP/KAZANÇ
1	q22	1	IQGAP3	2,40	KAZANÇ

Hazırlanmış olan bu entegrasyon çizelgesi incelendiğinde toplamda 364 bölgede gen ifade verisi ile entegrasyon saptanmış olup yalnızca ifadesi artan genler, yalnızca ifadesi azalan genler ya da ikisinin birlikte yer aldığı bölgelerin bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu 364 bölgede toplam 605 gen bulunmaktadır. Bir başka deyişle gen ifade analizinde 2 kat ( $p < 0,001$ ) artış/azalış ile farklı ifade edilen genlerin %65'inin kopya sayısı değişimlerinden etkilendiği görülmektedir. Bu 364 bölge içinden 173'ünde yer alan genlerin ifadesinde azalma gözlenirken, 107 tanesinde yer alan genlerin ifadesinde artma ve 84 bölgede ise ifadelerinde hem artma hem de azalma görülen genler bulunmaktadır. Ortaya çıkan çizelge incelendiğinde MDM2, STAT1, CDK1, CCND1, CDK4, CDKN3, PIK3CG, PRKACB, ELK1, TGBI, IL-8, IL-6R, KLF4, INHBA, PKIB, LEF1 gibi hücre proliferasyonu, apoptozis, sinyal iletimi gibi önemli olaylarda görevli pek çok önemli genin varlığı dikkat çekmektedir. Bu çizelgede ayrıca 3 ve 3 den fazla gen içeren bölgeleri incelediğimizde 3 gen içeren 27 tane sitogenetik band, 4 gen içeren 9, 5 gen içeren 8, 6 gen içeren 6, 8 ve 9 gen içeren 1'er bölge olduğu görülmektedir. 5, 6 ve daha fazla gen içeren bölgeler pek çok geni birden etkilemesi açısından önemli "genomic hotspot" olmaya aday bölgeler olarak değerlendirilebilir (Çizelge 5.37.). Kromozomları içerdikleri gen sayısı bakımından incelediğimizde 1, 2, 4 ve 11. kromozomlar entegre gen sayısı açısından yoğunlaşmış kromozomlardır (Şekil 5.56).

Entegrasyon tablosunda gen ifade verisinde belirlenen kriterler çerçevesinde öne çıkan genler açısından incelediğimizde: İfadesi artan gen grubunda kriterlerin en az 3'ünü sağlayan genlerden sadece 3 tanesi kopya sayısı verisi ile korele bir değişiklik göstermezken belirlenen kriterlerin hepsini sağlayan 18 genin kopya sayısı değişikliklerinden etkilendiği görülmektedir. İfadesi azalan gen grubunda yine kriterlerin en az 3'ünü sağlayan genlerden sadece 3 gen kopya sayısı değişiklik verisi ile ilişkilendirilemezken tüm kriterleri sağlayan 8 önemli genden 6 tanesi kopya sayısı değişikliklerinden etkilenmiştir. Bu genlerin listesi çizelge 5.38'de sunulmuştur. Böylece ifadelerindeki artma veya azalma olan genler ile bu bölgelerdeki değişiklikler ilişkilendirilmiş olup kopya sayısı değişikliklerinin ifadelerini etkilediği genler belirlenmiş olmuştur.

**Çizelge 5.37. Etkilediği genlerin sayısı açısından ön plana çıkan değişiklik bölgeleri**

<b>Kromozom</b>	<b>Band</b>	<b>Gen Sayısı</b>	<b>Entegre Olan Ekspresyon Verisi Genleri</b>
1	q21.3	6	CTSS,CTSK,SELENBP1,S100A10,IL6R,MUC1
1	q23.3	6	SLAMF7,ITLN1,FCGR2A,FCGR3A,FCGR2C,FCGR3B
2	p11.2	5	RETSAT,LINC00152,KRCC1,FABP1,IGKC
4	q13.3	6	SULT1B1,IGJ,SLC4A4,RASSF6,IL8,CXCL1
6	p21.1	6	FOXP4,RPL7L1,XPO5,VEGFA,HSP90AB1,CLIC5
7	q22.1	6	ZNF655,AZGP1,PCOLCE,MUC12,SERPINE1,DNAJC2
11	p15.5	8	ATHL1,IFITM1,IFITM3,MUC2,MUC5B,H19,MIR675,ASCL2
12	p13.3 1	5	SCNN1A,LPAR5,SLC2A14,SLC2A3,MFAP5
14	q32.3 3	5	AHNAK2,IGHA2,IGHA1,IGHG1,IGHD,IGHM,IGHV3-23,IGHV4-31
15	q21.1	5	SORD,C15orf48,SQRDL,SEMA6D,FBN1
16	q12.2	5	MT1E,MT1M,MT1F,MT1G,MT1H
16	q22.1	5	CES2,CES3,HSD11B2,NFATC3,NQO1
17	q12	5	CCL14,CCL15,DHRS11,RAPGEFL1, TOP2A
19	p13.3	5	CFD,CNN2,EFNA2,GADD45B,C3
19	q13.2	6	LGALS4,FCGBP,CYP2S1,CEACAM7,CEACAM1,CD79A
20	p13	9	SMOX,CDC25B,RBCK1,SDCBP2,NOP56,MIR1292,SNORD110,SNORD86,SNORD57



Şekil 5. 56. Entegre olan ekspresyon verisi genlerinin kromozomlardaki dağılımı

Çizelge 5.38. Gen ifade analizinde ön plana çıkıp kopya sayısı değişimlerinden de etkilenen önemli genler

Gen ifade analizinde ifadesinde <u>artma</u> görülen grupta ön plana çıkan ve kopya sayısı değişikliklerinden de etkilenen genler	VEGFA, CCND1, MET, CDC25B, CDKN2A, RUNX1, LEF1, CDK1, INHBA, GADD45B, SOCS3, BMP4, THBS2, FN1, GNAI2, MMP1, BCL2L1, EDNRA
Gen ifade analizinde ifadesinde <u>azalma</u> görülen grupta ön plana çıkan ve kopya sayısı değişikliklerinden de etkilenen genler	PRKACB, MAP2K6, IL-6R, PKIB, THBS1, BMP2

İkinci ve daha önemli bir değerlendirme olarak global gen ifade verisi ile bu kez %20 sıklıkla görülen kopya sayısı değişiklik bölgelerinin korelasyon gösterdiği bölgeler değerlendirilmiştir. Kayıp ve kazanç bölgeleri olarak 2 ayrı sınıfta değerlendirilen bu değişikliklerin entegrasyon sonuçları çizelge 5.39. ve 5.40'da sunulmuştur.

Kazanç bölgelerinde kopya sayısı değişimleri ve gen ifade verisinin ilişkili olduğu 31 bölge bulunurken bu bölgelerin 35 geni kapsadığı gözlenmiştir. Kayıp bölgelerinde ise entegre olan 38 bölge saptanmış olup bu bölgelerin 44 geni içerdiği görülmüştür. Gen ifade verisi analizinde ortaya konan kriterler açısından öne çıkan genler içinden VEGFA, GADD45B ve PLA2G2A genleri aynı zamanda %20 sıklıkla görülen kopya sayısı değişimlerinden de etkilendiği görülmüştür. Yine delesyon değişimlerinden etkilenmiş

CLCA4, GUCA2A, PLA2G2A, SLC26A2, MUC12, KLF4, GCNT3 genleri oldukça düşük gen ifade düzeyleri ile dikkat çekerken amplifikasyon değişimlerinden etkilenmiş MFAP2, COL1A2, SULF1, RIPK2, H19 ve CST4 genleri de oldukça yüksek ifade düzeyleri ile öne çıkmaktadırlar.

**Çizelge 5.39. %20 sıklıkla kazanç görülen kopya sayısı değişimlerinin gen ifade verisi ile entegrasyon sonucu**

KROMOZOM	BAND	ENTEGRE EXPRESYON GEN SAYISI	ENTEGRE EXPRESYON GENLERİ	KAT DEĞİŞİMİ
1	p36.13	1	MFAP2	8,32
1	q32.1	1	UBE2T	2,56
1	q41	1	SMYD2	2,22
4	p16.3	1	C4orf48	2,72
5	p13.2	1	RAI14	2,1
5	p15.2	1	ANKH	2,15
6	p21.1	2	XPO5/VEGFA	2,87/3,03 2,28
7	p15.2	1	CBX3	3,24
7	q21.3	1	COL1A2	5,48 2,95
7	q22.1	2	PCOLCE/SERPINE1	3,02/3,96 3,35 3,15
7	q32.2	1	MEST	2,31
8	q13.2	1	SULF1	6,99
8	q21.3	1	RIPK2	5,00
8	q22.1	1	LAPTM4B	2,06
9	q34.11	1	CERCAM	3,40
9	q34.3	1	COL5A1	4,68
X	q22.1	1	SYTL4	2,83
11	p15.5	3	H19/MIR675/ASCL2	7,06/2,67/3,46
11	q12.2	2	FADS1/MIR1908	2,67
11	q13.1	1	STIP1	2,06
11	q22.1	1	YAP1	2,07
12	q12	1	ANO6	2,37
17	q21.2	1	PTRF	2,24
19	p13.2	1	DNAJB1	2,30
19	p13.3	1	GADD45B	2,02
20	p11.21	1	CST4	7,71
20	p13	1	SMOX	2,07
20	q11.22	1	PHF20	2,26
20	q13.13	1	CSE1L	2,00
22	q13.1	1	LGALS1	3,00

**Çizelge 5.40. %20 sıklıkla kayıp görülen kopya sayısı değişimlerinin gen ifade verisi ile entegrasyon sonucu**

KROMOZOM	SİTOGENETİK LOKALİZASYON	ENTEGRE EXPRESYON GEN	ENTEGRE EXPRESYON GENLERİ	KAT DEĞİŞİMİ
1	p13.2	1	ST7L	-2,18
1	p21.2	1	SLC35A3	-3,56
1	p22.3	1	CLCA4	-13,57
1	p34.2	1	GUCA2A	-11,53
1	p36.12	1	PLA2G2A	-4,53
1	p36.13	1	PADI2	-6,73
1	q21.3	1	SELENBP1	-4,24
1	q42.2	1	SIPA1L2	-2,77
2	p11.2	1	RETSAT	-2,99
2	q13	2	LIMS1, MALL	-4,73
2	q35	2	NHEJ1,SLC23A3	(-),2,47/-2,47
2	q37.1	2	UGT1A8,UGT1A9	-7,2
3	p22.1	2	VIPR1,HIGD1A	(-),4,69/-2,82
3	p22.3	1	GPD1L	-3,06
4	q26	1	CAMK2D	-2,33
5	q31.2	1	CYSTM1	-2,16
7	q22.1	1	MUC12	(-),7,2/-6,66/-2,17
7	q22.3	1	SLC26A3	-9,93
9	q31.2	1	KLF4	-5,08
10	q23.31	1	RNLS	-3,21
10	q24.1	1	AVP1	-2,14
11	p15.4	1	TMEM9B	-2,2
12	p13.31	2	SCNN1A,LPAR5	(-),2,15/-3,14
12	q13.12	1	METTL7A	-3,74
12	q24.11	1	GLTP	-2,54
14	q32.11	1	TC2N	-2,06
14	q32.12	1	CHGA	-10,18
14	q32.31	1	ANKRD9	-2,04
15	q15.3	2	CKMT1B,CKMT1A	(-),3,09/-3,09
15	q21.3	1	RAB27A	-2,36
15	q22.2	1	GCNT3	-5,22
15	q23	1	THSD4	-2,04
17	q12	2	RAPGEFL1, TOP2A	(-),3,32/2,38
17	q21.2	1	WNK4	-2,09
17	q21.32	1	CALCOCO2	-2,55
17	q25.1	1	ACOX1	-2,45
19	q13.2	1	CD79A	-5,29

Not:Bu tablolarda %20 sıklıkla örneklerde sadece kazanç ya da sadece kayıp olarak görülen bölgeler daha koyu renk olarak gösterilmiştir. Gen ifade değişim değerleri ve kayıp/kazanç arasında ters ilişki gösteren genlerin olduğu da gösterilmiştir. Bir başka deyişle kazanç görülen bir bölgede yer alan bir genin ifadesinde azalma olduğu gözlenmiştir.

## 6.TARTIŞMA VE SONUÇ

Sık görülmesi ve mortalitesinin yüksek olması bakımından dünyanın en önemli halk sağlığı sorunlarının başında gelen kanser bir seri histopatolojik evre ile ilerlemektedir ve bu ilerlemenin arkasında genetik değişiklikler ve gen ifade patern değişiklikleri önemli bir itici güç olarak durmaktadır. Tümör oluşumu ve gelişimi ile ilişkili gen ve yolakların tanımlanması yalnızca bu prosesin biyolojisini anlamamızı sağlamayacak; aynı zamanda erken tanı ve tedavi dizaynlarında yeni hedefler sunacaktır. Omik yaklaşımlar kanserde bozulmuş genlerin ve kromozomal değişikliklerin tespitinde etkili olduğu pek çok çalışma ile ispatlanmıştır (55). Bu noktada teknolojideki ilerlemeler, hastalıklara artmış rezolüsyonla birlikte global bakabilmemiz açısından önemli fırsatlar sunmaktadır. Aynı zamanda omik teknolojilerin gücü ile kanser, kanserin başlangıç, ilerlemesi ve gelişmesiyle ilgili genetik değişikliklerin ve gen ifade değişimlerinin tanımlanması mümkün hale gelmiş olup genom, transkriptom ve proteom seviyesinde entegrasyon analizleri ile pek çok anahtar yolakve işlevtanımlanmıştır (56). aCGH ile yüksek çözünürlükle genomik kopya sayısı değişikliklerinin analizi henüz tanımlanmamış tümör baskılayıcılar ve onkogenleri kapsayan pek çok küçük genomik kayıp ve kazanç bölgelerinin tanımlanmasını sağlayacaktır. Bu değişiklik bölgelerinin iyi haritalanması dizi bilgisi ile ilişkilendirilebilir ve karşılık gelen kanser genleri ve ilgili moleküler yolakların tanımlanması, lokalize edilmesi ve valide edilmesine yardımcı olabilir. Aynı zamanda bu bilgileri tamamlayıcı gen ifade profillemeye analizi bu bölgelerle ve ilgili genleri kapsayacak ilişkinin desteklenmesini sağlayacak olup kanserle ilişkili genlerin tespitinde ortaya daha etkili ve güvenilir bilgilerin çıkmasını sağlayacaktır. Aquirre ve arkadaşlarının pankreatik adenokarsinomlarda gerçekleştirdikleri genomik ve transkriptomik entegrasyon çalışması bu durumun güzel bir örneğini teşkil etmektedir (57). DNA kopya sayısı değişiklikleri ve mRNA mikrodizin verisinin korele edildiği meme kanserli olgularda gen ifadesindeki değişikliklerin %12'sinin kopya sayısı değişimlerinin etkisi altında olduğu gösterilmiştir (58).

Çok adımlı karsinogeneze bir model olan kolorektal neoplazi kanser başlangıç ve ilerlemesiyle ilgili genetikbir paradigma içermektedir (59). Kopya sayısı değişiklikleri kanser hücrelerinin önemli değişikliklerindedir ve bu paradigmada önemli bir yerde durmaktadır. Pek çok çalışmada kolorektal kanserde yinelenen kayıp ve kazançlar tespit



edilmiştir (60-63) ve gen ifade farklılıkları bu genetik değişiklikle ilişkili olup malignant fenotipin oluşmasında önemli bir rol oynamaktadırlar (64-66). Bu noktada bu iki kapsamlı verinin entegrasyonu ve birbirleri olan ilişkisinin çözümü önemli olabilecek kolorektal kanser genlerinin tespitinde güçlü bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca elde edilecek veriler tanı ve tedavide kullanılabilir kanser spesifik moleküler hedeflerle sonuçlanabilmektedir (64, 65). Kolorektal kanser üzerinde günümüze kadar çok önemli çalışmalara imza atılmış olsa da kanserin oluşumu, ilerlemesi ve yayılmasının altında yatan hücresel, genetik ve moleküler mekanizmalara ait karanlık tablo aydınlatılmamış pek çok nokta barındırmaktadır (66). Bu tablonun aydınlatılmasında ve karmaşık resmin çözümlenmesinde ortaya atılan sorular çerçevesinde bu tez çalışması ortaya çıkmıştır. Bu tez çalışmasında sporadik kolorektal kanserde yüksek çözünürlüklü genomik ve transkriptomik yaklaşımlar kolektif bir şekilde uygulanmıştır. Bu uygulamada kolorektal kanser vakalarına ait arşiv materyalleri kullanılmış olup; gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları ile genom ebadında mikrodizin çalışmalarında arşiv materyallerinin kullanımına yönelik önemli bir katkı sunulmuştur. Tez çalışması kapsamında 50 sporadik kolorektal kanser olgusunda ve bu olguların eşli normal dokularında genom ebadında gen ifade profili ve kopya sayısı değişiklik analizleri gerçekleştirilmiş olup bu iki kapsamlı veri entegre edilmiştir. Yapılan bu analizler çerçevesinde aşağıdaki sorulara literatür eşliğinde yanıtlar aranmaya çalışılmıştır.

- Sporadik kolorektal kanserde etkin rol oynayan kopya sayısı değişimleri nelerdir?
- Bu değişimlerin boyutu nedir ve ne sıklıkta görülmektedir?
- Bu kopya sayısı değişimleri hangi gen veya genleri kapsamaktadır?
- Amplifikasyon ve delesyonların en sık görüldüğü kromozom bölgeleri nelerdir?
- Belirlenen gen veya gen gruplarındaki yapısal değişiklikler daha önce tespit edilenler ile uyumlu mudur? Yeni değişiklikler var mıdır?
- Bu değişimlerin buldukları gen veya genlerin ifadeleri üzerindeki etkileri nelerdir? Tespit edilen kopya sayısı değişimlerinin ve ifade farklılıklarının arasında bir korelasyon var mıdır?
- Genom ebadında bu kanser tipinde hangi genlerin ifadelerinde bir değişim söz konusudur ve bu değişimlerin etkisi nedir?
- İfadelerinde değişiklik görülen bu genler hangi yolaklarda görev almaktadır ve bu çerçevede bu kanser tipinde en çok etkilenen yolaklar ve genler nelerdir?

Çalışmada bu sorular eşliğinde global gen ekspresyon verileri ve kopya sayısı değişikliği verileri entegre edilmiş olup yalnızca disregule olan gen listesi çıkarılmamış aynı zamanda ilgili kromozom bölgeleri farklı ekspresyon değerleriyle birlikte analiz edilmiştir

## **6.1.Global Gen İfade Profili Çalışmaları**

### **6.1.1.RNA izolasyon ve global gen ifade optimizasyon çalışmaları değerlendirmesi**

*Sonuç: Gerçekleştirilen optimizasyon uygulaması ile FFPE örneklerle mikrodizin gen ifade çalışmalarında deneysel başarı sağlanmıştır.*

Örnek tipi ve kalitesi mikrodizin platformlarının performansını etkileyen en önemli faktörler arasındadır. Mikrodin çalışmalarının çoğunda iyi kalite taze donmuş (fresh-frozen) doku kullanılmıştır. Bununla birlikte kanser çalışmalarında FFPE arşiv materyallerinin kullanımı büyük önem arz etmektedir (144,221,222). FFPE örneklerinin bol bulunması araştırmalar için önemli olmakla birlikte bu örneklerin hazırlama ve saklama metodlarının DNA ve RNA kalitesi üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır (145). Nükleik asitler ve proteinler arasında oluşan çapraz bağlar ile degradasyon bu materyal tipiyle ilgili en büyük problemlerdir. Bu problemler FFPE'den izole edilen nükleik asitleri mikrodizin gibi yüksek işlem hacimli teknikler de kullanımını uygunsuz hale getirmektedir (145,146). FFPE örneklerin mikrodizin gen ifade çalışmalarında kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmış olmakla birlikte süreçle ilgili optimizasyonlara hala ihtiyaç duyulmaktadır.Bu noktada tez çalışması kapsamında kullanılacak olan FFPE materyallerle yapılacak olan ana çalışmadan önce deparafinizasyon-RNA izolasyon ve mikrodizin basamaklarını içeren kapsamlı bir optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Literatür kapsamında FFPE örneklerin global gen ifade çalışmalarında kullanılabilirliğine yönelik çalışmalar olmakla birlikte (147-151) bizim çalışmamız kapsamında deparaffinizasyondan mikrodizine kadar tüm aşamaları test eden bir çalışma bulunmamaktadır. Bu noktadan yola çıkarak planladığımız optimizasyon çalışmasında 4 farklı örnekten RNA izolasyonu için disekte edilen tümör ve normal hücrelerden Trizol ve 2 farklı ticari kit (Qiagen RNeasy FFPE kit ve Arcturus Picopure RNA isolation kit) test edilmiştir (Şekil 5.13.). İzolasyon optimizasyonun ardından en başarılı sonucun alındığı kit(Qiagen RNeasy FFPE kit) ile izole edilen RNA'lar ile mikrodizin aşamasına geçilmiş

olup burda 2 farklı amplifikasyon kiti (Affymetrix 3' IVT kit ve Nugen Ovation FFPE WTA system+ Encore Biotin Module) ve 2 farklı array tipi (Affymetrix HG U133 Plus 2.0 + U133 X3P array) ile örneklerin hibridizasyonu gerçekleştirilip pozitif sinyal alına prob yüzdesi açısından mikrodizin performans değerlendirilmesi yapılmıştır.

Üç ticari kiti RNA izolasyon sonucu elde edilen RNA'ların spektrofotometrik ve elektroferogram sonuçları açısından değerlendirdiğimizde miktar ve özellikle saflık açısından "Qiagen RNeasy FFPE tissue kit" ile elde edilen sonuçların daha başarılı olduğu görülmektedir (Çizelge 5.2), (Şekil 5.14). Elde edilen bu sonuçların ardından çalışmalara "Qiagen RNeasy FFPE kit" ile devam edilmiştir. Laboratuvarımızda daha önce bu kit ile yapılan bir çalışmada kite ait deparafinizasyon adımı yerine laboratuvarımızda uygulanan bir deparafinizasyon protokolü ile gerçekleştirilen izolasyonlarda daha çok miktarda RNA elde edildiği gözlenmiştir. Tez çalışmasında da mikrodiseksiyon yapılacağı için elde edilecek RNA'nın miktarı için bu durum büyük önem taşımıştır. Dolayısıyla ilgili kit ile, hem laboratuvarımızda uygulanan deparafinizasyon adımı eklenerek hem de kitin kendi deparafinizasyon adımı değiştirilmeden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve spektrofotometrik ölçümleri açısından iki uygulama karşılaştırıldığında deparafinizasyon adımı açısından modifiye edilen kit protokolü ile çalışılan örnekler için daha tutarlı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 5.3.).

Modifiye Qiagen RNeasy FFPE kit ile izole edilen RNA örnekleri ile 2 farklı amplifikasyon ve işaretleme kiti (Affymetrix 3' IVT Kit ve NuGEN Ovation FFPE WTA system) ve 2 farklı array tipi (Human Genome U133 Plus 2.0 ve U133\_X3P) kendi aralarında kombinlenerek mikrodizin performans karşılaştırılması yapılmış (Şekil 5.15) ve bu karşılaştırmalar pozitif sinyal alınan prob yüzdesi açısından değerlendirilmiştir. Laboratuvarımızda intakt insan RNA'sı ile yapılan mikrodizin gen ifade çalışmalarında bu yüzdeler % 40-50 arasında değişmektedir. Bu optimizasyon uygulamasında en düşük yüzde Affymetrix 3' IVT Kit+ HG U133 Plus 2.0 kombinasyonu ile elde edilirken (%13.0-25.13) en yüksek oran NuGEN Ovation FFPE WTA system +HG U133\_X3P (%46.72-%55.52) kombinasyonu ile elde edilmiştir(Çizelge 5.4.) Bu sonuçlar çerçevesinde en başarılı sonuç NuGEN Ovation FFPE WTA system + HG U133\_X3P kombinasyonu ile elde edilmiştir (p<0.001). Bu sonuçlar mikrodizin aşamasındaki başarıda etkili faktörün array tipi değil amplifikasyon kitinin (NuGEN Ovation FFPE WTA system ) olduğunu

göstermiştir. Bu amplifikasyon kiti ile U133-Plus 2.0 kombinasyonunda pozitif sinyal alınan prob yüzdesindeki ortalama artış % 26,27 iken U133\_X3P kullanıldığında ortalama artış % 28,87 dir. FFPE örnekler ile gerçekleştirilen mikrodizin gen ifade çalışmalarında NuGEN Ovation FFPE WTA system kullanıldığında daha başarılı sonuçlar alındığı bu marka kitlerin kullanıldığı diğer çalışmalarla da gösterilmiştir (150, 151, 230).Nugen kitinin daha başarılı sonuç vermesinin altında yatan en önemli sebep kullandığı farklı amplifikasyon stratejidir. RiboSPIA olarak ifade edilen bu yaklaşımda Affymetrix 3' IVT'den farklı olarak RNA amplifikasyonunda primer olarak hem oligo dT hem de random hexamer kullanılmaktadır.

Bu optimizasyon çalışması FFPE örnekleri ile başarılı ve güvenilir mikrodizin gen ifade profil analizlerinin gerçekleştirilebileceğini göstermiş olup FFPE örneklerin yüksek işlem hacimli mikrodizin çalışmalarında kullanılabilmesinin önünün açılmasına katkı yapmıştır. Kanser gibi pek çok hastalığın yanında nadir görülen hastalıkların çalışmalarında FFPE örneklerin kullanılabilir olması bu çalışmalara ve dolayısıyla elde edilecek önemli bilgilerin açığa çıkmasına önemli bir hız kazandıracaktır.

### **6.1.2.Mikrodizin Gen İfade Analiz Çalışmaları Değerlendirmesi**

*Sonuç: Gerçekleştirilen genom ebadında gen ifade analizi; kolorektal transformasyonun altında yatan mekanizmanın anlaşılmasında önemli bilgiler sunmasının yanı sıra rapor edilen bazı transkripsiyonel değişiklikler prognostik biyobelirteç ve tedavi için önemli birer hedef olarak potansiyel taşımaktadır.*

#### **6.1.2.1. Paired tümör–kontrol karşılaştırması analiz değerlendirme**

Kanser biyolojisinde cevabı aranan önemli sorulardan bir tanesi de tümör hücrelerinin gen ifade profilindeki değişiklikler ve bunun karsinogenez sürecindeki anlamıdır (67). Dünya genelinde 3. en yaygın görülen kanser türü olan kolorektal kanser; özellikle henüz tam anlaşılmayan moleküler alt yapı, moleküler alt tiplere olan ihtiyaç, tanı ve tedavide kullanılabilir biyobelirteçler gibi pek çok başlık altında sık çalışılan bir kanser türü olarak ön plana çıkmaktadır. Bu noktaların çözümünde; tümör oluşması ve ilerlemesi, prognostik ve prediktif değeri olan gen imzası ve tabiki yeni tümör hedeflerinin tespitinde

global gen ifade çalışmaları büyük önem arz etmekte olup; pek çok çalışma ile de önemli bilgiler elde edilmiştir (195-202). Ancak klinikte değerlendirilebilmeleri için zamana ihtiyaç olduğu ve daha ileri çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmektedir (194). İşte bu noktadaki boşluğa katkı sağlamak amacıyla tez kapsamında sporadik kolorektal kanser global gen ifade profil analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda tümör oluşumu ve ilerlemesinde etkin rolleri olabilecek genlerin tespitinde pek çok karşılaştırma (tümör vs kontrol, grade I-II-III gibi) gerçekleştirilmiş olup önemli sonuçlar elde edilmiştir. İlk olarak tümör-kontrol paired karşılaştırması sonuçları literatür eşliğinde değerlendirilmiştir.

Paired tümör-kontrol karşılaştırmasında en az **2 kat değişimi ile 925 gen ( $p < 0,001$ ) farklı olarak ifade edilmiş olup; 349 genin ifadesinde artma gözlenirken 576 genin ifadesinde azalma olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.19). 925 gen ile gerçekleştirilen hiyerarşik kümeleme analizi sonucunda örneklerin gen ifade paternlerine göre tümör ve kontrol olmak üzere 2 gruba oldukça net bir şekilde ayrıldığı görülmektedir (Şekil 5.19.). Bu da elde edilen gen setinin anlamlılığını artırmıştır.**

Tez çalışması kapsamında ifadesi azalan ve artan gen listelerinin gen ontoloji, zenginleşme ve KEGG yolak analizleri “DAVID” yazılımı üzerinden ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Zenginleştirme işlemi için DAVID fonksiyonel anotasyon küme modülünden yararlanılmıştır. Uygulama sonucunda zenginleşme skoru  $\geq 1.3$  olan anotasyon küme sayısı ifadesi artan gen grubu için 26 olup bu kümelerde yer alan gen sayısı 85’dir, ifadesi azalan gen grubu için ise küme sayısı 12 olup; bu kümelerde yer alan gen sayısı 56 olarak tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen tüm değerlendirmeler DAVID analizi sonrası ortaya çıkan genel tablo üzerinden yürütülmüştür.

**İfadesi artan** 349 gen içinde DAVID analizleri sonrasında ifadesinde en çok artış görülen 10 gen COL10A1 (12,34 kat artma) , SPP1, FAP, INHBA, MMP11, Col12A1, THBS2, CLDN1, CDKN2A ve FNDC1 dir. **İfadesi azalan** 576 gen içinde ise DAVID analizleri sonrasında ifadesinde en çok azalma görülen 10 gen CA1 (14,02 kat azalma), CLCA4, CA2, ABCC13, SCNN1B, PKIB, CLCA1 SL26A3, SST ve CHP2’dir. Bu noktada bizim de gen listemizde ifadesinde en çok azalma görülen genlerden olan CA2 (carbonic anhidrase II) geni literatürde tümör-kontrol karşılaştırmasında en fazla raporlanan farklı ifade edilen gen olarak dikkat çekmektedir. Çalışmamızda ifadesinde azalma gösterilen bu

gen için 11 ayrı çalışmada da ifadesinde azalma olduğu rapor edilmiştir (200). Yine farklı ifade edilen gen listemizde en çok değişimin gözlemlendiği bir diğer gen CA1'dir. CA1, CA2 bu iki enzimin prognostik öneminin yanında ekspresyonlarının kolorektal kanserde metastatik agresiflikle ilişkili olduğu gösterilmiştir (223). Benzer şekilde kanser olgularında dışkıda CA2 protein seviyesinin gen ifade sonuçları gibi düşük olduğu gösterilerek CA2'nin potansiyel diyagnostik amaçlı kullanım potansiyeli olabileceği vurgulanmıştır (231). Genel anlamda analiz sonucu elde ettiğimiz gen listesini daha önce kolorektal kanserde mikrodizinerler ile gerçekleştirilen çalışmalarla (66, 192, 194, 195, 196, 197, 200, 224, 225) kıyasladığımızda bizim verimizin de ortak görülen pek çok geni valide ettiği görülmektedir. Ortak tespit edilen genlere COL1A1, COL1A2, FN1, INHBA, THBS2, UBE2C, CDC25B, MMP1, MMP11, CA1, CA2, CA12, SOX9, TOP2A, MUC2, SPARC, CEACAM7, SST gibi örnekleri verebiliriz. Bu sık karşılaşılan ortak genlerin dışında tez kapsamında gerçekleştirilen analizde pek çok farklı gen de tespit edilmiştir.

İfadesi artan grupta en çok gen 2. kromozomda bulunurken 6, 7 ve 11. kromozomlar genlerin en çok yoğunlaştığı diğer kromozomlardır. İfadesi azalan grupta ise 1, 2 ve 12. kromozomlar genlerin en çok yoğunlaştığı kromozomlardır ( $\geq 10$ ). Kolorektal kanser çalışmalarında 7 ve 11. kromozomlar amplifikasyonun sık görüldüğü kromozomlar arasında olup; gen sayısı açısından dikkat çeken bu önemli kromozomlar kanser oluşumu ve ilerlemesi açısından MET (7q31) ve CCND1 (11q13) onkogenleri gibi pek çok önemli geni barındırmaktadır. Bu genlerden CCND1 (Siklin D1) hücre döngüsünde G1'den S fazına geçişi kontrol etmekte olup; bu onkogenin artmış ifadesinin pek çok kanserde olduğu gibi kolorektal kanserin ilerlemesinde de etkin olduğu gösterilmiş ve prognostik değeri ortaya konmuştur (232, 233). 7. kromozomda yer alan bir tirozin kinaz reseptörü olan MET proto-onkogeni aktive olduğunda devamında MAPK ve/veya PI3K/Akt yolları da aktive olmaktadır. Bu noktada artmış MET geni ifadesi; hücre proliferasyonunu, invazyonu ve metastazı artırmaktadır (234, 235). Yine gen listemizde ifadesi azalan genlerin yoğunlaştığı 1. kromozomun kayıpların en sık görüldüğü kromozomlar arasında yer aldığı görülmektedir. (66, 200, 203, 204, 209, 210). Kendi çalışmamız da gen amplifikasyonun ve delesyonun sık görüldüğü bölgeler gen ifadesinde artış/azalış görülen ve genlerin yoğunlaştığı kromozomları valide eder niteliktedir.

Fonksiyonel anotasyon kümeleme analizlerinde beraber hareket eden gen gruplarını tespit edebilmekteyiz. Bununla birlikte ortaya çıkarılmaya çalışılan hikayenin ne yönde ilerlediğini ve bize ne anlatmaya çalıştığını anlayabilmek adına bu anotasyon küme terimlerinde yer alan genler; zenginleşen kümede yer alma, 3 veya daha fazla anotasyon kümesinde tekrar etme, 3 veya daha fazla yolakda görev alma gibi bazı kriterler çerçevesinde değerlendirilerek anlamlandırılmaya çalışılmıştır. Ayrıca 3 veya daha fazla gen içeren yolaklarda belirlenip bu süreçte etkin rol oynayan mekanizmalar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu noktada aynı yolak üzerinde bulunup, ifadelerinde artma ya da azalma görülen genlerdeki dengenin ve bu dengenin karsinogenez sürecindeki biyolojik anlamı bize bu kompleks yapıbozun parçalarını doğru yerlere koymamıza yardımcı olacaktır.

Bulgular kısmında ifade edildiği üzere belirlenen 5 kriterin en az 3'ünü sağlayan gen sayısı **ifadesi artan grupta** 37 olarak tespit edilmiş olup tüm kriterleri kapsayan gen sayısı ise 18 dir. Bu genler: **FN1, THBS2, VEGFA, CCND1, MET, GNAI2, MMP1, BMP4, BCL2L1, CDKN2A, LEF1, RUNX1, CDC25B, GADD45B, CDK1, SOX3, INHBA ve CDK1** dir. 5 kriterin en az 3'ünü sağlayan gen sayısı **ifadesi azalan grupta** ise 24 olup tüm kriterleri kapsayan gen sayısı ise 8 dir. Bu genler: **PRKACB, EGFR, MAP2K6, THBS1, BMP2, IL-6R, PKIB ve PRKAG2**'dir. Bir başka deyişle tümör örneklerinde farklı olarak ifade edilen bu genler karsinogenez sürecinde gen listemizde ön plana çıkan genlerdir.

DAVID yazılımı üzerinden gerçekleştirilen analizler sonucunda ifadesi artan ve azalan gen gruplarını birlikte değerlendirdiğimizde tümör-kontrol karşılaştırmasında özellikle gen sayısı ile ön plana çıkan yolaklar: **İfadesinde artma görülen gen grubu için kanser yolağı, fokal adezyon, p53 sinyal yolağı, ekstraselüler matriks reseptör ilişkisi ve hücre döngüsü yolakları ön plana çıkarken; ifadesinde azalma görülen gen grubunda MAPK sinyal yolağı, metabolizma, apoptozis, kalsiyum, Wnt ve ErbB sinyal yolakları dikkat çekmektedir.** Bu bölümde gen dağılımları dikkate alınarak en az 9-10 gen içeren yolaklar değerlendirilmiştir.

**Kanser yolağı** en çok gen içeren (20) yolak olup gen ifadesinde artış görülen genler bu yolağın büyük bölümünü (15 gen) oluşturmaktadır. KEGG kanser yolağı farklı sinyal yolaklarının üyelerini tek bir yolakda toplamakta olup kanserin farklı evrelerine ait bilgi

taşıma ile birlikte bu bölümde değerlendireceğimiz diğer yollardaki genleri içerdiği için ek olarak bahsedilmemiştir.

**Fokal adezyon** (17 gen) (FAK) ve **ekstraselüler matriks reseptör ilişkisi** (13 gen) tümör hücrelerinde ifadesinde artma görülen genlerin yoğunlaştığı yollardır. Tümör hücrelerinde normal hücrelere göre **COL1A1, 1A2, 3A1, 4A1, 4A2, 5A1, 5A2, 6A3, SSP1, FN1, THBS2, VEGFA, CCND1, MET, TNC, ELK1, ZYX** genlerinin ifadesinde artma **THBS1, PIK3CG, EGFR** genlerinin ifadesinde ise azalma görülmüştür. Genlerin yolak üzerine yerleştirdiğimizde yolağın başlangıç bölümünün (Kollajenler, VEGFA, MET gibi) ön plana çıktığı görülmekte ve yolağın başlangıcının kolorektal kanser hastalığıyla yakından ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. Nam ve arkadaşlarının çalışmaları da bu noktayı desteklemektedir (236). Bu yolak aynı zamanda devamında etkileşimde (Wnt, PI3K-AKT/PKB, ve MAPK) olduğu yollaklar açısından da önemlidir. MAPK, Wnt yollaklarında görevli ELK1 ve siklinD1 (CCND1) gibi genlerdeki ifade artışı hücreleri çoğalmaya yönlendirmektedir. Bu görüntüsüyle FAK yolağı kolorektal kanserin başlangıcını tahmin edici gen seti olabilecek terapötik hedefler taşımaktadır (236). Bu iki yollakta da kollajen genlerinin sayıca fazlalığı dikkat çekmektedir. Kanser hücrelerinin büyümesi sırasında pek çok tümör, kollajen fibrilleri ve miyofibroblastlardan oluşan farklı dezmozoplazi ve organize olmayan fibröz veya konnektif doku üretimi sergilemektedir. Tümörün etrafında ekstraselüler matriks birikimi hücre proliferasyonunu, hücre göçünü ve yayılmasını doğrudan etkilemektedir (237). Bu yollakta bulgular bölümünde de anlatılan kriterlerin (zenginleşme, farklı kümelerde tekrar etme, farklı yollaklarda görev alma vb..) tamamını sağlayan pek çok gen bulunmaktadır. (Bazıları bu bölümde değerlendirilen diğer yollaklarda da yer aldığı ve o kısımda anlatılacağı için bu yolak kapsamında anlatılmamıştır). Bu yolak üzerinde tüm kriterleri sağlayan genlerden THBS2 (trombospondin 2) ve FN1 (fibronektin1) genlerinin ifadesinde artma görülürken THBS1 geninin ifadesinde ise azalma görülmüştür. Bu genlerin ekstraselüler matriksin yeniden modellenmesinde ve kanser progresyonunda önemli işlevleri vardır. Örneğin **THBS1 (TSPI)** geni anjiyogenezisi inhibe eder ve TGFb1' i aktive ederek tümör büyümesini baskılamaktadır. Bu genin ifadesindeki azalma ise anjiyogenezis ve tümör büyümesi ile sonuçlanmaktadır (238). Yine **FN1** genin ifadesindeki artış kolorektal kanserin yayılımı ve hücre göçü ile ilişkilendirilmiştir (239).



**P53 sinyal yolağı** yine ifadesinde artma görülen genlerin yoğunlaştığı bir yolak olmuştur. Toplam 12 genden 11'inin ifadesinde artma görülmüştür. **SERPINE1**, **SERPINE2**, **TIMP3**, **CCND1**, **CDKN2A**, **IGFBP3**, **CDK4**, **HSP90AB1**, **CDK1**, **DNAJC2**, **GADD45B** genlerinin ifadesinde artma görülürken **THBS1** geninin ifadesinde azalma görülmüştür. Koyu renk ile gösterilen genler gen ifade verisini anlamlandırmada kullandığımız kriterleri sağlamaktadır. Bu yolakda yer alan ve ifadesinde artma görülen **SERPINE1** yani **PAI-1** geni sinyal iletiminde, hücre adezyonunda ve hücre göçünde önemli rolleri bulunmakta olup PAI-1'in tümör invazyonu ve metastazda anahtar bir faktör olduğu belirtilmektedir. Bu genin ilerlemiş kolorektal kanser durumu ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve kolorektal malignan durumu için potansiyel bir belirteç olduğu ileri sürülmüştür (240). Bir diğer öne çıkan gen **HSP90AB1** geni HSP90 gen ailesinden olup sinyal iletimi, hücre döngüsü kontrolü, steroid hormon reseptörü, tirozin ve serin/treonin kinazları için anahtar regülatör moleküllerden olup agresif kanser fenotipinde etkisi olduğu gösterilmiştir (241). Malignan fenotip ile ilişkili Hsp90 genlerini hedef alan inhibitörler kullanıldığında hücrelerin p53 indüklü DNA hasarına ve apoptozise yönlendikleri görülmüş olup; yeni anti-kanser ajanı olma potansiyellerine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (242, 243). Bu yolakda görülen genlerin hemen hemen hepsinin ifadesinde artma gözlemlenmiştir. Genlerin çoğu hücre döngüsünde görevli olmakla birlikte tümörün başlaması, ilerlemesi ve yayılması süreçlerinde p53 yolağının etkin olduğu görülmektedir. Ayrıca bu yolakda yer alan pek çok genin prognostik ve diyagnostik önemleri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Wang ve arkadaşlarının GADD45 geni için potansiyel terapötik hedef önermelerini sundukları 2012 tarihli çalışmaları buna güzel bir örnek teşkil etmektedir (244).

**Hücre döngüsü** ifadelerinde artma görülen genlerin yoğunlaştığı bir yolaktır. Bu yolakda görülen 9 genin 8 tanesinin ifadesinde artma gözlenmiştir. İfadesinde artma görülen genler **CDC25B**, **CCND1**, **CDKN2A**, **CDK4**, **BUB1**, **CDK1**, **GADD45B**, **PRKDC**. İfadesinde azalma görülen gen ise: **CDC26**'dır. Hücre döngüsünün genetik kontrolündeki değişiklikler denetimsiz hücre çoğalması ve kanser gelişimi ile sonuçlanmaktadır (42). **CDK1** ve **CDK2** genlerin artmış gen ifadesi hücre döngüsündeki ilerlemenin hızına doğru orantılı olarak yansması kolorektal kanserin ilerlemesinde de etkin olduğu rapor edilmiştir (245). Siklin D, hücre döngüsü ile mitojenik uyarım arasında bağlantı kuran bir büyüme sensörü gibi davranmaktadır. Siklin D1 (**CCND1**) erken G1 fazında **CDK4** ve **CDK6**'ya bağlanmaktadır (42). Anormal siklin D1 ekspresyonu pek çok kanser tipinde olduğu gibi

kolorektal kanserde de gösterilmiş olup; bu genin ifadesindeki artışın kolorektal karsinogenez sürecinin başlangıcındaki olaylardan biri olduğu ve tümörün ilerlemesinde etkin rol üstlendiği belirtilmektedir (246, 247). Tümör örneklerinde gen ifadesindeki değişim ve belirlenen kriterler çerçevesinde öne çıkan genlerden biri olan CDKN2A (P16INK4A, growth arrest and DNA damage inducible gene) bir tümör baskılayıcı gen olmasına rağmen ifadesinde önemli bir artış (7,41 kat) olduğu görülmüştür. Bu durum kolorektal tümörün invazyon bölgesi ile tümörün iç kompartmanlarının farklı davranış sergiledikleri bilgisi ile bütünleştirilebilir. Jung ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmalarında kolorektal karsinogenez de önemli bir gen olan  $\beta$ - katenin hedefinde yer alan siklinD1 ve CDKN2A'nın korele gen ifade seviyeleri invazyon bölgesinde değerlendirilmiş ve her ikisinde de artmış bir ifade gözlenmiştir. Bu noktada hücrelerin çoğalmanın olmadığı bir noktada durduğu; ancak çevresel sinyalleri değerlendirdiği ve CDKN2A'nın degradasyonu ile tekrar çoğalmaya ve yayılmaya devam ettiği belirtilmektedir (248). "Invasion front" olarak da isimlendirilen bu kompartmandaki değişimlerin tümörün agresifliği ve metastazı ile yakından ilişkili olduğu ve bu noktadaki değişimlerin kanserin yayılmasında indikatör olarak değerlendirilebileceği belirtilmektedir (249). CDK'ların aktivasyonu CDC25 fosfataz ailesinin defosforilasyonu ile düzenlenmektedir. Çalışmamızda da ön plana çıkan bu aile genlerinden bir tanesi de döngünün S fazında aktivite gösteren CDC25B genidir. CDC25 genlerinin artmış ifadesi kontrolsüz CDK-siklin aktivitesi ile sonuçlanmakta olup tümör oluşumu ile yakından ilişkilidir (42). CDC25B geni potansiyel onkogen olarak da anılmaktadır kibu durum genin, karsinogenez sürecindeki önemini de göstermektedir (250). Bu noktada hücre döngüsü ilişkili genler prognostik ve özellikle de kanser tedavisi için önemli potansiyele sahiptirler. Süreç içinde 50'den fazla tedavi amaçlı inhibitör tanımlanmış olup çalışmalar devam etmektedir (42).

Karsinogenez sürecinin etkili yollarından biri olan **Apoptosis** tümör örneklerinde daha çok ifadesinde azalma görülen genlerin yoğunlaştığı bir kompozisyonudur. **BCL2L1**, **CFLAR**, **STAT1** ve **TOP2A** genlerinin ifadesinde artma gözlenirken; **PRKACB**, **CHP2**, **PIK3CG**, **NOX1**, **BCL2L14**, **BCL2L11** (Bim) ve **THBS1** genlerinin ifadesinde azalma görülmüştür. Azalmış apoptozis tümör başlangıcında, ilerlemesinde, yayılmasında ve ilaç direncinde kritik rollere sahiptir. Bu mekanizmanın önemli genlerinde biri olan ve çalışmamızda ifadesinde artış görülen **BCL2L1** (BCL-XL) geni kolorektal karsinogenezde

önemli rol oynayan ve kanserin malign biyolojik davranışı ile ilişkilendirilmesinin yanı sıra ilaç direnci fenotipindeki etkisi de rapor edilmiştir. Bu genin ifade edilen özellikleriyle önemli bir anti-kanser hedefi olabileceği belirtilmektedir (251). Bir apoptozis inhibitörü olan CFLAR (CASP8 And FADD-Like Apoptosis Regulator) ve TOP2A genlerinin ifadelerindeki artma kolorektal kanserde azalmış apoptozis ve karsinogenez sürecinde ilerleme ile sonuçlanmaktadır (253, 254). Semba ve arkadaşları ifadesinde azalma görülen genlerden biri olan PIK3CG geninin apoptozis yolağının da içinde yer alan PI3K-Akt/PKB sinyal sistemini inhibe edip tümörigenezden ve kolorektal kanserin ilerlemesinden sorumlu olduğunu ifade etmektedirler (255). Bu genin ekte yer alan yolak şemasındaki yeri de oldukça dikkat çekicidir. Yolağın başlarında yer alması bu geni önemli bir terapötik hedef olarak ön plana çıkarmaktadır. Yolakta yer alan ifadelerinde azalma görülen genler normalde apoptozisi indükleyen genlerdir (Bim, BCL2L14 gibi). Ancak bu genlerin ifadelerindeki azalma tümör hücrelerinde apoptozisin de azalmasına yol açmaktadır. Genel anlamda bu yolakta ifadesinde değişim görülen genler tümör hücrelerinde apoptozisin azalmasına ve karsinogenez sürecinin ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. Yalnızca 2 genin (STAT1 ve NOX1) ifadesindeki değişim literatürle uyumlu olmamakla birlikte; CDKN2A örneğindeki gibi farklı bir mekanizma ile bu sürece katkıda bulunmuş olabilirler. Ancak doğru yorum için hücresel seviyede daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Tümör-kontrol karşılaştırmasında öne çıkan bir diğer yolak MAPK sinyal yolağıdır. Bu yolak proliferasyon, farklılaşma, hücre göçü ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde önemli roller üstlenmiştir. **MAP2K6, PRKACB, FGFR2, PLA2G2A, EGFR, CHP2, RLPK, PLA2G10, HMGN** genlerinin ifadesinde azalma gözlenirken; **HSP1, CDC25B, ZAK, ELK1, STAT1, GADD45** genlerinin ifadesinde artma gözlenmiştir. İfadesinde artma görülen genlerin çoğu kanserin oluşumunda ve ilerlemesinde etkin roller üstlenmişken; ifadesinde azalma görülen genlerden bazıları (FGFR2, EGFR, MAP2K6, PLA2G10 gibi) bu yolağın kanserleşme sürecindeki etkisi ve literatürle uyumsuzluklar sergilemektedir. Örneğin ErbB reseptör ailesinde yer alan EGFR (Epidermal growth factor receptor) (EGFR) geni pek çok sinyal yolağı üzerinde aktive edici role sahip olup; tümör büyümesi sürecinde de etkin rol oynayan bir genidir. Kolorektal kanserde de ekspresyonunun arttığı gösterilen bu gen terapötik bir hedef olarak değerlendirilirken (256) bizim gen listemizde literatürün aksine ifadesi azalan grupta yer almaktadır. Bu önemli

yoladaki bu dengesizlik için şu noktada net bir şey söylemeden önce bu genlerin ifadesinin QRT-PCR ile de değerlendirilmesi gerekmektedir. QRT-PCR sonuçlarının mikrodizin verisini valide etmesi durumunda ise hücresel seviyede daha ileri analizlerle bu nokta aydınlatılmaya çalışılmalıdır.

**Metabolizma** pek çok mikrodizin gen ifade çalışmasında olduğu gibi gen sayısı açısından bizim çalışmamızda da ön plana çıkan yollar arasında yer almakta olup gen ifadesinde azalma görülen grup daha yoğun olarak bu yolağın bir parçası olmuştur. Kanserde aktif sinyal yollarının yanında değişmiş metabolizmanında önemli bir payı olduğu gösterilmekle birlikte klinik kanıtlarda metabolizma-kanser ilişkisini doğrular niteliktedir. Çoğalan kanser hücreleri normal hücrelere göre önemli derecede farklı metabolik ihtiyaçlar sergilemektedir. Örneğin artan bu çoğalma isteklerini karşılamak için ek besinlere ve enerjiye ihtiyaç duymakla birlikte tümör progresyonu boyunca metabolik yollarını yeniden düzenlerler (257). Kanser-metabolizma ilişkisi yeni olmamakla birlikte en iyi karakterize edilmiş metabolik fenotip “Warburg etkisi” dir. Buluşun sahibi, Otto Warburg, kanser hücrelerinin enerji üretim yöntemlerinin değiştiğini ve sağlıklı hücrelerden farklı harekete geçtiğini ifade etmiştir (258). Kanserli hücreleri; normal hücrelerden farklı olarak hücrenin enerji ihtiyacının %95’ini karşılayan mitokondri yerine glikoliz yolunu tercih etmektedirler. Bu yöntem oksijenin yetersiz olduğu durumlarda başvurulan verimsiz ve toksik bir yöntem olmasına rağmen kanserli hücreler ortamda yeterince oksijen olsa dahi enerji ihtiyaçlarını sadece bu yolla karşılıyorlar, mitokondrileri yokmuş gibi davranıyorlardı. Metabolik dönüşümlerin pek çok spesifik transkripsiyonel programla kontrol edildiği bilinmekte ve tümör baskılayıcı gen ve onkogen mutasyonlarına cevap olarak da aktive edildiği bilinmektedir (257-260). Bu noktada çalışmamızda tespit edilen genler içinde CA1 ve CA2 genleri ifadelerindeki farklı değişimle (azalma) ve daha önce ifade edilen özellikleriyle dikkat çekmektedir. İfadesinde azalma (PLCD3, ABCC13, ABCC3, ABCD3, ABP1) ve artma (GUCY1A3) görülen bazı genlerle ilgili olarak kolorektal kanserde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu genlerin karsinogenez sürecindeki anlamlarının ortaya çıkarılması bu yolak üzerindeki eksik bilgilere önemli katkılar sunabilir. İfadesinde artma görülen GSTP1 geni glutatyon S-transferaz enzim süper ailesinin bir üyesi olup detoksifikasyonda görevlidir. GSTP1 geni kolorektal kanserde aberrant kript odağından ilerlemiş karsinoma kadar yaygın olarak ifadesinde artma görülen bir genidir. Artmış GSTP1 ifadesi aynı zamanda çoklu ilaç direnci ve kötü

prognoz ile ilişkilendirilmiş olup GSTP1 geni tümör biyobelirteçi ve terapötik hedef olarak gösterilmektedir (261). Metabolizma yolağında da görev alan PIK3CG (PI3K, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma) geni aynı zamanda kanser, kolorektal kanser, VEGF sinyal yolağı, insülin sinyal yolağı, kemokin sinyal yolağı gibi daha pek çok önemli yolakda görev almakta olup; daha önce bahsedildiği üzere kolorektal kanserde tümörigenezis ve kanserin ilerlemesi sürecinde etkin olduğu belirtilmektedir.

Tez çalışmasında analizde karsinogenez sürecinde etkili genlerin tespitinde kullanılan tüm kriterleri kapsayan **THBS2 (19 kat)** ve **INHBA (11,31 kat)** genleri gen ifadesindeki artış ile dikkat çekmektedir. INHBA TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$  superfamily) ailesinin bir ligandıdır. Bu 2 gen birlikte TGF- $\beta$  sinyal iletiminde rol oynamaktadır. Bu iki genin korele ifade artışı kanserde artmış invazyon ve değişmiş hücrelerarası matriks proteolizisinden sorumlu olduğu belirtilmektedir. Kim ve arkadaşlarının bu çoklu kanser çalışmalarında bu genlerin metastaz inhibe edici bir ajan olarak terapötik hedefler listesine girebileceği önerilmektedir (262). Yine TGF- $\beta$  yolağında ifadesi azalan grupta **ACVRL1** ve **THBS1** geninin bulunması ve bu genlerin yine kolorektal kanserde tümör damarlaşması ve metastazında etkili olması bu genlerin beraber etkinliklerinin olabileceği fikrini uyandırmakta ve gerçekleştirilecek yeni çalışmalarla bu alanda önemli bir bilgi sağlanabileceği öngörülmektedir. Yine bu noktada anjiyogenik bir faktör olan **VEGF** geninin çalışmamızda tümör örneklerinde artmış ifadesi dikkat çekmekte olup; bu genin gen ifade analiz değerlendirmemizde en önlere yer alması bu genin değerini artırmaktadır. Tümör hücreleri büyürken besinlere, oksijene ve yeni damarlara ihtiyaç duymaktadır ki bu noktada anjiyogenez süreci devreye girmektedir. Anjiyogenez tümör ve stroma hücrelerinden anjiyogenik faktörlerin salınımına bağlı olan karmaşık bir süreçtir. VEGF geni en büyük pro-anjiyogenik faktör olarak düşünülmektedir. Bu genin ifadesi, tümörün etrafında yeni damar oluşumu indüklenmekte ve tümörün eksponensiyal büyümesine aracılık etmektedir. Pek çok kanserde olduğu gibi VEGF genin artmış ifadesi kolorektal kanserin moleküler mekanizmasında önemli bir yerde olup sahip olduğu potansiyel bu geni anti-kanser yaklaşımların hedefi yapmıştır. Bevacizumab (Avastin) VEGF inhibisyonunda kullanılan bir monoklonal antikor olup kanser tedavisinde anti-anjiyogenik ajan olarak tanımlanmıştır (263, 264). **LEF-1** (lymphoid enhancer factor-1) çalışmamızda yine ön plana çıkan yolaklardan Wnt yolağının

bir parçasıdır. Wnt sinyalleri, normal olarak büyümenin regülasyonunda, apoptozisde ve intestinal kök hücrelerin farklılaşmasında rol almakta olup kolorektal kanserin gelişmesinde ve ilerlemesinde etkin olan yollardan biridir. Lin ve arkadaşlarının 2011 tarihli çalışmaları LEF-1 geninin kolorektal kanserde artmış ifadesinin bir örneğini teşkil etmektedir. LEF1/ $\beta$  katenin kompleksinin etkisiyle wnt/ $\beta$  katenin anormal aktivasyonu kanserin ilerlemesi ve karaciğer metastazında etkili olduğu bu çalışmada gösterilmiş olup LEF1 geninin wnt yolağının bir prognostik biyobelirteçi olabileceği ifade edilmektedir (265).

Transkriptom analizleri sonucu yapılan biyoinformatik analiz ve veri madenciliği çalışmaları sonucunda belirlenen yollar ve genler incelendiğinde genel anlamda kanser oluşumunda, proliferasyonunda ve yayılmasında etkili pek çok gen tespit edilmiştir. **Yine bu çalışmada önceden tanımlanmış prognostik, diyagnostik ve terapötik önemi olan pek çok gen tespit edilmiş olmakla birlikte; biyobelirteç özellikleri spesifik olarak çalışılmamış pek çok gen (PIK3CG, GADD45B, LEF1, INHBA...) bulunmaktadır. Böylece biyobelirteç ve tedavi hedefi olma yönündeki genlerin seçilmesine yönelik literatüre de önemli katkılar sağlanmıştır. Bu noktada çalışma ortaya koyduğu sonuçlarla yeni çalışmaların da önünü açmıştır. Çalışmadan çıkan sonuçlarla moleküler biyobelirteç veya terapötik hedef olacak moleküllere yönelik spesifik çalışmalar gerçekleştirilebileceği gibi çalışmada tanımlanan henüz kolorektal kanserde hiç çalışılmamış ya da çok az çalışılmış ve karakterize edilmemiş bir çok genin araştırılması moleküler mekanizmaya ait önemli bilgiler çıkmasını sağlayabilir.**

#### 6.1.2.2.Kolorektal kanserde grade'ler arası global gen ifade profili

**Sonuç: *Kolorektal kanser grade II ve III arasında farklı bir gen ifade profili tanımlanmış olup daha agresif fenotipe giden süreçte önemli fakörler tespit edilmiştir.***

Tez çalışması kapsamında bu başlık altında toplamda 6 karşılaştırma gerçekleştirilmiştir. Bu karşılaştırmalardan ilkinde tümör örneklerinde grade'ler arasında gerçekleştirilmiş olup; tümör hücrelerinin farklılaşma derecelerine göre ve daha agresif fenotipe giden yolda bir gen ifade profil imzasının taşıyıp taşımadığı sorgulanmıştır. İkinci karşılaştırma grubunda ise her bir tümör grade hasta grubu eşli normal örnekleri (örneğin tümör grade II

vs normal grade II) ile karşılaştırılmış olup herbir farklılaşmada normal hücrelere göre nasıl bir gen ifade paterni oluştuğu tek tek sorgulanmış ve ardından kollektif değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 2 ayrı başlık altında sunulmuştur.

#### **6.1.2.2.1. Tümör örneklerinde grade'ler arası gen ifade profili**

Çalışma kapsamında aşağıdaki karşılaştırmalar çerçevesinde değerlendirme gerçekleştirilmiş olup; **gen ifade paternlerine göre kolorektal kanser grade'lere ayrılabilir mi** sorusunun cevabı aranmıştır.

Tümör grade II- tümör grade I

Tümör grade III- tümör grade I

Tümör grade III- tümör grade II

Bu karşılaştırmalar sonucunda 2 kat ve  $p < 0.05$  istatistiksel anlamlılıkta Grade II vs Grade I karşılaştırmasında 8 gen, Grade III-Grade I karşılaştırmasında 14 gen ve Grade III-Grade II karşılaştırmasında 153 gen farklı olarak ifade edilmiştir (Çizelge 5.17). Bu karşılaştırmalara ait hiyerarşik kümeleme analizlerinde ise sadece grade III ve grade II örnekleri gen ifade paternlerine göre 2 ayrı gruba ayrılabilmiştir. Bu durum diğer karşılaştırmaların bu anlamda önemini yitirmesine sebep olmuştur. Bu sonucun doğmasında grade I grubundaki hasta sayısının yetersiz olması önemli bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Daha fazla sayıdaki hasta grubu ile gerçekleştirilecek bir karşılaştırmada farklı bir görüntü elde edilebilir. Bu sonuçlar çerçevesinde tez çalışması kapsamında sadece tümör grade III-tümör grade II karşılaştırması değerlendirilmiştir.

Grade III örneklerinde grade II örneklerine göre 2 kat değişim gösteren 153 genin ifade paterni ile bu 2 grup birbirinden ayrılabilmiştir. Farklı ifade edilen bu 153 genin 24'ünün ifadesinde artma gözlenirken 129'unun ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Bu farklı ifade edilen gen listesi ile gerçekleştirilen fonksiyonel anotasyon, zenginleşme, yolak analizlerinde bereber hareket eden ve bu hikayenin genel resmini çizebilecek bir zenginleşme olmamıştır. Gen ontoloji analizlerinde ise farklı ifade edilen bu gen listesinde ifadesinde artma görülen genlerin hücre döngüsü, MAPK kaskadı, transkripsiyonu düzenlenmesi, apoptotik proses, fosfolipid metabolizması gibi "GO" biyolojik proses

terimlerinde yer aldığı; ifadesinde azalma görülen genlerin ise sinyal transdüksiyonu, çeşitli metabolik prosesler, transport, hücre adezyonu, transkripsiyonun düzenlenmesi gibi çeşitli terimlerde toplandığı görülmektedir. Yine bu biyolojik proses terimleri kolorektal kanserde karşımıza çıkmaktadır (200). Kolorektal kanserde farklılaşmanın derecelendirilmesinde gen ifade profilinin değeri henüz ortaya konmamıştır. Ancak bazı kanser türlerinde grade'ler arası gen ifade profil farkı tespit edilmiş ve karsinogenez sürecine önemli katkılar sunulmuştur. MacDonald ve arkadaşlarının astrositoma örneklerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında 9 genin ifadesinin yüksek grade'li tümörlerde bozulmuş olduğu ve bunlar arasından en farklı ifadelenen APOD geninin malign astrositoma oluşumunda kritik bir rol üstlendiğini belirtmektedirler (266). Yine Cui ve arkadaşları mide kanserinde farklı grade'ler arasında toplam 452 genin ifadesinde değişiklik olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada kanser progresyonu ile yakından ilişkili sinyal yolları (wnt, ErbB, NOD-like, PPAR) ve hücre adezyon molekülleri genlerinin ifadelerinin farklılaşmanın derecesi ile korele değiştiği belirtilmektedir. Yine gastrointestinal mukozanın farklılaşma seviyesinin iyi bir belirteci olduğu rapor edilmiş MUC13 geninin ifadesinde değişim saptanmıştır (267). Bu noktada bizimde gen listemizde musin genleri bulunmaktadır. Kolonun luminal yüzeyi glikoproteinlerden oluşan kalın bir mukus tabakası ile oluşmuştur. Bu tabakanın ana karakterleri musin glikoproteinleri olup bu glikoproteinlerin değişmiş gen ifadeleri kolorektal kanserde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Farklı olarak ifade edilen gen listemizde yer alan ve kolorektal kanserde artmış gen ifade profili ile kendini gösteren **MUC2 geni** yaklaşık 6 katlık artış ile ön plana çıkmaktadır. Bernini ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada artmış MUC2 ifadesi metastatik fenotip ile ilişkilendirmiş olup bu gen çalışmalarda ilerlemiş kanser kompozisyonunun bir aday belirteci olarak değerlendirilmektedir (268). Bu noktada çalışmamızda grade III tümör örneklerinde grade II örneklerine göre oldukça yüksek derecede artmış ifade profili çizmiştir. Gerçekleştirilecek validasyon çalışmalarının ardından MUC2 geni ifadesi grade III örneklerini grade II örneklerinden ayırmada kullanılabilir.

Grade III örneklerinde en farklı ifadelenen gen kalsiyum bağımlı lektin super ailesinin bir üyesi olan **REG4** (*regenerating islet-derived family member 4*) genidir. Bu gen EGFR/Akt/aktivatör protein-1 sinyal yolağının potansiyel bir aktivatörü olup; pek çok kanserde artmış ifadesiyle kendini göstermiştir. Genin transkripsiyonel regülasyonuna henüz tam açıklanmıştır. Bu gen Bcl-2, Bcl-x1, survivin apoptozis inhibisyonunda görevli



genlerin ifadesini artırmaktadır (269). Bu gen kolorektal kanserin progresyonunda önemli bir role sahiptir. Yine gen listemizde ifadesinde artma görülen genlerden biri de **JUND proto-onkogenidir**. Bu gen JUN ailesinin bir mensubu olup AP1 transkripsiyon faktörünün bir parçasını oluşturmaktadır. Ayrıca hücreleri p53 bağımlı senes ve apoptozisten koruduğu bilinmektedir. Bu noktada literatürde bu genin ifadesindeki değişimle ilgili kolorektal kanserde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda ifadesinde artma tespit edilen bu proto-onkogen yukarıda ifade edildiği fonksiyonu ile birlikte kanserin ilerlemesinde önemli bir faktör olarak durmakla birlikte yeni çalışmalarla bu genin etkisinin gösterilmesi gerekmektedir.

Bağırsak epitelinde hücre dış yüzeyini artırmak için hücre zarının dışarıya doğru meydana getirdiği mikrovillus yapıları bulunmaktadır. Mikrovilluslarda bulunan villin, aktinleri birbirine bağlayan proteinlerdir. Grade III örneklerinde grade II'ye göre bu genin (VIL-1) ifadesinde azalma olduğu görülmüştür. Yine bu genin ifadesindeki azalma Arongo ve arkadaşları tarafından kötü diferansiye kolorektal kanserin bir özelliği olarak gösterilmiştir (270).

Çalışmamızda, kolorektal karsinogenezde ifadesindeki değişimin anlamı henüz ortaya çıkarılmamış pek çok gen (QPRT, NEBL gibi) ve literatürle uyumsuz bir kaç gen (TDGF1) bulunmaktadır. Bunların validasyonu ve fonksiyonlarına yönelik çalışmalar önemli bilgiler açığa çıkarabilir.

Çalışmamızda gerçekleştirilen bu grade karşılaştırması ile tümör progresyonunda ilerlemiş noktada önemli olabilecek pek çok gen tanımlanmış olup; ilerlemiş kanser fenotipinin bir belirteçi olabilecek potansiyel hedefler gösterilmiştir. Ayrıca tespit edilen bu genlerin validasyonu sonrasında grade III- grade II ayırımında gen ifade düzeylerinin kullanımının önü açılacaktır. Kolorektal kanserde bu yönde bir çalışma yapılmamış olması projenin önemini artırmaktadır. Histolojik derecelendirmenin yetersiz kalabileceği noktarda moleküler derecelendirme bir alternatif teşkil edebilir; ancak bu noktada daha çok çalışma yapılması gerekmektedir.

#### 6.1.2.2.2. Farklı tümör gradeleri ve eşli normal karşılaştırmaları

Bu karşılaştırma grubunda ise her bir tümör grade hasta grubu eşli normal örnekleri (örneğin tümör grade II vs normal grade II) ile karşılaştırılmış olup her bir farklılaşmada normal hücrelere göre nasıl bir gen ifade paterni oluştuğu tek tek sorgulanmış ve ardından kollektif değerlendirme gerçekleştirilmiştir.

Grade I örneklerinin sayısı çok yetersiz olduğu gibi bu karşılaştırma için bir sonuç elde edilememiştir. Grade II ve III tümör örneklerinin eşli normalleri ile karşılaştırmaları sonucunda sırasıyla 2 kat artış/azalış parametresiyle 1097 ve 487 farklı olarak ifade edilen gen tespit edilmiştir ( $p < 0.001$ ) (Çizelge 5.18). Her iki karşılaştırmanın kümeleme analizleri sonucunda örnekler gen ifade profillerine göre tümör ve normal olarak net bir şekilde 2 ayrı gruba ayrılmıştır (Şekil 5.27).

Grade II ve III karşılaştırmalarının bu bölümde birlikte değerlendirilmiş olup aradaki farklar yada ön plana çıkan noktalara dikkat çekilmiştir. İki derecenin normal örneklerine göre karşılaştırmalarında gen ifade analiz sonuçlarını değerlendirdiğimiz ana başlıklar (en farklı ifade edilen genler, ön plana çıkan kromozomlar, zenginleşen anotasyon küme terimleri ve yolaklar gibi) açısından aralarında bir fark saptanmamıştır. Örneğin iki karşılaştırmada da ifadesi artan genler genellikle kanser yolağı, p53 sinyal yolağı, fokal adezyon, hücreler arası matriks reseptör ilişkisi yolaklarında yoğunlaşmışken; hücre döngüsünün grade II karşılaştırmasında gen sayısı açısından ön plana çıkması ve grade III 'de sadece 2 genle temsil edilmesi aynı zamanda metabolizma yolağının yine grade III' de daha ön plana çıkması dikkat çeken bir ayrıntı olmuştur. Kolorektal karsinogenez bir çok farklı genetik değişikliğin dereceli birikiminin işe karıştığı çok adımlı bir süreçtir. Bu değişiklikler prekanseröz lezyonları malign transformasyona yönlendirmektedir (271). Maglietta ve arkadaşlarının kolorektal karsinogenezde transkriptom profil değişikliklerini moleküler yolaklar üzerinden değerlendirdikleri çalışmaları tümörigenezde hangi yolakların bir basamaktan bir sonraki basamağa geçişte etkili olduklarını göstermeleri açısından önemli olup çalışmamızda ortaya çıkan bu görüntüye belli bir seviyede açıklama getirmektedir. Kanser in daha erken aşamaları hücre döngüsündeki kontrol noktalarının aktivasyonu ve temel transmembran sinyal proseslerindeki bozulma ile karakterize olduğunu belirtmektedirler. Daha ileri aşamalarda ise hücre farklılaşmasında etkili

yolaklardaki genlerin ifadelerinde azalma, hücre zarı dinamiklerini yöneten yolakların ve G2>M geçişinin ifadesinde artma gözlenmektedir. Hücre döngüsünde bazı noktalar aktif olmakla birlikte; özellikle tümör geliştirici mikroçevre faktörlerinin ifadesindeki artma ve metabolizma yolağındaki bozulmanın artması (artmış aerobik glikoliz, ksenobiyotik yolakların ifadesinin azalması) invazif aşamanın karakteristik özelliklerindedir (272). Genel anlamda iki ayrı karşılaştırmadaki gen listeleri incelendiğinde bu noktayı destekleyen daha pek çok gen barındırmaktadır. Bir başka deyişle grade II ve III arasında ortak parçalar olmakla birlikte kendilerine ait belli bir gen ifade resmi de taşımaktadırlar. Bu sonuçlar iki karşılaştırmaya ait genevenn analizleri ile de desteklenmektedir.

Bu iki karşılaştırma sonucu daha önce ifade edilen kriterler çerçevesinde gen ifade analizinden ortaya çıkan önemli genlere baktığımızda genel anlamda tümör-kontrol karşılaştırmasında öne çıkan genlerle örtüşmekle birlikte özellikle grade II karşılaştırmasında kanser ilişkili bazı önemli ve farklı genler dikkat çekmektedir. Grade II örneklerinin eşli normal çiftleri ile gerçekleştirilen karşılaştırmada tespit edilip daha önce tümör-kontrol karşılaştırmasında ortaya çıkmayan genler: **MYC, IRAK, LYN, NME1, MSH2 ve PSEN1** dir. İlk 5 genin ifadesinde artma görülürken PSEN1 genin ifadesinde azalma görülmüştür. Grade III karşılaştırmasında ise yine daha önce tespit edilmeyen **PPARD ve NEDD4I** genleri tanımlanmış olup her 2 geninde ifadesi azalmıştır.

**Myc geni** kolorektal kanserle yakın ilişki kurulmuş bir lokusda (8q24.21) yer alan ve hücre proliferasyonunun regülasyonunda görev alan önemli bir onkogendir. Çalışmamız kapsamında pek çok kanser türünde yüksek ifadelenen bu gen sadece Grade II karşılaştırmasında tespit edilmişken Grade III karşılaştırmasında normal örneklerle ifadeinde bir değişim saptanmamıştır. Sikora ve arkadaşlarının bir çalışmasında da bu genin ifadesinin iyi diferansiye kolorektal kanser örneklerinde oldukça yüksek (32 kat) olduğu belirtilirken kötü diferansiye kanser örneklerinde daha az seviyede bir ifade tespit edilmiştir (273). Bu önemli nokta myc genini prognozu belirleyici ve tedaviyi yönlendirici bir ajan haline getirmektedir.

**interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) geni** pek çok kanserde artmış ifadesiyle ve MDS'de terapötik yaklaşım olarak önerildiği noktada kolorektal kanserde çok fazla çalışma yapılmaması bu geni yeni çalışmalara aday göstermektedir (274, 275). Yine

bir viral onkogen homoloğu olan **LYN (v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog)** geninin artmış ifadesi kanserde tanımlanmışken RNA-i aracılı susturulması hücre göçünü ve invazyonuninhibe ettiği gösterilmiştir. Bu özelliği ile yine terapötik yaklaşımlara hedef gösterilmektedir (274, 276).

Grade III karşılaştırmasında tanımlanan **PPARD** geni (Peroxisome proliferator-activated receptor D) PPARailisinin bir üyesidir. Çekirdek hormonu reseptör süper ailesi olan bu moleküllerligandla aktive olan transkripsiyon faktörleridir.PPAR genlerinin metabolik hastalıklardaki önemli etkilerinin yanısıra kanserlede ilişkilendirilmiştir.; Ancak kanserdeki bu ilişkinet değildir; bir başka deyişle kolorektal kanserde ifadesinde azalmada artmadatespit eden çalışmalar mevcuttur. Bazı çalışmalarda hücre çoğalmasını aktive ettiği, apoptozisi inhibe ettiği, VEGF gen ifadesini artırdığı belirtilmişken bazı çalışmalarda aksine apotozisi uyardığı, hücre çoğalmasını inhibe ettiği, terminl farklılaşmayı indüklediği gösterilmiştir. Bu görüntü bu genin önemli bir potansiyele sahip olduğu; ancak gerçek rolünün anlaşılmasında daha çok çalışma yapılması gerektiğine işaret etmektedir (277).

Bu noktada grade II ve III arasında tespit edilen genlerde önemli bir zenginleşme olmazken gen bazında gerçekleştirilen değerlendirmede; bu iki dereceyi moleküler ifadeye göre ayırabilecek faktörlerin varlığı dikkat çekmektedir. Aynı zamanda daha önce tanımlanmış pronozu belirleyici ve tedaviye yön verebilecek aday moleküllerin çalışmamızda da tespiti bu genlerin validasyonuna katkı sağlamıştır.

### **6.1.2.3. Sağ ve sol yerleşimli tümörlerin gen ifade profili**

**Sonuç:***Sol ve sağ yerleşimli tümörlerin gen ifade profillerinde belirli bir patern tanımlanamazken bu tümörlerin eşli normalleriyle karşılaştırmaları kanserin gelişiminde lokalizasyon açısından farklı bir profil sergilediklerini düşündürmüştür.*

Çalışma kapsamında aşağıdaki karşılaştırmalar çerçevesinde değerlendirme gerçekleştirilmiş olup; **gen ifade paternlerine göre kolorektal kanser sağ ve sol yerleşimli olarak ayrılabilir mi** sorusuna cevap aranmıştır. Aynı zamanda hem sol

hem de sağ yerleşimli tümörlerin eşli normallerine göre gen ifadelerindeki değişimin tespiti de ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Tümör Sol Kolon- Tümör Sağ Kolon

Tümör Sol Kolon-Normal Sol Kolon

Tümör Sağ Kolon-Normal Sağ Kolon

Sol ve sağ yerleşimli tümör örnekleri arasında gerçekleştirilen karşılaştırma sonucu 2 kat ve  $p < 0.05$  istatistiksel anlamlılıkta 16 gen farklı olarak ifade edilmiştir. Bu genlerin 2'sinin ifadesi artarken 14 genin ifadesinde azalma görülmüştür (Çizelge 5.20). Bu karşılaştırmaya ait hiyerarşik kümeleme analizlerinde ise tespit edilmiş bu 16 genin ifade paterni ile sol ve sağ yerleşimli kolon örnekleri arasında bir ayırım tespit edilememiştir (Şekil 5.33.). Bu sonucun doğmasında sağ kolon grubundaki hasta sayısının yetersiz olması bir etken olabilir. Daha fazla sayıdaki hasta grubu ile gerçekleştirilecek bir karşılaştırmada farklı bir görüntü elde edilebilir. 16 genlik bu listede yine genlerin ifadesinde dikkat çeken katsayıda bir artış görülmemiştir. Bu genlerin DAVID yazılımındaki değerlendirilmeleri sonucunda da genler anlamlı bir panel oluşturmayıp; fonksiyonel anotasyon kümelerine ayrılmamıştır.

Sol ve sağ yerleşimli tümörlerin eşli normalleri ile gerçekleştirilen analizlerde herbir yerleşim için normal hücrelere göre nasıl bir gen ifade paterni oluştuğu tek tek sorgulanmış ve ardından kollektif değerlendirme gerçekleştirilmiştir.

Sol ve sağ yerleşimli tümör örneklerinin eşli normalleri ile karşılaştırmaları sonucunda sırasıyla 2 kat artış/azalış parametresiyle 900 ve 337 farklı olarak ifade edilen gen tespit edilmiştir (Çizelge 5.21.). Her iki karşılaştırmının kümeleme analizleri sonucunda örnekler gen ifade profillerine göre tümör ve normal olarak net bir şekilde 2 ayrı gruba ayrılmıştır (Şekil 5.34).

Sağ ve sol kolon tümörleri arasında çok fazla çalışma olmamakla birlikte gen ifade farklılığı gösterilmiştir. Bertucci ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 46 gen, Demtroder ve arkadaşlarının çalışmasında 180 ve Komuro ve arkadaşlarının çalışmasında ise 191 genin

farklı olarak ifade edildiği tespit edilmiştir (188, 192, 225, 278). Sol kolon tümörlerinde sıklıkla p53 mutasyonları görülürken sağ kolon tümörlerinde mismatch tamir mekanizmasındaki defektler daha sık olarak görülmektedir. FAP hastalarının neredeyse tamamı sol kolon yerleşimli iken HNPCC hastalarının yaklaşık %70'i sağ kolon yerleşimlidir (278).

Tümör sol, sağ kolon ve eşli normalleri ile gerçekleştirilen karşılaştırmalarda DAVID analizleri sonrasında oluşan gen listesinde görülen yolaklar değerlendirilmiştir ( şekil 5.37. ve 5.38.). İki karşılaştırmada da benzer yolaklar görülmekte olup genel anlamda sinyal yolaklarının varlığı dikkat çekmektedir. Ancak baskın bir şekilde sağ kolonda en ön plana çıkan yolak metabolizmadır ve bu yolaktaki genlerin %90'ının ifadesinde azalma görülmüştür. Bunu fokal adezyon ve ekstraselüler matriks reseptör ilişkisi takip etmiştir. Sol kolon da ise ön plana çıkan yolaklar Kanser yolağı, hücre döngüsü, ekstraselüler matriks reseptör ilişkisi, MAPK sinyal yolağı, p53 ve Wnt sinyal yolağıdır.Örneğin sol kolonda normal hücelere göre hücre döngüsündeki aktivasyon (10 gen) dikkat çekerken sağ kolonda normal hücelere kıyasla sadece 1 genin ifadesinde değişim görülmüştür. Yine sol kolonda kanser yolağı 21 genle dikkat çekerken sağ kolonda normale göre sadece 3 genin ifadesinde değişim gözlenmiştir.Yine sol kolonla ilişkilendirilmiş p53 yolağı (12 gen) çalışmamızdaki karşılaştırmalarda da sol kolonda ön plana çıkan bir yolak olmuştur. Bir diğer örnek apoptozis yolağıdır ki sol kolonda normale göre 8 genin ifadesinde değişim gözlenirken sağ kolonda sadece 2 genin ifadesinde değişim görülmüştür. Bu tablo sol kolon ve sağ kolon tümörleri gelişiminde farklı mekanizmaların olduğunu düşündürmektedir. Her ne kadar sol ve sağ kolon tümörleri arasında anlamlı bir gen ifade değişimi yakalanamadasa farklı lokalize bu tümörlerin eşli normal çiftleri arasında yapılan karşılaştırmalarda sol ve sağ yerleşimli tümörlerin kendilerine ait bir hikayeleri varmış gibi durmaktadır. Daha fazla ve dengeli sayıdaki olgularla gerçekleştirilen bir çalışma bu durumu netleştirecektir.

Tümör sağ kolon-normal sağ kolon karşılaştırmasında daha önceki karşılaştırmalarda ön plana çıkmayan **IL-8 (Interleukin 8) geni** tanımlanmıştır. Yine ifadesindeki 9 katlık artış da dikkat çekmektedir. Bu gen nötrofil kemotaksis ve degranülasyonu yönlendiren bir proinflamatuvar CXC kemokini olup; pek çok sinyal yolağını aktive etmektedir. Artmış IL-8 aktivitesi kanserde proliferasyonun artması, anjiyogenik yanıtın yönlendirilmesi, kanser hücrelerinin göçü gibi pek çok önemli görev ile ilişkilendirilmiştir. Ferri ve arkadaşlarının

2013 tarihli çalışmasında sağ yerleşimli kolorektal kanser vakalarında artmış IL-8 ifadesi erken evre kanser ile ilişkilendirilmiştir (279). Bu ve bizim çalışmamız IL-8 geninin sağ yerleşimli tümörler için bir aday belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Tez çalışmasında sol ve sağ yerleşimli tümör örnekleri arasında değişmiş anlamlı bir gen ifade paterni tanımlanmasa da normal örneklerle gerçekleştirilen karşılaştırma sonuçları önemli bilgiler sunmuştur.

## **6.2.Global Kopya Sayısı Değişiklik Analizi Çalışmaları**

### **6.2.1.DNA izolasyon optimizasyon çalışmaları değerlendirmesi**

*Sonuç: Gerçekleştirilen optimizasyon uygulaması ile FFPE örneklerle enzimsel reaksiyonlarda daha başarılı sonuçlar veren bir protokol sunulmuştur.*

FFPE dokular DNA için en geniş materyal kaynağı olmakla birlikte nükleik asit degradasyonu ve proteinlerle nükleik asitler arasında oluşan çapraz bağlar bu materyali pek çok enzimsel reaksiyon için özellikle de yüksek işlem hacim teknolojiler için uygunsuz kılmaktadır (145, 146). Bunun yanında FFPE dokulardan DNA izolasyonuna ve izole edilen bu DNA'ların kullanımına yönelik optimizasyon çalışmaları bulunmaktadır (280-282). Ancak süreç için özellikle de bu örneklerin yüksek işlem hacimli teknolojilerde kullanımına yönelik ihtiyaçlar devam etmektedir. Bu noktada tez kapsamında mikrodizin gibi bir teknoloji ile çalışılacak olması ve FFPE örneklerin mikrodizinde kullanımına uygun olmadığı göz önünde bulundurulduğunda ana çalışmadan önce en optimal DNA elde edebilmek adına değişik yöntemler ve uygulamalar çerçevesinde optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon uygulamasında 6 farklı içerikli lizis solüsyonu içeren fenol-kloroform metodu (farklı içeriklerin DNA miktar ve kalitesine etkisinin araştırılması) ve iki farklı ticari kit ile izolasyonlar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çapraz bağların enzimsel reaksiyonları etkilediği noktada ısı uygulamasının bu çapraz bağları geri çevirmesi özelliğinden yararlanılarak bu modifikasyon her bir izolasyon metoduna uygulanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonrasında bu uygulamaların DNA miktar ve kalitesine etkisi

incelenmiş olup yine enzimsel reaksiyonlardaki etkisi 2 farklı genin PZR reaksiyonu ile amplifiye edilmesiyle değerlendirilmiştir (Şekil 5.42.). Bu optimizasyonun kapsamı açısından literatürde dengi bulunmamaktadır.

İzolasyonlar sonucunda miktar ve kalite açısından en iyi sonuçları ısı modifikasyonu uygulanmış fenol kloroform yöntemi vermiştir. PZR reaksiyonlarında yine en verimli ürün amplifikasyonu ısı modifikasyonu uygulanmış fenol-kloroform yöntemi vermiştir. Isı modifikasyonunun hemen hemen tüm yöntemlerde başarılı sonuç verdiği gözlenmiştir. Öyle ki normal protokol ile izole edilmiş DNA'larla gerçekleştirilen amplifikasyonun jel görüntüsünde ürüne ait band gözlenmezken ya da çok zayıfken modifikasyon uygulanmış metodla izole edilen DNA'lar ile gerçekleştirilen PZR reaksiyonlarında hiç band gözlenmeyen reaksiyonların dahi dikkat çeken bir verimliliğe ulaştığı görülmektedir.

Gerçekleştirilen optimizasyon uygulaması öncelikle tezde gerçekleştirilecek mikrodizin çalışmalarını kolaylaştırmıştır. Ayrıca bu optimizasyon özellikle de modifikasyon uygulamasının FFPE örneklerden elde edilen DNA'lar ile gerçekleştirilecek çalışmaların önünü açabilmesi açısından önem taşımaktadır.

### **6.2.2. aCGH - kopya sayısı değişiklikleri analiz değerlendirmeleri**

***Sonuç:Sporadik kolorektal kanser vakalarında gerçekleştirilen kopya sayısı değişiklikleri ile kanser başlangıcı ve ilerlemesinde etkin tanımlanmış ve yeni genomik değişiklikler tanımlanmıştır. Karsinogenez sürecinde bu yapısal değişikliklerin yeri ve önemi üzerine literatüre önemli katkı sağlanmıştır.***

Kolorektal kanserde de sıklıkla tanımlanan genomik instabilite genetik değişikliklerin birikiminin bir yansıması olup; klonal yayılmaya yol açan büyüme avantajı sağlamaktadır. Tekrarlayan genetik olayların pek çok önemli geni kapsadığı ve normal epitel hücrelerin malign tümöre neoplastik transformasyonunu tetiklediği bilinmektedir (208). Çok adımlı karsinogeneze bir model olan kolorektal neoplazi kanser başlangıç ve ilerlemesiyle ilgili genetik bir paradigma içermektedir (59). Kopya sayısı değişiklikleri kanser hücrelerinin önemli değişikliklerindedir ve bu paradigmada önemli bir yerde durmaktadır. Pek çok çalışmada kolorektal kanserde yinelenen kayıp ve kazançlar tespit edilmiştir (60-63).



Bununla birlikte bu yapısal değişiklikler hala tam anlaşılmamış olup; çalışmalar ve tartışmalar devam etmektedir.

23 kromozom boyunca analiz edilen kopya sayısı değişiklikleri sonucunda 20.894 adet segment tespit edilmiştir. Bu segmentlerden en az 3 bireyde bulunan amplifikasyon segment sayısı 4632 iken delesyon segment sayısı 4903 dür.

Genlerin kromozomlardaki dağılımında hem amplifiye hem de delesyon bölgeleri genleri en fazla 1 ve 17. kromozomlarda bulunmaktadır.

**En sık (%20) görülen kopya sayısı değişiklikleri: Amplifikasyon :5q15.33, 7p22.3, 8q24.3, 11q13.1, 11q13.3, 9q34.3, 20q13.12, 20q13.13 ve 20q113.33. Delesyon: 6p22.1 ve 17q25.1 dir.**

Kolorektal kanserde gerçekleştirilmiş aCGH çalışmaları ve KSD analizleri değerlendirildiğinde en sık amplifikasyon görülen bölgeler 8q ve 20q kromozom bölgeleri olduğu görülmektedir (66, 203-205). Çalışmamızda da bu bölgelerin %20 sıklıkla amplifiye olduğu görülmekte hatta yine kolorektal kanserde %50'li sıklıklarda amplifiye olan **20q13.33 bölgesi çalışmamızda en sık amplifiye olan bölge (%30)** olarak dikkat çekmektedir. Yine bu bölgedeki amplifikasyon sıklığının adenoma olgularında %10 civarında olduğu oysa karsinoma olgularında %50 hatta %60'lara varan sıklıkla amplifiye olduğu görülmektedir. Bu bölgedeki amplifikasyonun kanserin ilerlemesinde etkin olduğu belirtilmektedir (66). Genel olarak kanserin erken evresinde kromozom 17p ve 18 de kayıplar görülürken, kromozom 8q, 13q ve 20'de kazançlar görülmektedir. Bununla birlikte primer karsinomadan lokal distal metastaza geçişte kromozom 4p ve 8p'de kayıp; kromozom 7p ve 17q'da ise kazanç tespit edilmiştir. Kromozom 4q kaybı ve 1q, 11, 12p, ve 19 kazancı ise kanserin ileri evreleriyle ilişkilendirilmiştir (66, 203, 204, 206). Çalışmamızda üzerinde durulan % 20 sıklıkla amplifiye ve delesyona uğrayan bölgeler içinde daha önce tanımlanmış ve karsinogenez sürecinde katkıları vurgulanmıştır. Tespit edilen 7p22.3, 8q24.3, 20q13.12 ve 20q13.33 bölgeleri daha önce tanımlanmış KSD bölgeleridir. **Bununla birlikte 11q13.1, 11q13.3, 20q13.13, 5p15.33 ve 9q34.3 amplifikasyonları; 17q25.1, 6p22.1 delesyonları ilk defa çalışmamızda tanımlanmış yeni KSD bölgeleridir.**

Çalışmamızda da amplifiye olan 8q24.3 bölgesi Nakao ve arkadaşları tarafından lenf nod metastazı ile ilişkilendirilmiştir (283). Analiz sonucunda %20 sıklıkla amplifiye olan bu bölgede 46 genin varlığı tanımlanmıştır. **Bu tarz çalışmalarda ileri analizlere aday bölgeler daha çok değişiklik bölgesinin görülme sıklığı ve alanın gen yoğunluğu açısından öne çıkan lokuslardan seçilmektedir.** 8q24.3 bölgesi bu anlamda aday lokuslardan birisidir. Bu yer alan genlerden **HSF-1 (Heat Shock Transcription Factor 1)** ısı şoku stress sinyal yolağını indüklemekte ve sporadik kolorektal karsinogenezde önemli rol oynamaktadır (284). Bu bölgede yer alan bir diğer gen **MAPK 15(ERK8)**'dir. ERK genleri MAPK'ların bir alt ailesi olup; hücre büyümesi ve farklılaşmasını etkilemektedir. Bu gen MAPK ailesinin yeni bir üyesi olup src bağımlı sinyal yolu ile aktive olmaktadır (285). Bu gen ile ilgili kolorektal kanserde yapılmış bir çalışma bulunmamakla beraber dahil olduğu ailenin etkisiyle önemli roller olabileceği şüphesi uyandırmaktadır. Aynı şekilde bu bölge üzerinde yer alan genlerin çoğu ile ilgili çalışma ve bilgi eksikliği bulunmaktadır. Bu genlerin işlevlerinin ortaya çıkması karsinogenezde önemli olabilecek çok önemli bilgiler açığa çıkarabilir. 8q24.3'de dikkat çeken bir diğer gen **BOP1 (Block Of Proliferation 1) dir.** PES1-BOP1 kompleksinin bir üyesi olan BOP1, ribozom biyogenezinden ve hücre döngüsünün kontrolünden sorumludur. Killian arkadaşları BOP1 geninin denetimsiz regülasyonunun kolorektal kanserde kromozom segmentasyonunda değişme ve kromozomal instabiliteye yol açtığını belirtmişlerdir. Myc onkogenine lokalizasyon olarak çok yakın olan bu genin artmış dozajının ise myc'ten tamamen bağımsız olduğu hatta ifadesindeki artmanın myc geninden daha sık olduğu ifade edilmektedir (286). Bu özelliği BOP1 geninin kolorektal kanserde 8q24 amplifikasyonunun temel onkogenik bir sonucu olduğu vurgulanmaktadır. Bir başka çalışmada Lips ve arkadaşları rektal kanserde 8q amplifikasyonu ve BOP1'in artmış ifadesini kromozomal instabilite ile ilişkilendirmişlerdir (287). Yine karaciğer kanserinde gerçekleştirilen bir çalışmada yayılma ve hücre göçünde bu genin etkin rol üstlendiği belirtilmekte ve onkogenik rolünden bahsedilmektedir (288). Kolorektal kanserde bu gen ile sadece 2 çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda da sık amplifiye olan bir bölgede belirlenmiş ve onkogenliğe aday olan bu genin kolorektal kanserogenezdeki etkisi önemli sonuçlar ortaya koyabilir.

Çalışmamızda en sık amplifiye olan bölge 20q13.33 olup bu bölgede 26 gen bulunmaktadır. Bu bölgede bulunan antiapoptotikgen **Livin (BIRC7)** tümör ilerlemesi ve kötü prognozla ilişkili olup; kolorektal kanserde biyolojik fonksiyonu ve ifadesi üzerine

sınırlı bilgi bulunmaktadır. Ding ve arkadaşlarının 2013 tarihli çalışmasında da bu genin kolorektal kanserin tedavisindeki potansiyelinin altı çizilmiştir (289).

Yine gen yoyunluğu ile dikkat çeken 20q13.2 amplifikasyon bölgesinde yer alan **TP53RK (TP53-regulating kinase)** enzimi p53'ü Ser15 bölgesinden fosforilleyen bir serin/treonin protein kinazdır. Meme kanserinde ve osteosarkomada ifadesinde artma tespit edilen bu gen için Peterson ve arkadaşları TP53RK ekspresyon seviyesinin taksanlar gibi anti-mitotik ajanlara yanıtın tahmininde kullanılabileceğini belirtmektedirler. Bu çalışmada TP53RK inhibe edildiğinde anti-mitotik ajanlar varlığında Kaspaz3/7 aktivitesini arttığı gösterilmiştir. Sonuç olarak bu genin inhibisyonunun kanser hücrelerini Taksanlar gibi anti-mitotik ajanlara daha duyarlı kıldığı tanımlanmış ve TP53RK'nın bu özelliği ile potansiyel bir tedavi hedefi olabileceği vurgulanmıştır (290).

Bu çalışmada %20 sıklıkla delesyona uğrayan 2 bölge tespit edilmiş olup bu değişiklikler daha önce kolorektal kanserde rapor edilmemiştir. 17q25.1, 6p22.1 delesyon bölgeleri sırasıyla 59 ve 58 gen içermekle birlikte tespit ettiğimiz diğer bölgeler gibi henüz karakterize edilmemiş genler içermektedir. Bu bölgedeki genler tarandığında çok önemli bir kısmı kolorektal kanserde ya da kanserde çalışılmamış genler olduğu görülmektedir. Bu değişiklikler ve gen içerikleri yeni çalışmalara yeni konu başlıkları yaratabilir.

Sonuç olarak çalışmamız kapsamında **yeni ve daha önce tanımlanmış** amplifikasyon ve delesyon bölgeleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada rapor edilen bölgelerin kolorektal karsinogenez sürecinde önemli rolleri olduğu gösterilmiş olup gen içerikleri açısından özellikle amplifikasyon bölgelerinde bu süreçte çok önemli roller üstlenen genler tespit edilmiştir. BOP1 geni gibi onkogenik özelliği olan genlerin tespiti ya da TP53RK ve livin gibi potansiyel tedavi hedefi olan genlerin tespiti önemli bulgular arasında yer almaktadır. Ayrıca bu çalışmada rapor edilen delesyon bölgelerinin daha önce rapor edilmemesi ve henüz çalışma yapılmayan pek çok geni barındırması yeni çalışmaların da önünü açacaktır.

### 6.3. Sporadik kolorektal kanserde genomik ve transkriptomik profilin entegrasyon değerlendirmeleri

**Sonuç:***Gerçekleştirilen entegrasyon analizi sonucunda kolorektal kanserde sık amplifikasyon görülen 2 bölgede potansiyel biyobelirteç ve terapötik hedef olabilecek genler tespit edilmiştir. Ayrıca kopya sayısı değişikliklerinden etkilenmiş ve gen ifade profili analizinde de ön plana çıkmış 3 gen (VEGF, GADD45B, PLA2G2A) analizin ön plana çıkmış sonucudur.*

Kolorektal kanser her ne kadar iyi modellenmiş ve çok önemli bilgilerin üretildiği bir kanser türü olsa da heterojen, çok fonksiyonlu ve çok adımlı yapı tüm parçaları yerine koyulmadan genel resmin ne olduğu anlaşılmayan bir yapboz profili sergilemektedir. Genel resmin çözümüne giden yolda herbir parçanın kendine ait hikayesinin ve büyük resimdeki yerinin ve de diğer parçalarla ilişkisinin saptanması çok önemlidir (25, 26, 66). Bu noktada omik yaklaşımlar ve bu yaklaşımların kendi içlerinde kombinlenmesi ile gerçekleştirilen çalışmalar bu karmaşık hikayenin çözümünde etkili uygulamalar olarak önem kazanmaktadır. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen genomik ve transkriptomik profilin entegrasyonu bu alana önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Entegrasyon analizinde bir kromozom bölgesinde hangi kopya sayısı değişikliklerinin hangi genlerin ekspresyon seviyelerini etkilediği tespit edilmiştir.. Daha sonra aynı yönde değişiklik (gain-up regulation/loss-down regulation) gösteren gen ifade değişimleri ve kopya sayısı değişiklikleri belirlenmiştir.

Ana kopya sayısı değişiklikleri ile gerçekleştirilen entegrasyon sonucunda (Çizelge 5.37) toplamda 364 bölgede gen ifade verisi ile entegrasyon saptanmış olup bu 364 bölgede farklı ifade edilen genlerin ~%65'inin kopya sayısı değişimlerinden etkilendiği gösterilmiştir.

%20 sıklıkla görülen kopya sayısı değişiklik bölgeleri ile gen ekspresyon verisinin entegrasyonunda kazanç bölgelerinde kopya sayısı değişimleri ve gen ifade verisinin ilişkili olduğu 31 bölge bulunurken bu bölgelerin 35 geni kapsadığı gözlenmiştir. Kayıp bölgelerinde ise entegre olan 38 bölge saptanmış olup bu bölgelerin 44 geni içerdiği görülmüştür. **Toplamda 79 gen %20 sıklıkla görülen kopya sayısı değişikliklerinden etkilenmiştir.** Entegre olan amplifikasyon ve delesyon bölgeleri genel anlamda ana bandlar bazında kolorektal kanserde sık kazanım ve kayıp görülen bölgeler olmakla birlikte daha spesifik lokalizasyon seviyesinde delesyon bölgeleri açısından en sık karşılaşılan kayıp bölgelerinden (66, 203-205) bazıları elemine olmuştur. Literatürde de kolorektal kanserde ön plan çıkan 8q ve 20q amplifikasyonları entegrasyon aşamasında da varlığını korumuştur. 8q bölgesinde 3 gen (SULF1, RIPK2, LAPTM4B), 20q amplifikasyon bölgesinde ise 2 gen (PHF20, CSE1L) bulunmaktadır.

8q13.2 bölgesinde yer alan ve yaklaşık 7 katlık ifade artışıyla ön plana çıkan **SULF1 (Sulfatase 1)** geni pek çok kanser tipinde yüksek ekspresyon seviyesiyle dikkat çekmektedir. Heparan sülfatlar heparin bağlayan büyüme faktörü ve sitokinlerin ko-reseptörü olup pek çok sinyal iletim sisteminde devreye girmektedirler. SULF1 ve SULF2 gibi endosülfatazlar heparan sülfatların spesifik 6-O sülfat gruplarına etki ederek sinyal iletim prosesini yönlendirirler. SULF1 pek çok kanser türünde artmış ifade profili sergilemekte olup kanserin ilerlemesi ve prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca anti-kanser tedavisinde önemli bir potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir (291). Kolorektal kanserdeki rolüne dair çok fazla çalışma bulunmamakta; ama karsinogenezde önemli bir etkiye sahip gibi durmaktadır. Bu da geni, yeni çalışmalar için hedef noktasına koymaktadır.

8q21.3 bölgesinde yer alan 5 katlık ifade artışına sahip **RIPK2 (Receptor-Interacting Serine-Threonine Kinase 2)** geni ile yine kolorektal karsinogenezde çok fazla çalışma bulunmamakla beraber bazı kanser türlerinde ifadesindeki artış gösterilmiş olup; bu genin susturulması ve etkilediği moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur ve önemli sonuçlar ortaya koymuştur. Yine böyle bir çalışmada Ehlers ve arkadaşları RIPK2'nin iskelet myoblastlarının anormal büyümesi ve farklılaşmasıyla ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (292).

8q amplifikasyon bölgesinde yer alan son gen **LABTM4B (lysosomal protein transmembrane 4 beta)** olup; kolorektal kanserle ilişkisi gösterilmiş 2 çalışma bulunmaktadır. Cheng ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada bu gendeki polimorfizmin kolorektal kanserin gelişiminde potansiyel bir risk faktörü olduğu gösterilmiş olup diğer çalışmada ise bu genin ifadesindeki artışın kolorektal kanser prognozunda bağımsız bir faktör olduğu ve potansiyel bir biyobelirteç olduğu ifade edilmektedir (293, 294).

**PHD finger protein 20 (PHF20)** geni 20q11.22 amplifikasyon bölgesinde yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. İlk defa gliyoma vakalarında tespit edilmiştir. Kanser gelişiminde rolü bulunan bu genle ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Bu genin protein kinaz B'nin yeni bir substratı olduğu ve PKB aracılı fosforilasyonu, p53 aracılı sinyalin düzenlenmesi yoluyla tümörigeneze katkıda bulunduğu düşünülmektedir (295).

**CSE1L (cellular apoptosis susceptibility)** 20 q amplifikasyon bölgesinde yer alan bir diğer gendir. Bu genin hücre döngüsünde iğ ipkikleri kontrol noktası, çoğalma, apoptozis gibi çoklu hücre sel mekanizmaların düzenlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir. .Lentivirüs bazlı RNAi yaklaşımı ile bu genin ekspresyonunun inhibisyonu kolorektal kanserde hücre döngüsünün G2/M geçişinde ve S fazında durdurulmasını sağlamış dolayısıyla çoğalma üzerinde etkisi olmuştur. Ayrıca apoptoz indüklenmiş ve koloni büyüme kapaaitesi azalmıştır. Sonuç olarak Zhu ve arkadaşları tarafından bu genin susturulmasının kolorektal kanserde potansiyel bir terapötik yaklaşım olabileceği ifade edilmiştir (296). Yine bu genin apoptoz, hücre göçü ve invazyonda etkili olduğu bir başka çalışmada da gösterilmiştir (297).

**Gen ifade verisi analizinde ortaya konan kriterler açısından öne çıkan genler içinden VEGFA, GADD45B ve PLA2G2A genleri aynı zamanda entegrasyon analizi sonucunda %20 sıklıkla görülen kopya sayısı değişimlerinden de etkilendiği görülmüştür.** VEGFA ve GADD45 genin ifadesinde artma gözlenirken PLA2G2A geninin ifadesinde ise azalma görülmüştür. **Bu 3 gen tez çalışmasının ön plana çıkan en önemli sonuçlarından biridir.**

Tümör hücreleri büyürken besinlere, oksijene ve yeni damarlara ihtiyaç duymaktadır ki bu noktada anjiyogenez süreci devreye girmektedir. Anjiyogenez tümör ve stroma hücrelerinden anjigenik faktörlerin salınımına bağlı olan karmaşık bir süreçtir. **VEGF geni** en büyük pro-anjiyogenik faktör olarak düşünülmektedir. Bu genin ifadesi, tümörün etrafında yeni damar oluşumu indüklenmekte ve tümörün ekspanansiyal büyümesine aracılık etmektedir. Pek çok kanserde olduğu gibi VEGF genin artmış ifadesi kolorektal kanserin moleküler mekanizmasında önemli bir yerde olup sahip olduğu potansiyel bu geni anti-kanser yaklaşımların hedefi yapmıştır. Bevacizumab (Avastin) VEGF inhibisyonunda kullanılan bir monoclonal antikor olup kanser tedavisinde anti-anjiyogenik ajan olarak tanımlanmıştır aynı zamanda lisanslı tek üründür (263, 264). VEGF üzerine çalışmalar devam etmektedir.

**GADD45B (Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible, Beta)**gen ailesinin bir üyesi olup hücre büyümesinin kontrolü, apoptozisve DNA tamiri mekanizmaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İlk kez fare myeloid lösemi hücre hatlarında IL-6 tarafından aktive edilmiş myeloid farklılaşmasına primer yanıt olarak tanımlanmış olup son çalışmalar bu genin karaciğer kanseri ve gonadotrop tümörlerinde karsinogenez sürecinde önemli rolleri olduğunu göstermiştir (298,299). Kolorektal kanserde ise yeterli çalışma bulunmamaktadır. Wang ve arkadaşlarının kolorektal kanserde bu genin anormal ifadesini gösterdikleri çalışmalarında da bu genin ifadesi ve işlevi arasında bir paradoks yaşandığını belirtmektedirler. Bu çalışmada normal hücrelerde bu genin bir tümör baskılayıcı gen gibi davrandığı ve apoptozisi indüklediği; ancak kolorektal kanserde ifadesinin yükselmiş olduğu belirtilmekte ve kolorektal tümörigenezisde hesaba kalmayan bir rolünün olduğu ifade edilmektedir (244). Birkaç kanser türünde ise bu gen azalmış ifadesiyle dikkat çekmektedir (299). Bu durum genin daha kapsamlı bir şekilde fonksiyonel ve fizyolojik olarak çalışılması gerektiğini göstermektedir.

**PLA2G2A (Phospholipase A2, Group IIA)** pek çok tümörde önemli rolü olan bu gen PLA2 gen ailesinin bir üyesidir. Anti-bakteriyel savunma, inflamasyon ve eikosanoid oluşumunda görevli bu genin apoptozis ve wnt sinyal yolağında da rolleri olduğu belirtilmektedir. Bu genin fonksiyonları ve gen ifadesi üzerinde yine tartışmalı çalışmalar devam etmektedir. Klasik bir tümör baskılayıcı ya da onkogen gibi davranmadığı ifade edilmekte ve tümör gelişiminde fonksiyonlarının aydınlatılması ile genel mekanizmaya

yeni bir ışık tutacağı vurgulanmaktadır (300). İlk defa farede etkisi gösterilen bu genle ilgili olarak kromozomal delesyon saptanmıştır. Daha sonra ise APC indüklü tümörigenezi farelerde baskıladığı gösterilmiştir. Lee ve arkadaşlarının çalışmalarında ifadesinde azalma saptanırken; bir başka çalışmada proapoptotik etkisi gösterilmiştir (301, 302). Bu gen üzerindeki tartışmalara bizim çalışma sonucumuzda katılacak gibi görünüyor. Delesyon bölgesinde yer alan bu genin aynı zamanda ifadesinde de 4 katlık bir azalma olduğu görülmüştür. Bununla birlikte bu genin ifadesinin eş-zamanlı PZR ile valide edilmesi sonuca netlik kazandıracaktır.

Yine delesyon değişimlerinden etkilenmiş CLCA4, GUCA2A, PLA2G2A, SLC26A2, MUC12, KLF4, GCNT3 genleri oldukça düşük gen ifade düzeyleri ile dikkat çekerken amplifikasyon değişimlerinden etkilenmiş MFAP2, COL1A2, SULF1, RIPK2, H19 ve CST4 genleri de oldukça yüksek ifade düzeyleri ile öne çıkmaktadırlar.

Genomik ve gen ifade verilerinin entegrasyonu ayrı ayrı etkilerinin yanında iki verinin korele olduğu gen veya gen gruplarının tanımlanması ile tümörigenezis, yeni onkogen veya tümör baskılayıcı gen tanımlama, kanser altgrupları oluşturma gibi pek çok kapsamda elde edilen önemli veriler ışığında değerlendirme yapma imkanı yaratmaktadır. Bununla birlikte DNA ve RNA seviyesinde genetik imza analizi tek başlarına değerlendirilmelerinden çok daha kuvvetli bir moleküler şemanın oluşturulması ile sonuçlanacaktır (11, 66). Bu noktadan yola çıkarak gerçekleştirdiğimiz sporadik kolorektal kanserde genomik ve transkriptomik entegrasyon çalışmasında iki kapsamlı verinin işaret ettiği ortak faktörler tanımlanmış ve kolorektal kanserdeki ilişkisi üzerine değerlendirmeler sunulmuştur. Çalışma sonucunda kolorektal kanserde sıklıkla amplifiye olan gen bölgeleri bizimde sonuçlarımız arasında yer almakta olup; bu bölgede kanserle ilişkili genler bulunmaktadır. Ancak bu genlerin kolorektal karsinogenezdeki rollerinin netlik kazanması adına yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bir önemli noktada tespit edilen bu genlerin biyobelirteç ve tedavi hedefi olma yönünde önemli potansiyellerinin olmasıdır (CSE1L, LABTM4B gibi). Ayrıca %20 sıklıkla kopya sayısı değişikliği ile karakterize olan ve gen ifade analiz çalışmalarında değerlendirmeler sonucunda ön plan çıkan genlerden VEGF, GADD45B ve PLA2G2A entegrasyonun önemli bir çıktısı görüntüsündedir. Terapötik yaklaşımların hedefinde olan VEGF nin yanında etkileri henüz tam ortaya çıkarılmayan ve



tartışmaların devam ettiği diğer 2 gen ise yeni çalışmaların ortaya çıkmasına katkı yapacaktır.

## 7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sık görülmesi ve mortalitesinin yüksek olması bakımından dünyanın en önemli halk sağlığı sorunlarının başında gelen kanser bir seri histopatolojik evre ile ilerlemektedir ve bu ilerlemenin arkasında genetik değişiklikler ve gen ifade patern değişiklikleri önemli bir itici güç olarak durmaktadır. Dünya genelinde en yaygın görülen kanserlerden biri olan kolorektal kanser, ölüm sebepli kanserler arasında ikinci sırada yer almakta olup vakaların çok önemli bir bölümü sporadik profildedir. Çok adımlı karsinogeneze iyi bir model oluşturmakla birlikte hücresel, genetik ve moleküler seviyede sahip olduğu heterojen ve karmaşık yapı bir paradigma oluşturmaktadır. Kolorektal kanser üzerine günümüze kadar çok önemli çalışmalara imza atılmış olsa da kanserin oluşumu, ilerlemesi ve yayılmasına ait pek çok soru barındırmaktadır. Bu soruların cevaplarına katkıda bulunmak adına gerçekleştirdiğimiz çalışma sporadik kolorektal kanserde yüksek çözünürlüklü genomik ve transkriptomik yaklaşımların kollektif uygulaması olup aşağıdaki sonuçları ortaya koymuştur.

1. *Deparaffinizasyondan mikrodizine kadar FFPE örnekler için optimize bir akış şeması oluşturulmuştur.*

2. *Genom ebadında gen ifade profil analizleri sonucunda tümör ve kontrol arasında 925 genin en az 2 kat değişimle farklı ifadelendiği tespit edilmiştir. Değerlendirmeleri sonucunda kolorektal kanserin gelişiminde ve ilerlemesinde; kanser yolağı, fokal adezyon, hücreler arası matrik-reseptör ilişkisi, p53 sinyal yolağı, MAPK sinyal yolağı, hücre döngüsü, apoptozis, wnt sinyal yolağı ve metabolizma etkin yollar olmuştur.*

3. *Genom ebadında gen ifade analizi sonucunda FN1, THBS2, VEGFA, CCND1, MET, GNAI2, MMP1, BMP4, BCL2L1, CDKN2A, LEF1, RUNX1, CDC25B, GADD45B, CDK1, SOX3, INHBA ve CDK1 genlerinin ifadesinin artması PRKACB, EGFR, MAP2K6, THBS1, BMP2, IL-6R, PKIB ve PRKAG2 genlerinin ifadesinin azalması normal hücrelere göre tümör hücrelerinde anlamlı bulunmuş ve ön plana çıkan genler olmuştur.*

4. *Gen ifade analizi ile tespit edilen genler daha önce tanımlanmış yada üzerinde çok az çalışma olan ve önemli prognostik diyagnostik ve terapötik hedef olma potansiyeline sahiptirler.*
5. *Grade karşılaştırmalarında sadece Grade II ve III gen ifade profillerine göre ayrılmış olup; bu iki dereceyi moleküler ifadeye göre ayırabilecek genler işaret edilmiştir. Aynı zamanda pronozu belirleyici ve tedaviye yön verebilecek daha önce tanımlanmış aday moleküller tespit edilmiştir.*
6. *Tez çalışmasında sol ve sağ yerleşimli tümör örnekleri arasında değişmiş anlamlı bir gen ifade paterni tanımlanamamıştır*
7. *FFPE örneklerden DNA izolasyonu ve PZR reaksiyonunun verimliliğinin artmasını sağlayan bir optimizasyon protokolü sunulmuştur.*
8. *Sporadik kolorektal kanser vakalarında gerçekleştirilen kopya sayısı değişiklikleri ile kanser başlangıcı ve ilerlemesinde etkin tanımlanmış ve yeni genomik değişikliklerin varlığına işaret edilmiştir. Amplifikasyon bölgelerinden 8q24.3'deki BOP1 onkejeni, 20q13.33 BIRC7 geni ve 20q13.2 TP53RK geni ön plana çıkan amplifikasyonlardır.*
9. *Genomik ve transkriptomik verinin entegrasyonu amplifikasyonun sık görüldüğü 8q ve 20q bölgelerinde prognostik ve tedavi açısından önemli genlerin varlığına (CSE1, LABTM4B) işaret etmiş ayrıca 3 genin varlığını ön plana çıkarmıştır (VEGF, PLA2G2A, GADD45B). PLA2G2A ve GADD45B genlerinde çalışma sonuçlarımızda katılacağı ifade düzeylerine ait paradokslar bulunmakta ve daha çok çalışmaya ve validasyona ihtiyaç duyulmaktadır.*
10. *Literatür ile uyumsuzluk gösteren ya da kanserde önemli olabilecek ama kolorektal kanserle ilişkisi netleştirilemeyen genlerin ortaya çıkarılması yeni çalışmaların ve fikirlerin önünü açacaktır.*

Bu çalışmanın ardından sonuçların karakterize edilebilmesi ve netleştirilmesi için ilk olarak gen ifade değişimlerinin ve kopya sayısı değişimlerinin eş-zamanlı PCR ile validasyonunun gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Literatür ile uyumsuzluk gösteren gen ifade değişimleri ve kopya sayısı değişimleri öncelikle eş-zamanlı PCR ile değerlendirilmeli; sonuçlar uyumlu ise literatürden neden farklı olduğuna yönelik yeni çalışmalar planlanmalıdır.

Kopya sayısı değişiklikleri ile anlamlandırılmayan gen ifade değişikliklerinin etkilenebileceği başka mekanizların bu genler üzerindeki etkisi araştırılmalıdır.

Mikrodizin çalışmalarının sonuçlarının değerlendirilmesinde bir sonraki adım tespit edilen karsinogenezle ilişkili genlerin farklı ve daha çok sayıda vaka ile validasyonu olmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Rhodes DR, Chinnaiyan AM. Integrative analysis of the cancer transcriptome. *Nat Genet.* 2005 May ;37:31-37.
2. Yu U, Lee SH, Kim YJ, Kim S. Bioinformatics in the post-genome era. *J Biochem Mol Biol.* 2004 Jan;37(1):75-82.
3. Velculescu VE. Defining the blueprint of the cancer genome. *Carcinogenesis.* 2008 May;29(6):1087-1091.
4. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001 Feb;291(5507):1304-1351.
5. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001 Mar;409(6822):860-921.
6. Taramelli R, Acquati F. The human genome project and the discovery of genetic determinants of cancer susceptibility. *European journal of cancer.* 2004 Nov;40(17):2537-2543.
7. Scriver CR. After the genome--the phenome? *Journal of inherited metabolic disease.* 2004;27(3):305-317.
8. Naidoo N, Pawitan Y, Soong R, Cooper DN, Ku CS. Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. *Human genomics.* 2011 Oct;5(6):577-622.
9. Keusch GT. What do -omics mean for the science and policy of the nutritional sciences? *The American journal of clinical nutrition.* 2006 Feb;83(2):520S-522S.
10. Debnath M, Bisen, P.S., Godavarthi, B.K.S., Prakash, S. *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities.* 2nd ed. New York: Springer; c2010.508p.
11. William CSC. *An omics perspectives in cancer research.* 8. Edition. New York: Springer; c2010. 269p.
12. Jou M, Haegeman, W., Ysebaert, G., Fiers, W. Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature.* 1972 May;237:82-88.

13. Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977 Feb;265(5596):687-695.
14. Hocquette JF. Where are we in genomics? *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 2005 Jun;56(3):37-70.
15. Del Boccio P, Urbani A. Homo sapiens proteomics: clinical perspectives. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. 2005;41(4):479-482.
16. Kanehisa M, Goto S, Hattori M, et al. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic acids research*. 2006 Jan;1(34): 354-357.
17. Garvey C. A decade and genome of change. *Genome biology*. 2010 May;11(5):120.
18. Lazaridis KN, Juran BD, American Gastroenterological A. American Gastroenterological Association future trends committee report: the application of genomic and proteomic technologies to digestive disease diagnosis and treatment and their likely impact on gastroenterology clinical practice. *Gastroenterology*. 2005 Nov;129(5):1720-1752.
19. Yeatman TJ. The future of cancer management: translating the genome, transcriptome, and proteome. *Annals of surgical oncology*. 2003 Jan-Feb;10(1):7-14.
20. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995 Oct;270(5235):467-470.
21. Pertea M. The Human Transcriptome: An Unfinished Story. *Genes*. 2012 Sep;3(3):344-360.
22. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Oct;102(43):15545-15550.
23. Macgregor PF, Squire JA. Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clinical chemistry*. 2002 Aug;48(8):1170-1177.
24. Bradlow L, Carruba G. Special issue: cancer OMICS. *Omics : a journal of integrative biology*. 2011 Mar;15(3):91-92.

25. Vucic EA, Thu KL, Robison K, et al. Translating cancer 'omics' to improved outcomes. *Genome research*. 2012 Feb;22(2):188-195.
26. Geurts van Kessel A. The 'omics' of cancer. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2010 Nov;203(1):37-42.
27. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, et al. The case for early detection. *Nature reviews. Cancer*. 2003 Apr;3(4):243-252.
28. Oakman C, Santarpia L, Di Leo A. Breast cancer assessment tools and optimizing adjuvant therapy. *Nature reviews. Clinical oncology*. 2010 Dec;7(12):725-732.
29. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology*. 2011 Feb;5(1):5-23.
30. Abraham DJ, Rotella DP. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. 6th Ed. Hoboken, NJ: Wiley; c2003. 1156p.
31. Macdonald F, Ford, CHJ, Casson AG. *Molecular biology of cancer*. 2nd ed. New York: BIOS Scientific; c2004. 269p.
32. Devi PU. Basics of carcinogenesis. *Health Administrator* 17(1): 16-24.
33. Martinez JD, Kimberly MTP, Fultz E, Ignatenko NA, Gerner EW. *Molecular biology of cancer*. 6 th ed. Newyork: Wiley; c2003. 1-32p.
34. Olah E. Basic Concepts Of Cancer:Genomic Determination. *JIFCC*. 2005;16(2).
35. Shortt J, Johnstone RW. Oncogenes in cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Dec;4(12):1-10.
36. Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 1992 Nov;98:13-24.
37. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985 Jun;315(6020):550-4.
38. Knudson AG Jr. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3.

39. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 1997 Apr 24;386(6627):761, 763.
40. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: whfreeman; c2000. 1150p.
41. Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol*. 2003 Jan 31;36(1):60-5.
42. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003 Jun;36(3):131-
43. Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*. 1995 Jul;376(6538):313-20.
44. Weinstein IB, Begemann M, Zhou P, Han EK, Sgambato A, Doki Y, Arber N, Ciaparrone M, Yamamoto H. Disorders in cell circuitry associated with multistage carcinogenesis: exploitable targets for cancer prevention and therapy. *Clin Cancer Res*. 1997 Dec;3(2):2696-702.
45. Han EK, Lim JT, Arber N, Rubin MA, Xing WQ, Weinstein IB. Cyclin D1 expression in human prostate carcinoma cell lines and primary tumors. *Prostate*. 1998 May;35(2):95-101.
46. Sutter T, Doi S, Carnevale KA, Arber N, Weinstein IB. Expression of cyclins D1 and E in human colon adenocarcinomas. *J Med*. 1997;28(5-6):285-309.
47. Leach FS, Elledge SJ, Sherr CJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B. Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Res*. 1993 May ;53(9):1986-9.
48. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Sep;30:87
49. Pucci B, KastenM, and Giordano A. Cell Cycle and Apoptosis. *Neoplasia*. 2000 July; 2(4): 291–299.
50. Alenzi FQB. Links between apoptosis,proliferation and the cell cycle. *British journal of biomedical science*. 2004 Apr; 61 (2):
51. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct;407(6805):770-6.



52. Karp G. Cell and molecular biology: Concepts and experiments. 5th edition. John New Jersey: Wiley and Sons; c2008.864p.
53. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.
54. Lowe SW, Athena WL. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):485-495.
55. Garnis C, Buys TP, Lam WL. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Mol Cancer*. 2004 Mar 22;3:9.
56. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G, Hartwell L. The case for early detection. *Nat Rev Cancer*. 2003 Apr;3(4):243-52.
57. Aguirre AJ, Brennan C, Bailey G, Sinha R, Feng B, Leo C, Zhang Y, Zhang J, Gans JD, Bardeesy N, Cauwels C, Cordon-Cardo C, Redston MS, DePinho RA, Chin L. High-resolution characterization of the pancreatic adenocarcinoma genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun;101(24):9067-72.
58. Pollack JR, Sørli T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Børresen-Dale AL, Brown PO. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct;99(20):12963-8.
59. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
60. Bardi G, Johansson B, Pandis N, Mandahl N, Bak-Jensen E, Lindström C, Törnqvist A, Frederiksen H, Andrén-Sandberg A, Mitelman F, et al. Cytogenetic analysis of 52 colorectal carcinomas--non-random aberration pattern and correlation with pathologic parameters. *Int J Cancer*. 1993 Sep;55(3):422-8.
61. Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schröck E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996 Apr;15(4):234-45.
62. Camps J, Armengol G, del Rey J, Lozano JJ, Vauhkonen H, Prat E, Egozcue J, Sumoy L, Knuutila S, Miró R. Genome-wide differences between microsatellite stable and unstable colorectal tumors. *Carcinogenesis*. 2006 Mar;27(3):419-28.

63. Martin ES, Tonon G, Sinha R, Xiao Y, Feng B, Kimmelman AC, Protopopov A, Ivanova E, Brennan C, Montgomery K, Kucherlapati R, Bailey G, Redston M, Chin L, DePinho RA. Common and distinct genomic events in sporadic colorectal cancer and diverse cancer types. *Cancer Res.* 2007 Nov 15;67(22):10736-43.
64. Menezes RX, Boetzer M, Sieswerda M, van Ommen GJ, Boer JM. Integrated analysis of DNA copy number and gene expression microarray data using gene sets. *BMC Bioinformatics.* 2009 Jun 29;10:203.
65. Tay ST, Leong SH, Yu K, Aggarwal A, Tan SY, Lee CH, Wong K, Visvanathan J, Lim D, Wong WK, Soo KC, Kon OL, Tan P. A combined comparative genomic hybridization and expression microarray analysis of gastric cancer reveals novel molecular subtypes. *Cancer Res.* 2003 Jun 15;63(12):3309-16.
66. Cardoso J, Boer J, Morreau H, Fodde R. Expression and genomic profiling of colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jan;1775(1):103-37.
67. Center for Cancer Research [Internet]. U.S.A: National Cancer Institute; <http://ccr.cancer.gov/staff/staff.asp?profileid=11615>.
68. Menezes RX, Boetzer M, Sieswerda M, van Ommen GJ, Boer JM. Integrated analysis of DNA copy number and gene expression microarray data using gene sets. *BC Bioinformatics.* 2009 Jun;10:203
69. Reich DE, Schaffner SF, Daly MJ, McVean G, Mullikin JC, Higgins JM, et al. Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nature genetics.* 2002;32(1):135-42.
70. Raphael BJ. Structural variation and medical genomics. *PLoS computational biology.* 2012;8(12)
71. Heng HH, Stevens JB, Liu G, Bremer SW, Ye CJ. Imaging genome abnormalities in cancer research. *Cell Chromosome.* 2004 Jan 13;3(1):1.
72. Laia Rodriguez. Structural variation in the human genome: the impact of Copy number variants on clinical diagnosis. *Genet Med* 2007;9(9):600-606.
73. Hurles ME, Dermitzakis ET, Tyler-Smith C. The functional impact of structural variation in humans. *Trends Genet.* 2008 May;24(5):238-45.
74. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006 Feb;7(2):85–97
75. Bridges CB. The Bar 'gene': a duplication. *Science.* 1936; 83:210–211

76. Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet.* 2007 Aug;8(8):639-46.
77. Sharp,A.J., Cheng,Z., and Eichler,E.E. Structural Variation of the Human Genome. *Annu. Genom. Human Genet.* 2006 ;7, 407-442.
78. Kan YW, Dozy AM. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Nov;75(11):5631-5.
79. Wyman AR, White R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Nov;77(11):6754-8.
80. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Biotechnology.* 1992;24:467-72
81. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, et al. ariable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science.* 1987 Mar;235(4796):1616-22.
82. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood.* 2000 Jun 15;95(12):3662-8.
83. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science.* 2004;305(5683):525-8.
84. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature genetics.* 2004;36(9):949-51.
85. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006 Nov;444(7118):444-54.
86. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, Bird CP, de Grassi A, Lee C, Tyler-Smith C, Carter N, Scherer SW, Tavaré S, Deloukas P, Hurles ME, Dermitzakis ET. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science.* 2007 Feb ;315(5813):848-53.
87. McCarroll SA, Altshuler DM. Copy number variation and association studies of human disease. *Nat Genet.* 2007 Jul;39(7 Suppl):S37-42.

88. Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C. Copy number variation new insights in genome diversity. *Genome Res.* 2006 Aug;16(8):949-6.
89. Williams RB, Chan EK, Cowley MJ, Little PF. The influence of genetic variation on gene expression. *Genome Res.* 2007 Dec;17(12):1707-16
90. Rodriguez-Revena L, Mila M, Rosenberg C, Lamb A, Lee C. Structural variation in the human genome: the impact of copy number variants on clinical diagnosis. *Genet Med.* 2007 Sep;9(9):600-6.
91. Yang L, Liu B, Huang B, Deng J, Li H, Yu B, Qiu F, Cheng M, Wang H, Yang R, Yang X, Zhou Y, Lu J. A functional copy number variation in the WWOX gene is associated with lung cancer risk in Chinese. *Hum Mol Genet.* 2013 May ;22(9):1886-94.
92. Li Y, Shaw CA, Sheffer I, Sule N, Powell SZ, Dawson B, Zaidi SN, Bucasas KL, Lupski JR, Wilhelmsen KC, Doody R, Szigeti K. Integrated copy number and gene expression analysis detects a CREB1 association with Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2012 Nov 20;2:e192.
93. Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet.* 1999 Nov 13;354(9191):1676-81.
94. Ionita-Laza I, Rogers AJ, Lange C, Raby BA, Lee C. Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics.* 2009 Jan;93(1):22-6.
95. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005 May;97(9):643-55.
96. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ, Murthy KK, Rovin BH, Bradley W, Clark RA, Anderson SA, O'connell RJ, Agan BK, Ahuja SS, Bologna R, Sen L, Dolan MJ, Ahuja SK. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science.* 2005 Mar;307(5714):1434-40.

97. Park PJ. Experimental design and data analysis for array comparative genomic hybridization. *Cancer Invest.* 2008 Nov;26(9):923-8.
98. Shlien A and Malkin D. Copy number variations and cancer. *Genome Med.* 2009 Jun 16;1(6):62.
99. Frank B, Bermejo JL, Hemminki K, Sutter C, Wappenschmidt B, Meindl A, Kiechle-Bahat M, Bugert P, Schmutzler RK, Bartram CR, Burwinkel B: Copy number variant in the candidate tumor suppressor gene MTUS1 and familial breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 2007 Jul;28(7):1442-5
100. Cheng L, Wang P, Yang S, Yang Y, Zhang Q, Zhang W, Xiao H, Gao H, Zhang Q. Identification of genes with a correlation between copy number and expression in gastric cancer. *BMC Med Genomics.* 2012 May;5:14.
101. Staaf J, Jönsson G, Ringnér M, Baldetorp B, Borg A. Landscape of somatic allelic imbalances and copy number alterations in HER2-amplified breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):R129.
102. Park CH, Rha SY, Jeung HC, Kang SH, Ki DH, Lee WS, Noh SH, Chung HC. Identification of novel gastric cancer-associated CNVs by integrated analysis of microarray. *J Surg Oncol.* 2010 Oct;102(5):454-61.
103. Weir BA, Woo MS, Getz G, Perner S, Ding L, Beroukhi R, Lin WM, Province MA, Kraja A, Johnson LA, Shah K, Sato M, Thomas RK, Barletta JA, Borecki IB, Broderick S, Chang AC, Chiang DY, Chirieac LR, Cho J, Fujii Y, Gazdar AF, Giordano T, Greulich H, Hanna M, Johnson BE, Kris MG, Lash A, Lin L, Lindeman N, Mardis ER, McPherson JD, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature.* 2007 Dec;450(7171):893-8.
104. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1061-8.
105. Henrichsen CN, Chaignat E, Reymond A. Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum Mol Genet.* 2009 Apr;18(R1):R1-8.
106. Patrinos GP, Petersen MB. Copy number variation and genomic alterations in health and disease. *Genome Med.* 2009 Feb 20;1(2):21.
107. Albertson DG, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet.* 2003 Oct;12 (2):145-52.

108. Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet.* 2004 Dec;66(6):488-95.
109. de Ravel TJ, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *Eur J Pediatr.* 2007 Jul;166(7):637-43. Epub 2007 Mar 20. Review.
110. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992 Oct 30;258(5083):818-21.
111. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997 Dec;20(4):399-407.
112. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):207-11.
113. Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, Brakenhoff RH, Meijer GA. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan;34(2):445-50.
114. Lapierre JM, Tachdjian G. Detection of chromosomal abnormalities by comparative genomic hybridization. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005 Apr;(2):171-7.
115. Bejjani BA, Shaffer LG. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *Mol Diagn.* 2006 Nov;8(5):528-33.
116. Lindblad-Toh K, Tanenbaum DM, Daly MJ, Winchester E, Lui WO, Villapakkam A, Stanton SE, Larsson C, Hudson TJ, Johnson BE, Lander ES, Meyerson M. Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol.* 2000 Sep;18(9):1001-5.
117. Rubin MA, Varambally S, Beroukhim R, Tomlins SA, Rhodes DR, Paris PL, Hofer MD, Storz-Schweizer M, Kuefer R, Fletcher JA, Hsi BL, Byrne JA, Pienta KJ, Collins C, Sellers WR, Chinnaiyan AM. Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer. *Cancer Res.* 2004 Jun ;64(11):3814-22.

118. Lassmann S, Weis R, Makowiec F, Roth J, Danciu M, Hopt U, Werner M. Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and tumor suppressor genes in chromosomal- and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas. *J Mol Med (Berl)*. 2007 Mar;85(3):293-304.
119. Paris PL, Sridharan S, Scheffer A, Tsalenko A, Bruhn L, Collins C. High resolution oligonucleotide CGH using DNA from archived prostate tissue. *Prostate*. 2007 Sep 15;67(13):1447-55.
120. Park JT, Li M, Nakayama K, Mao TL, Davidson B, Zhang Z, Kurman RJ, Eberhart CG, Shih IeM, Wang TL. Notch3 gene amplification in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2006 Jun 15;66(12):6312-8.
121. MDAndersoncancercenter [Internet]. Houston. [http://bioinformatics.mdanderson.org/MicroarrayCourse/Lectures09/snp1\\_bw.pdf](http://bioinformatics.mdanderson.org/MicroarrayCourse/Lectures09/snp1_bw.pdf)
122. Carvalho B, Irizarry RA, Scharpf RB, Carey VJ. Processing and Analyzing Affymetrix SNP Chips with Bioconductor. *Stat Biosc*. 2009;1:160-80
123. Olshen, A.B., Venkatraman, E.S., Lucito, R., and Wigler, M. (2004). Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostat* 5, 557-572.
124. Tuefferd M, de Bondt A, Van den Wyngaert I, Talloen W, Göhlmann H. Microarray profiling of DNA extracted from FFPE tissues using SNP 6.0 Affymetrix platform. *Methods Mol Biol*. 2011;724:147-60.
125. Johnson NA, Hamoudi RA, Ichimura K, Liu L, Pearson DM, Collins VP, Du MQ. Application of array CGH on archival formalin- Wxed paraYn-embedded tissues including small numbers of microdissected cells. *Lab Invest* 2006; 86(9):968–978.
126. Lips EH, Dierssen JW, van Eijk R, Oosting J, Eilers PH, Tollenaar RA, de Graaf EJ, van't Slot R, Wijmenga C, Morreau H, van Wezel T. Reliable high-throughput genotyping and loss-of-heterozygosity detection in formalin-Wxed, paraYn-embedded tumors using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res*. 2005;65(22):10188–10191.
127. Oosting J, Lips EH, van Eijk R, Eilers PH, Szuhai K, Wijmenga C, Morreau H, van Wezel T. High-resolution copy number analysis of paraffin-embedded archival tissue using SNP BeadArrays. *Genome Res*. 2007;17(3):368–376.
128. Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, Yamamoto G, Pillai R, Ogawa S, Bailey DK, Campbell IG. Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of

- heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer Res.* 2007;67(6):2544–2551.
129. Macgregor PF, Squire JA. Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin Chem.* 2002 Aug;48(8):1170-7.
  130. Cowell JK, Hawthorn L. The application of microarray technology to the analysis of the cancer genome. *Curr Mol Med.* 2007 Feb;7(1):103-20.
  131. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology.* 1975;98(3):503-17.
  132. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science.* 1991 Feb ;251(4995):767-73.
  133. Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature.* 1993 Aug;364(6437):555-6.
  134. Olson NE. The microarray data analysis process: from raw data to biological significance. *NeuroRx.* 2006 Jul;3(3):373-83.
  135. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 2003 Feb;31(4):e15.
  136. Russell S, Meadows, LA, Russell, RR. *Microarray Technology in Practice.* Russell S, Meadows, LA., Russell, RR., editor. Cambridge, UK.: Academic Press; 2009.
  137. Giorgi FM, Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Algorithm-driven artifacts in median Polish summarization of microarray data. *BMC Bioinformatics.* 2010 Nov 11;11:553.
  138. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537.
  139. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 2000 Feb;403(6769):503-11.
  140. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, Gaasenbeek M, Angelo M, Reich M, Pinkus GS, Ray TS, Koval MA, Last KW, Norton A, Lister



- TA, Mesirov J, Neuberger DS, Lander ES, Aster JC, Golub TR. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*. 2002 Jan;8(1):13-4.
141. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan;415(6871):530-6.
142. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003 Jun;101(12):4944-51.
143. Genomeweb [Internet]. New York: Genomeweb; <http://www.genomeweb.com/dxpgx/genomic-health-awarded-new-patents-covering-oncotype-dx-technology-reports-reven>
144. Lassmann S, Kreutz C, Schoepflin A, Hopt U, Timmer J, Werner M. A novel approach for reliable microarray analysis of microdissected tumor cells from formalin-fixed and paraffin-embedded colorectal cancer resection specimens. *J Mol Med (Berl)*. 2009 Feb;87(2):211-24.
145. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One*. 2007 Dec;2(12):e1261.
146. Hall JS, Leong HS, Armenoult LS, Newton GE, Valentine HR, Irlam JJ, Möller-Levet C, Sikand KA, Pepper SD, Miller CJ, West CM. Exon-array profiling unlocks clinically and biologically relevant gene signatures from formalin-fixed paraffin-embedded tumour samples. *Br J Cancer*. 2011 Mar 15;104(6):971-81.
147. Scicchitano MS, Dalmas DA, Bertiaux MA, Anderson SM, Turner LR, Thomas RA, Mirable R, Boyce RW. Preliminary comparison of quantity, quality, and microarray performance of RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded, and unfixed frozen tissue samples. *J Histochem Cytochem*. 2006 Nov;54(11):1229-37.
148. Coudry RA, Meireles SI, Stoyanova R, Cooper HS, Carpino A, Wang X, Engstrom PF, Clapper ML. Successful application of microarray technology to microdissected formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*. 2007 Feb;9(1):70-9.
149. Frank M, Döring C, Metzler D, Eckerle S, Hansmann ML. Global gene expression profiling of formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples: a comparison to

- snap-frozen material using oligonucleotide microarrays. *Virchows Arch.* 2007 Jun;450(6):699-711.
150. Turner L, Heath JD, Kurn N. Gene expression profiling of RNA extracted from FFPE tissues: NuGEN technologies' whole-transcriptome amplification system. *Methods Mol Biol.* 2011;724:269-80.
  151. Linton K, Hey Y, Dibben S, Miller C, Freemont A, Radford J, Pepper S. Methods comparison for high-resolution transcriptional analysis of archival material on Affymetrix Plus 2.0 and Exon 1.0 microarrays. *Biotechniques.* 2009 Jul;47(1):587-96.
  152. Wang YP. Integration of gene expression and gene copy number variations with independent component analysis. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2008;2008:5700-3.
  153. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet.* 1999 Sep;23(1):41-6.
  154. Monni O, Barlund M, Mousses S, Kononen J, Sauter G, Heiskanen M, Paavola P, Avela K, Chen Y, Bittner ML, Kallioniemi A. Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 May 8;98(10):5711-6.
  155. Bussey KJ, Chin K, Lababidi S, Reimers M, Reinhold WC, Kuo WL, Gwadry F, Ajay, Kouros-Mehr H, Fridlyand J, Jain A, Collins C, Nishizuka S, Tonon G, Roschke A, Gehlhaus K, Kirsch I, Scudiero DA, Gray JW, Weinstein JN. Integrating data on DNA copy number with gene expression levels and drug sensitivities in the NCI-60 cell line panel. *Mol Cancer Ther.* 2006 Apr;5(4):853-67.
  156. Cifola I, Spinelli R, Beltrame L, Peano C, Fasoli E, Ferrero S, Bosari S, Signorini S, Rocco F, Perego R, Proserpio V, Raimondo F, Mocarelli P, Battaglia C. Genome-wide screening of copy number alterations and LOH events in renal cell carcinomas and integration with gene expression profile. *Mol Cancer.* 2008 Jan 14;7:6. doi: 10.1186/1476-4598-7-6.
  157. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Gräf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S; METABRIC Group, Langerød A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowitz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Børresen-Dale AL, Brenton JD, Tavaré S, Caldas C, Aparicio S. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012 Apr;486(7403):346-52.

158. Ferreira BI, Alonso J, Carrillo J, Acquadro F, Largo1 C, Suela J, Teixeira MR, Cerveira N, Molares A, Gome´ z-Lo´ pez G, A´ Pestan~ a2, Sastre A, Garcia-Miguel P and Cigudosa JC. Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing’s sarcoma *Oncogene*. 2008; 27, 2084–2090.
159. Cheah PY. Recent advances in colorectal cancer genetics and diagnostics. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009 Jan;69(1):45-55.
160. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. 1997 Sep-Oct;21(5):233-300.
161. Harrison S, Benziger H. The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. *Surgeon*. 2011 Aug;9(4):200-10.
162. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 2010 Mar;46(4):765-81.
163. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013 Jan;63(1):11-30.
164. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
165. Sağlık Bakanlığı Kanseri Savaş Dairesi Başkanlığı 2006-2008 yılları. Türkiye Kanseri İnsidansı, [www.kanser.gov.tr](http://www.kanser.gov.tr).
166. Paula M. Calvert, MD, and Harold Frucht, MD. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2002;137:603-612.
167. Cruz-Bustillo Clarens D. Molecular genetics of colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig*. 2004 Jan;96(1):48-59.
168. Lynch HT, Watson P, Smyrk TC, Lanspa SJ, Boman BM, Boland CR, Lynch JF, Cavalieri RJ, Leppert M, White R, et al. Colon cancer genetics. *Cancer*. 1992 Sep 1;70(5 Suppl):1300-12.
169. Ahmed FE. Gene-gene, gene-environment & multiple interactions in colorectal cancer. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2006 Apr;24(1):1-101.
170. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jun 2;91(11):916-32.

171. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*. 2001 Oct;96(10):2992-3003.
172. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol*. 2007 Jul;13(28):3784-91.
173. Remo A, Pancione M, Zanella C, Vendraminelli R. Molecular pathology of colorectal carcinoma. A systematic review centred on the new role of the pathologist. *Pathologica*. 2012 Dec;104(6):432-41.
174. Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Díaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol*. 2010 Mar;2(3):151-8.
175. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun;61(5):759-67.
176. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009 Dec 17;361(25):2449-60.
177. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*. 1989 Apr;244(4901):217-21.
178. Grady WM, Markowitz SD. In: *The TGF- $\beta$  Family*. Derynck R, Miyazono K, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY: 2008. pp. 889–938.
179. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*. 2002 Jul;89(7):845-60.
180. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopolous N, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet*. 1995 Jan;9(1):48-55.
181. Iacopetta B, Grieu F, Amanuel B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2010 Dec;6(4):260-9.
182. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomäki P, Chadwick RB, Kääriäinen H, Eskelinen M, Järvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle

- A. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med.* 1998 May 21;338(21):1481-7.
183. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Sep;27(9):1423-31.
  184. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P et al. Carcinoma of The Colon Rectum. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th edition, 2010. p132-173.
  185. Kumar A, Michell F. Robbins Pathologic Basis of Disease. 8th edition , chapter 17 2010. pages 817-825.
  186. American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. ed. New York: NY: Springer. 2002.
  187. Fujita T. Colorectal cancer. *Lancet.* 2010 Jul 31;376(9738):331.
  188. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer.* 2002 Oct 10;101(5):403-8.
  189. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H; Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Dis Colon Rectum.* 2010 Jan;53(1):57-64.
  190. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G, Smith MA. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data. *J Clin Oncol.* 2011 Nov;29(33):4401-9.
  191. Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K, Jenkins J, Cliatt J, Humbyrd CJ, DeNobile J, Soballe P, Simon R, Wright G, Lynch P, Patterson S, Lynch H, Gallinger S, Buchbinder A, Gordon G, Hawk E, Kirsch IR. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Aug;12(8):755-62.
  192. Demtroder KB, Olesen SH, Sørensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, Orntoft TF. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut.* 2005 Mar;54(3):374-84.

193. Vendrell E, Ribas M, Valls J, Solé X, Grau M, Moreno V, Capellà G, Peinado MA. Genomic and transcriptomic prognostic factors in R0 Dukes B and C colorectal cancer patients. *Int J Oncol.* 2007 May;30(5):1099-107.
194. Nannini M, Pantaleo MA, Maleddu A, Astolfi A, Formica S, Biasco G. Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: results and perspectives. *Cancer Treat Rev.* 2009 May;35(3):201-9.
195. Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, Levine AJ. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun 8;96(12):6745-50.
196. Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, Levine AJ. Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res.* 2001 Apr 1;61(7):3124-30.
197. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, Yeatman TJ. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Apr;94(7):513-21.
198. Koehler A, Bataille F, Schmid C, Ruemmele P, Waldeck A, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstaedter F, Dietmaier W. Gene expression profiling of colorectal cancer and metastases divides tumours according to their clinicopathological stage. *J Pathol.* 2004 Sep;204(1):65-74.
199. Li M, Lin YM, Hasegawa S, Shimokawa T, Murata K, Kameyama M, Ishikawa O, Katagiri T, Tsunoda T, Nakamura Y, Furukawa Y. Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. *Int J Oncol.* 2004 Feb;24(2):305-12.
200. Chan SK, Griffith OL, Tai IT, Jones SJ. Meta-analysis of colorectal cancer gene expression profiling studies identifies consistently reported candidate biomarkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Mar;17(3):543-52.
201. Barrier A, Lemoine A, Boelle PY, Tse C, Brault D, Chiappini F, Breittschneider J, Lacaine F, Houry S, Huguier M, Van der Laan MJ, Speed T, Debuire B, Flahault A, Dudoit S. Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling. *Oncogene.* 2005 Sep 8;24(40):6155-64.
202. Del Rio M, Molina F, Bascoul-Mollevis C, Copois V, Bibeau F, Chalbos P, Bareil C, Kramar A, Salvetat N, Fraslon C, Conseiller E, Granci V, Leblanc B, Pau B, Martineau P, Ychou M. Gene expression signature in advanced colorectal cancer

patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. *J Clin Oncol*. 2007 Mar;25(7):773-80.

203. Diep CB, Kleivi K, Ribeiro FR, Teixeira MR, Lindgjaerde OC, Lothe RA. The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 Jan;45(1):31-41.
204. Hughes S, Williams RD, Webb E, Houlston RS. Meta-analysis and pooled re-analysis of copy number changes in colorectal cancer detected by comparative genomic hybridization. *Anticancer Res*. 2006 Sep-Oct;26(5A):3439-44.
205. Andersen CL, Wiuf C, Kruhøffer M, Korsgaard M, Laurberg S, Ørntoft TF. Frequent occurrence of uniparental disomy in colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2007 Jan;28(1):38-48.
206. Habermann JK, Paulsen U, Roblick UJ, Upender MB, McShane LM, Korn EL, Wangsa D, Krüger S, Duchrow M, Bruch HP, Auer G, Ried T. Stage-specific alterations of the genome, transcriptome, and proteome during colorectal carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007 Jan;46(1):10-26.
207. Staub E, Gröne J, Mennerich D, Röpcke S, Klamann I, Hinzmann B, Castanos-Velez E, Mann B, Pilarsky C, Brümmendorf T, Weber B, Buhr HJ, Rosenthal A. A genome-wide map of aberrantly expressed chromosomal islands in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2006 Sep 18;5:37.
208. Tsafrir D, Bacolod M, Selvanayagam Z, Tsafrir I, Shia J, Zeng Z, Liu H, Krier C, Stengel RF, Barany F, Gerald WL, Paty PB, Domany E, Notterman DA. Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006 Feb;66(4):2129-37.
209. Berg M, Agesen TH, Thiis-Evensen E; INFAC-study group, Merok MA, Teixeira MR, Vatn MH, Nesbakken A, Skotheim RI, Lothe RA. Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci. *Mol Cancer*. 2010 May 6;9:100.
210. Loo LW, Tiirikainen M, Cheng I, Lum-Jones A, Seifried A, Church JM, Gryfe R, Weisenberger DJ, Lindor NM, Gallinger S, Haile RW, Duggan DJ, Thibodeau SN, Casey G, Le Marchand L. Integrated analysis of genome-wide copy number alterations and gene expression in microsatellite stable, CpG island methylator phenotype-negative colon cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 May;52(5):450-66.

211. Nakao K, Mehta KR, Fridlyand J, Moore DH, Jain AN, Lafuente A, Wiencke JW, Terdiman JP, Waldman FM. High-resolution analysis of DNA copy number alterations in colorectal cancer by array-based comparative genomic hybridization. *Carcinogenesis*. 2004 Aug;25(8):1345-57.
212. Nakao M, Kawauchi S, Furuya T, Uchiyama T, Adachi J, Okada T, Ikemoto K, Oga A, Sasaki K. Identification of DNA copy number aberrations associated with metastases of colorectal cancer using array CGH profiles. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009 Jan 15;188(2):70-6.
213. Kim JC, Kim SY, Roh SA, Cho DH, Kim DD, Kim JH, Kim YS. Gene expression profiling: canonical molecular changes and clinicopathological features in sporadic colorectal cancers. *World J Gastroenterol*. 2008 Nov;14(43):6662-72.
214. Groene J, Mansmann U, Meister R, Staub E, Roepcke S, Heinze M, Klaman I, Brümmendorf T, Hermann K, Loddenkemper C, Pilarsky C, Mann B, Adams HP, Buhr HJ, Rosenthal A. Transcriptional census of 36 microdissected colorectal cancers yields a gene signature to distinguish UICC II and III. *Int J Cancer*. 2006 Oct;119(8):1829-36.
215. Wiese AH, Auer J, Lassmann S, Nährig J, Rosenberg R, Höfler H, Rügner R, Werner M. Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer Detect Prev*. 2007;31(4):282-95.
216. Lagerstedt KK, Staaf J, Jönsson G, Hansson E, Lönnroth C, Kressner U, Lindström L, Nordgren S, Borg A, Lundholm K. Tumor genome wide DNA alterations assessed by array CGH in patients with poor and excellent survival following operation for colorectal cancer. *Cancer Inform*. 2007 Oct;3:341-55.
217. Kendzioriski C, Irizarry RA, Chen KS, Haag JD, Gould MN. On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar;102(12):4252-7.
218. Bengtsson H, Irizarry R, Carvalho B, and Speed T, Estimation and assessment of raw copy numbers at the single locus level, *Bioinformatics*. 2008.
219. Wu Z, Irizarry R, Gentleman R, Murillo FM, Spencer F. A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *Journal of the American Statistical Association*. 2004;99:909–917.
220. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44-57.



221. Penland SK, Keku TO, Torrice C, He X, Krishnamurthy J, Hoadley KA, Woosley JT, Thomas NE, Perou CM, Sandler RS, Sharpless NE. RNA expression analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tumors. *Lab Invest*. 2007 Apr;87(4):383-91
222. Roberts L, Bowers J, Sensinger K, Lisowski A, Getts R, Anderson MG. Identification of methods for use of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples in RNA expression profiling. *Genomics*. 2009 Nov;94(5):341-8.
223. Bekku S, Mochizuki H, Yamamoto T, Ueno H, Takayama E, Tadakuma T. Expression of carbonic anhydrase I or II and correlation to clinical aspects of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2000 Jul-Aug;47(34):998-1001.
224. Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, Kihara C, Ono K, Yanagawa R, Nita ME, Takagi T, Nakamura Y, Tsunoda T. Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res*. 2001 May;61(9):3544-9.
225. Bertucci F, Salas S, Eysteris S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Lloriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero JR, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene*. 2004 Feb;23(7):1377-91.
226. Davis LK, Meyer KJ, Schindler EI, Beck JS, Rudd DS, Grundstad AJ, Scheetz TE, Braun TA, Fingert JH, Alward WL, Kwon YH, Folk JC, Russell SR, Wassink TH, Sheffield VC, Stone EM. Copy number variations and primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Sep;52(10):7122-33.
227. Siggberg L, Sirpa AM, Tarja L, Kristiina A, Ilari S, Kati K, Päivi L, Marja H, Liisa M, Esa K, Maarit L, Janna S, Sakari K. High-resolution SNP array analysis of patients with developmental disorder and normal array CGH results. *BMC Med Genet*. 2012 Sep 17;13:84.
228. Wang J, Jiang J, Fu W, Jiang L, Ding X, Liu JF, Zhang Q. A genome-wide detection of copy number variations using SNP genotyping arrays in swine. *BMC Genomics*. 2012 Jun;13:273.
229. Malek JA, Mery E, Mahmoud YA, Al-Azwani EK, Roger L, Huang R, Jouve E, Lis R, Thiery JP, Querleu D, Rafii A. Copy number variation analysis of matched ovarian primary tumors and peritoneal metastasis. *PLoS One*. 2011;6(12):e28561.

230. Thomas M, Poignée-Heger M, Weisser M, Wessner S, Belousov A. An optimized workflow for improved gene expression profiling for formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples. *J Clin Bioinforma*. 2013 May 3;3(1):10.
231. Yokoyama S, Shatney CH, Mochizuki H, Hase K, Johnson DL, Cummings S, Trollope ML, Tamakuma S. The potential role of fecal carbonic anhydrase II in screening for colorectal cancer. *Am Surg*. 1997 Mar;63(3):243-6.
232. Bahnassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, El-Shehaby AM, Mahmoud MR, Abdallah S, El-Serafi M. Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol*. 2004 Sep 23;4:22.
233. Balcerczak E, Pasz-Walczak G, Kumor P, Panczyk M, Kordek R, Wierzbicki R, Mirowski M. Cyclin D1 protein and CCND1 gene expression in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2005 Sep;31(7):721-6.
234. Boccaccio C, Comoglio PM. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:637–645.
235. Toschi L, Janne PA. Single-agent and combination therapeutic strategies to inhibit hepatocyte growth factor/MET signaling in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:5941–5946.
236. Nam S, Park T. Pathway-based evaluation in early onset colorectal cancer suggests focal adhesion and immunosuppression along with epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2012;7(4):e31685.
237. Coulson-Thomas VJ, Coulson-Thomas YM, Gesteira TF, de Paula CA, Mader AM, Waisberg J, Pinhal MA, Friedl A, Toma L, Nader HB. Colorectal cancer desmoplastic reaction up-regulates collagen synthesis and restricts cancer cell invasion. *Cell Tissue Res*. 2011 Nov;346(2):223-36. doi: 10.1007/s00441-011-1254-y. Epub 2011 Oct 11.
238. Miyanaga K, Kato Y, Nakamura T, Matsumura M, Amaya H, Horiuchi T, Chiba Y, Tanaka K. Expression and role of thrombospondin-1 in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2002 Nov-Dec;22(6C):3941-8.
239. Meeh PF, Farrell CL, Croshaw R, Crimm H, Miller SK, Oroian D, Kowli S, Zhu J, Carver W, Wu W, Pena E, Buckhaults PJ. A gene expression classifier of node-positive colorectal cancer. *Neoplasia*. 2009 Oct;11(10):1074-83.
240. Sakakibara T, Hibi K, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y, Ito K, Nakao A. Plasminogen activator inhibitor-1 as a potential marker for the malignancy of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2005 Oct;93(7):799-803.

241. Cheng Q, Chang JT, Geradts J, Neckers LM, Haystead T, Spector NL, Lyerly HK. Amplification and high-level expression of heat shock protein 90 marks aggressive phenotypes of human epidermal growth factor receptor 2 negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012 Apr;14(2):R62.
242. He K, Zheng X, Zhang L, Yu J. Hsp90 inhibitors promote p53-dependent apoptosis through PUMA and Bax. *Mol Cancer Ther.* 2013 Aug .
243. Gupta UK, Mahanta S, Paul S. Med Hypotheses. In silico design of small peptide-based Hsp90 inhibitor: A novel anticancer agent. 2013 Aug 23.
244. Wang L, Xiao X, Li D, Chi Y, Wei P, Wang Y, Ni S, Tan C, Zhou X, Du X. Abnormal expression of GADD45B in human colorectal carcinoma. *J Transl Med.* 2012 Oct;10:215.
245. Salh B, Bergman D, Marotta A, Pelech SL. Differential cyclin-dependent kinase expression and activation in human colon cancer. *Anticancer Res.* 1999 Jan-Feb;19(1B):741-8.
246. Arber N, Hibshoosh H, Moss SF, Sutter T, Zhang Y, Begg M, Wang S, Weinstein IB, Holt PR. Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology.* 1996 Mar;110(3):669-74.
247. Kristt D, Turner I, Koren R, Ramadan E, Gal R. Overexpression of cyclin D1 mRNA in colorectal carcinomas and relationship to clinicopathological features: an in situ hybridization analysis. *Pathol Oncol Res.* 2000;6(1):65-70.
248. Jung A, Schrauder M, Oswald U, Knoll C, Sellberg P, Palmqvist R, Niedobitek G, Brabletz T, Kirchner T. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J Pathol.* 2001 Nov;159(5):1613-7.
249. Guzińska-Ustymowicz K. The role of tumour budding at the front of invasion and recurrence of rectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2005 Mar-Apr;25(2B):1269-72.
250. Nilsson I, Hoffmann I. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res.* 2000;4:107-14.
251. Zhang YL, Pang LQ, Wu Y, Wang XY, Wang CQ, Fan Y. Significance of Bcl-xL in human colon carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008 May;14(19):3069-73.
252. Wilson TR, McLaughlin KM, McEwan M, Sakai H, Rogers KM, Redmond KM, Johnston PG, Longley DB. c-FLIP: a key regulator of colorectal cancer cell death. *Cancer Res.* 2007 Jun;67(12):5754-62.

253. Heijink DM, Kleibeuker JH, Jalving M, Boersma-van Ek W, Koornstra JJ, Wesseling J, de Jong S. Independent induction of caspase-8 and cFLIP expression during colorectal carcinogenesis in sporadic and HNPCC adenomas and carcinomas. *Cell Oncol.* 2007;29(5):409-19.
254. Coss A, Tosetto M, Fox EJ, Sapetto-Rebow B, Gorman S, Kennedy BN, Lloyd AT, Hyland JM, O'Donoghue DP, Sheahan K, Leahy DT, Mulcahy HE, O'Sullivan JN. Increased topoisomerase IIalpha expression in colorectal cancer is associated with advanced disease and chemotherapeutic resistance via inhibition of apoptosis. *Cancer Lett.* 2009 Apr 18;276(2):228-38.
255. Semba S, Itoh N, Ito M, Youssef EM, Harada M, Moriya T, Kimura W, Yamakawa M. Down-regulation of PIK3CG, a catalytic subunit of phosphatidylinositol 3-OH kinase, by CpG hypermethylation in human colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2002 Dec;8(12):3824-31.
256. Spano JP, Fagard R, Soria JC, Rixe O, Khayat D, Milano G. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Ann Oncol.* 2005 Feb;16(2):189-94.
257. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Aug;10(9):671-84.
258. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009 May;324(5930):1029-33.
259. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011 Feb;11(2):85-95.
260. Chi V. DangLinks between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 2012 May ;26(9):877-90.
261. Dang DT, Chen F, Kohli M, Rago C, Cummins JM, Dang LH. Glutathione S-transferase p11 promotes tumorigenicity in HCT116 human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2005 Oct;65(20):9485-94.
262. Kim H, Watkinson J, Varadan V, Anastassiou D. Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC Med Genomics.* 2010 Nov 3;3:51.
263. Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3:11-6. Epub 2005 Nov 21.

264. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:4-10. Epub 2005 Nov 21.
265. Lin AY, Chua MS, Choi YL, Yeh W, Kim YH, Azzi R, Adams GA, Sainani K, van de Rijn M, So SK, Pollack JR. Comparative profiling of primary colorectal carcinomas and liver metastases identifies LEF1 as a prognostic biomarker. *PLoS One*. 2011 Feb 24;6(2):e16636.
266. MacDonald TJ, Pollack IF, Okada H, Bhattacharya S, Lyons-Weiler J. Progression-associated genes in astrocytoma identified by novel microarray gene expression data reanalysis. *Methods Mol Biol*. 2007;377:203-22.
267. Cui J, Li F, Wang G, Fang X, Puett JD, Xu Y. Gene-expression signatures can distinguish gastric cancer grades and stages. *PLoS One*. 2011 Mar 18;6(3):e17819. doi: 10.1371/journal.pone.0017819.
268. Bernini A, Spencer M, Frizelle S, Madoff RD, Willmott LD, McCormick SR, Niehans GA, Ho SB, Kratzke RA. Evidence for colorectal cancer micrometastases using reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of MUC2 in lymph nodes. *Cancer Detect Prev*. 2000;24(1):72-9.
269. Naito Y, Oue N, Hinoi T, Sakamoto N, Sentani K, Ohdan H, Yanagihara K, Sasaki H, Yasui W. Reg IV is a direct target of intestinal transcriptional factor CDX2 in gastric cancer. *PLoS One*. 2012;7(11):e47545. doi: 10.1371/journal.pone.0047545. Epub 2012 Nov 2.
270. Arango D, Al-Obaidi S, Williams DS, Dopeso H, Mazzolini R, Corner G, Byun DS, Carr AA, Murone C, Tögel L, Zeps N, Aaltonen LA, Iacopetta B, Mariadason JM. Villin expression is frequently lost in poorly differentiated colon cancer. *Am J Pathol*. 2012 Apr;180(4):1509-21.
271. Cattaneo E, Baudis M, Buffoli F, Bianco MA, Zorzi F, Marra G. Pathways and crossroads to colorectal cancer. *Pre-Invasive Disease: Pathogenesis and Clinical Management*. Springer: In: R.C. Fitzgerald, editors ; 2011. pp. 369–394.
272. Maglietta R, Liuzzi VC, Cattaneo E, Laczko E, Piepoli A, Panza A, Carella M, Palumbo O, Staiano T, Buffoli F, Andriulli A, Marra G, Ancona N. Molecular pathways undergoing dramatic transcriptomic changes during tumor development in the human colon. *BMC Cancer*. 2012 Dec;12:608.
273. Sikora K, Chan S, Evan G, Gabra H, Markham N, Stewart J, Watson J. c-myc oncogene expression in colorectal cancer. *Cancer*. 1987 Apr;59(7):1289-95.

274. Kumar G, Breen EJ, Ranganathan S. Identification of ovarian cancer associated genes using an integrated approach in a Boolean framework. *BMC Syst Biol.* 2013 Feb 6;7:12.
275. Rhyasen GW, Bolanos L, Fang J, Jerez A, Wunderlich M, Rigolino C, Mathews L, Ferrer M, Southall N, Guha R, Keller J, Thomas C, Beverly LJ, Cortelezzi A, Oliva EN, Cuzzola M, Maciejewski JP, Mulloy JC, Starczynowski DT. Targeting IRAK1 as a therapeutic approach for myelodysplastic syndrome. *Cancer Cell.* 2013 Jul 8;24(1):90-104. doi: 10.1016/j.ccr.2013.05.006.
276. Choi YL, Bocanegra M, Kwon MJ, Shin YK, Nam SJ, Yang JH, Kao J, Godwin AK, Pollack JR. LYN is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and a target of dasatinib in breast cancer. *Cancer Res.* 2010 Mar 15;70(6):2296-306.
277. Tachibana K, Yamasaki D, Ishimoto K, Doi T. The Role of PPARs in Cancer. *PPAR Res.* 2008;2008:102737.
278. Komuro K, Tada M, Tamoto E, Kawakami A, Matsunaga A, Teramoto K, Shindoh G, Takada M, Murakawa K, Kanai M, Kobayashi N, Fujiwara Y, Nishimura N, Hamada J, Ishizu A, Ikeda H, Kondo S, Katoh H, Moriuchi T, Yoshiki T. Right- and left-sided colorectal cancers display distinct expression profiles and the anatomical stratification allows a high accuracy prediction of lymph node metastasis. *J Surg Res.* 2005 Apr;124(2):216-24.
279. Ferri M, Rossi Del Monte S, Salerno G, Bocchetti T, Angeletti S, Malisan F, Cardelli P, Ziparo V, Torrisi MR, Visco V. Recovery of immunological homeostasis positively correlates both with early stages of right-colorectal cancer and laparoscopic surgery. *PLoS One.* 2013 Sep;8(9):e74455.
280. Bonin S, Hlubek F, Benhattar J, Denkert C, Dietel M, Fernandez PL, Höfler G, Kothmaier H, Kruslin B, Mazzanti CM, Perren A, Popper H, Scarpa A, Soares P, Stanta G, Groenen PJ. Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch.* 2010 Sep;457(3):309-17.
281. Okello JB, Zurek J, Devault AM, Kuch M, Okwi AL, Sewankambo NK, Bimenya GS, Poinar D, Poinar HN. Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. *Anal Biochem.* 2010 May 1;400(1):110-7.
282. Shi SR, Datar R, Liu C, Wu L, Zhang Z, Cote RJ, Taylor CR. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem Cell Biol.* 2004 Sep;122(3):211-8. Epub 2004 Aug 20.

283. Nakao M, Kawauchi S, Uchiyama T, Adachi J, Ito H, Chochi Y, Furuya T, Oga A, Sasaki K. DNA copy number aberrations associated with the clinicopathological features of colorectal cancers: Identification of genomic biomarkers by array-based comparative genomic hybridization. *Oncol Rep.* 2011 Jun;25(6):1603-11.
284. Fang YM, Dong Q, Cen H, Tang XP, Zheng S. Induction of HSF1 expression and sporadic colorectal cancer. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2004 Sep;33(5):390-4.
285. Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R 3rd, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM, Rosner MR. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem.* 2002 May;277(19):16733-43.
286. Killian A, Sarafan-Vasseur N, Sesboue R, Le PF, Blanchard F, Lamy A, Laurent M, Flaman JM, Frebourg T. Contribution of the BOP1 gene, located on 8q24, to colorectal tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45:874-881.
287. Lips EH, van Eijk R, de Graaf EJ, Oosting J, de Miranda NF, Karsten T, van de Velde CJ, Eilers PH, Tollenaar RA, van Wezel T, Morreau H. Integrating chromosomal aberrations and gene expression profiles to dissect rectal tumorigenesis. *BMC Cancer.* 2008 Oct;8:314.
288. Chung KY, Cheng IK, Ching AK, Chu JH, Lai PB, Wong N. Block of proliferation 1 (BOP1) plays an oncogenic role in hepatocellular carcinoma by promoting epithelial-to-mesenchymal transition. *Hepatology.* 2011 Jul;54(1):307-18.
289. Ding ZY, Liu GH, Olsson B, Sun XF. Upregulation of the antiapoptotic factor Livin contributes to cisplatin resistance in colon cancer cells. *Tumour Biol.* 2013 Apr;34(2):683-93.
290. Peterson D, Lee J, Lei XC, Forrest WF, Davis DP, Jackson PK, Belmont LD. A chemosensitization screen identifies TP53RK, a kinase that restrains apoptosis after mitotic stress. *Cancer Res.* 2010 Aug 1;70(15):6325-35.
291. Bret C, Moreaux J, Schved JF, Hose D, Klein B. SULFs in human neoplasia: implication as progression and prognosis factors. *J Transl Med.* 2011 May 21;9:72.
292. Ehlers S, Mueck T, Adams S, Landuzzi L, Lollini PL, Munz B. RIP2 regulates growth and differentiation of normal myoblasts and of rhabdomyosarcoma cells. *Eur J Cell Biol.* 2008 Mar;87(3):163-72.
293. Cheng XJ, Xu W, Zhang QY, Zhou RL. Relationship between LAPT4B gene polymorphism and susceptibility of colorectal and esophageal cancers. *Ann Oncol.* 2008 Mar;19(3):527-32.

294. Kang Y, Yin M, Jiang W, Zhang H, Xia B, Xue Y, Huang Y. Overexpression of LAPTM4B-35 is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma. *Am J Surg*. 2012 Nov;204(5):677-83.
295. Li Y, Park J, Piao L, Kong G, Kim Y, Park KA, Zhang T, Hong J, Hur GM, Seok JH, Choi SW, Yoo BC, Hemmings BA, Brazil DP, Kim SH, Park J. PKB-mediated PHF20 phosphorylation on Ser291 is required for p53 function in DNA damage. *Cell Signal*. 2013 Jan;25(1):74-84.
296. Zhu JH, Hong DF, Song YM, Sun LF, Wang ZF, Wang JW. Suppression of Cellular Apoptosis Susceptibility (CSE1L) Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(2):1017-21.
297. Alnabulsi A, Agouni A, Mitra S, Garcia-Murillas I, Carpenter B, Bird S, Murray GI. Cellular apoptosis susceptibility (chromosome segregation 1-like, CSE1L) gene is a key regulator of apoptosis, migration and invasion in colorectal cancer. *J Pathol*. 2012 Mar 27.
298. Michaelis KA, Knox AJ, Xu M, Kiseljak-Vassiliades K, Edwards MG, Geraci M, Kleinschmidt-DeMasters BK, Lillehei KO, Wierman ME. Identification of growth arrest and DNA-damage-inducible gene beta (GADD45beta) as a novel tumor suppressor in pituitary gonadotrope tumors. *Endocrinology*. 2011;152:3603–3613.
299. Ou DL, Shen YC, Yu SL, Chen KF, Yeh PY, Fan HH, Feng WC, Wang CT, Lin LI, Hsu C, Cheng AL. Induction of DNA damage-inducible gene GADD45beta contributes to sorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*. 2010;70:9309–9318.
300. Fijneman RJ, Cormier RT. The roles of sPLA2-IIA (Pla2g2a) in cancer of the small and large intestine. *Front Biosci*. 2008 May 1;13:4144-74.
301. Lee S, Bang S, Song K, Lee I. Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. *Oncol Rep*. 2006 Oct;16(4):747-54.
302. Dong M, Johnson M, Rezaie A, Ilsley JN, Nakanishi M, Sanders MM, Forouhar F, Levine J, Montrose DC, Giardina C, Rosenberg DW. Cytoplasmic phospholipase A2 levels correlate with apoptosis in human colon tumorigenesis. *Clin Cancer Res*. 2005 Mar 15;11(6):2265-71.



## EKLER

### EK1:Mikrodizin gen ifade analizi pozitif sinyal alınan prob yüzdeleri

Örnek	Number of Present Değerleri-%
08/86 Kontrol	47.4
08/86 Tümör	53.27
08/98 Kontrol	46.48
08/98 Tümör	51.99
08/104 Kontrol	49.25
08/104 Tümör	50.99
08/119 Kontrol	48.59
08/119 Tümör	50.49
08/65 Kontrol	36.3
08/65 Tümör	25.86
08/73 Kontrol	42.34
08/73 Tümör	45.26
08/79 Kontrol	23.65
08/79 Tümör	27.7
08/102 Kontrol	41.76
08/102 Tümör	49.72
08/125 Kontrol	48.54
08/125 Tümör	45.81
08/140 Kontrol	38.92
08/140 Tümör	38.24
08/163 Kontrol	44.82
08/163 Tümör	37.44
08/165 Kontrol	40.02
08/165 Tümör	51.24
09/19 Kontrol	48.58
09/19 Tümör	36.57
09/93 Kontrol	52.22
09/93 Tümör	53.81
09/140 Kontrol	41.24
09/140 Tümör	48.28
09/305 Kontrol	35.21
09/305 Tümör	45.05
10/21 Kontrol	41.92
10/21 Tümör	42.8
10/32 Kontrol	54.43
10/32 Tümör	51.39

09/144 Kontrol	48.57
09/144 Tumor	30.4
10/35 Kontrol	46.19
10/35 Tumor	54.01
12/08 Kontrol	49.45
12/08 Tumor	45.6
12-09 Kontrol	56.01
12-09 Tumor	53.77
12/11 Kontrol	50.58
12/11 Tumor	48.12
12/16 Kontrol	53.39
12/16 Tumor	57.03
12/17 Kontrol	48.49
12/17 Tumor	53.74
08/40 Kontrol	44.67
08/40 Tumor	55.52
08/74 Kontrol	49.08
08/74 Tumor	47.81
08/77 Kontrol	49.24
08/77 Tumor	45.33
08/95 Kontrol	49.61
08/95 Tumor	48.64
08/97 Kontrol	26.48
08/97 Tumor	29.6
08/139 Kontrol	48.7
08/139 Tumor	43.94
08/166 Kontrol	12.59
08/166 Tumor	16.28
09/131 Kontrol	47.05
09/131 Tumor	45.77
09/137 Kontrol	42.54
09/137 Tumor	49.92
09/142 Kontrol	48.82
09/142 Tumor	50.63
09/243 Kontrol	35.21
09/243 Tumor	37.73
10/12 Kontrol	45.76
10/12 Tumor	46.72
10/56 Kontrol	44.25
10/56 Tumor	41.78
10/109 Kontrol	40.34

<b>10/109 Tümör</b>	37.68
<b>10/129 Kontrol</b>	36.95
<b>10/129 Tümör</b>	39.3
<b>10/130 Kontrol</b>	39.72
<b>10/130 Tümör</b>	37.49
<b>10/145 Kontrol</b>	25.28
<b>10/145 Tümör</b>	37.24
<b>09/94 Kontrol</b>	50.65
<b>09/94 Tümör</b>	54.29
<b>12/06 Kontrol</b>	48.62
<b>12/06 Tümör</b>	45.01
<b>12/07 Kontrol</b>	44.77
<b>12/07 Tümör</b>	42.20
<b>12/10 Kontrol</b>	39.27
<b>12/10 Tümör</b>	46.27
<b>12/12 Kontrol</b>	40.1
<b>12/12 Tümör</b>	47.34
<b>12/15 Kontrol</b>	fail to align
<b>12/15 Tümör</b>	41.94
<b>12/18 Kontrol</b>	30.41
<b>12/18 Tümör</b>	54.02
<b>09/257 Kontrol</b>	40.66
<b>09/257 Tümör</b>	26.19

**EK-2:****Tümör vs Kontrol karşılaştırmasında farklı olarak ifade edilen gen seti ( 2 kat, p<0.001)**

Probe Set ID	Gen Sembolü	Kat Değişimi	p Değeri
Hs.179729.0.S1_3p_a_at	COL10A1	12,34	3,53731E-14
Hs2.422072.1.S1_3p_x_at	SPP1	11,80	2,61885E-11
g1924981_3p_a_at	FAP	11,63	9,52801E-17
Hs2.422072.1.S1_3p_at	SPP1	11,57	2,62881E-11
Hs.28792.0.S1_3p_at	INHBA	11,31	5,59885E-17
1568574_3p_x_at	SPP1	11,05	3,21257E-10
g13027795_3p_s_at	MMP11	10,44	1,51951E-12
Hs.101302.1.S1_3p_a_at	COL12A1	10,13	6,44167E-13
g4507486_3p_at	THBS2	9,19	2,61438E-14
g4323580_3p_at	CLDN1	8,48	4,77472E-15
g9665258_3p_at	MFAP2	8,32	7,57617E-15
g9665258_3p_x_at	MFAP2	8,03	5,05878E-14
g1518541_3p_a_at	DIO2	8,03	5,35882E-12
Hs.99389.0.A1_3p_at	GRIN2D	7,89	1,64165E-14
g4503108_3p_x_at	CST4	7,71	7,17167E-12
g1353569_3p_a_at	CDKN2A	7,41	1,57587E-08
g4503108_3p_at	CST4	7,39	7,9757E-13
Hs.297939.3.S1_3p_at	FNDC1	7,36	3,24525E-13
Hs.279525.0.S1_3p_x_at	H19 /// MIR675 /// RPS12	7,06	1,37264E-12
Hs.70823.0.S3_3p_at	SULF1	6,99	6,96751E-13
g4507508_3p_s_at	TIMP1	6,95	2,36825E-13
g12803216_3p_a_at	BGN	6,61	2,81623E-16
g12641914_3p_a_at	IL8	6,59	1,11501E-08
Hs.70823.0.S1_3p_at	SULF1	6,52	2,08483E-15
g220150_3p_x_at	AZGP1	6,49	1,61019E-08
Hs.172928.0.A2_3p_a_at	COL1A1	6,41	3,79859E-14
g10834977_3p_at	IL8	6,40	3,72454E-08
g10834977_3p_x_at	IL8	6,31	1,92826E-08
Hs.101302.0.S2_3p_s_at	COL12A1	6,08	1,33559E-12
g348911_3p_at	CHI3L1	6,06	3,43745E-08
Hs.44865.1.A1_3p_a_at	LEF1	6,03	1,50339E-12
g348911_3p_x_at	CHI3L1	5,91	2,4032E-08
g13027798_3p_at	MMP1	5,86	1,57682E-06
Hs.70823.0.S2_3p_at	SULF1	5,82	4,76459E-15
g4502402_3p_x_at	BGN	5,75	1,90432E-16
g10835138_3p_s_at	FCGR3A /// FCGR3B	5,70	8,71733E-11
Hs.163900.0.A1_3p_at	FOXQ1	5,66	1,66331E-09
Hs.125359.1.S1_3p_a_at	THY1	5,58	7,40396E-09
g4502402_3p_a_at	BGN	5,49	1,25804E-16
g4502946_3p_a_at	COL1A2	5,48	5,09576E-14

g4507904_3p_a_at	VSNL1	5,38	1,37975E-09
217430_3p_x_at	COL1A1	5,28	7,83207E-13
g4557732_3p_at	LTBP2	5,26	3,05385E-12
Hs.306542.0.S1_3p_at	VCAN	5,12	2,51395E-13
g5454143_3p_a_at	GABBR1 /// UBD	5,09	1,25169E-09
g3290171_3p_a_at	RIPK2	5,00	3,3579E-14
Hs.306079.1.A1_3p_s_at	GUCY1A3	4,95	1,12969E-08
Hs2.425190.1.A1_3p_at	---	4,92	9,2973E-13
Hs.328801.0.S1_3p_x_at	---	4,90	1,02821E-06
Hs.76252.1.S1_3p_a_at	EDNRA	4,85	6,1531E-12
Hs.50724.0.A1_3p_s_at	LINC00152 /// LOC541471	4,79	8,82309E-13
Hs.172928.1.A1_3p_a_at	COL1A1	4,76	2,26418E-10
g8923132_3p_at	ASPN	4,72	2,08174E-08
Hs.146428.2.A2_3p_at	COL5A1	4,68	9,00294E-11
g13560280_3p_s_at	HOPX	4,67	7,02509E-10
g4502716_3p_a_at	CDH11	4,66	7,35078E-11
g1008912_3p_a_at	VCAN	4,64	4,31738E-11
g575577_3p_a_at	CDH11	4,63	2,18526E-09
g4507424_3p_a_at	TDGF1 /// TDGF1P3	4,56	4,27306E-06
Hs.125359.1.S1_3p_x_at	THY1	4,55	2,28816E-11
g4505862_3p_a_at	PLAU	4,54	1,08848E-08
Hs.83484.1.A1_3p_at	SOX4	4,52	4,31891E-13
Hs.31386.0.S1_3p_a_at	SFRP2	4,52	2,5631E-06
213869_3p_x_at	THY1	4,50	9,15334E-12
Hs.821.1.A1_3p_a_at	BGN	4,45	3,35904E-16
Hs.81800.4.A1_3p_a_at	VCAN	4,42	1,7508E-11
Hs.223025.0.S2_3p_a_at	RAB31	4,37	1,08107E-09
Hs.16869.0.A1_3p_at	COL12A1	4,32	2,16027E-12
Hs.82985.0.A1_3p_at	COL5A2	4,31	8,99536E-11
g4507044_3p_at	SLC6A6	4,28	1,88695E-12
g5031808_3p_a_at	ISLR	4,22	1,80328E-08
Hs.172928.0.A1_3p_a_at	COL1A1	4,14	9,08111E-14
g7328010_3p_s_at	THY1	4,06	3,13952E-14
g4503150_3p_a_at	CTSK	4,06	4,34566E-08
Hs2.323265.1.S1_3p_s_at	AHNAK2	4,02	9,00744E-07
g4557590_3p_a_at	FBN1	3,99	8,50334E-11
g10946502_3p_a_at	SFRP2	3,98	0,000170954
Hs.252280.2.S1_3p_at	GPX8	3,96	7,48182E-09
Hs.82085.0.S1_3p_a_at	SERPINE1	3,96	1,92661E-08
g7706520_3p_s_at	NEBL	3,94	9,70733E-09
g5174774_3p_a_at	APOC1	3,92	1,77524E-07
Hs.120330.0.S1_3p_at	ADAMTS2	3,91	2,6698E-11
Hs.284158.1.A1_3p_a_at	ZNFX1-AS1	3,86	1,22653E-10
Hs.83484.0.S1_3p_at	SOX4	3,81	7,40919E-15
g4506140_3p_at	HTRA1	3,80	3,90617E-10

Hs.8966.0.A1_3p_at	ANTXR1	3,80	2,62852E-10
g5453757_3p_a_at	NEBL	3,79	8,68129E-08
Hs.300772.1.A1_3p_at	TPM2	3,74	1,16246E-09
g7959734_RC_3p_s_at	SCD	3,73	5,56881E-07
g4507162_3p_a_at	SOX4	3,72	2,20559E-12
Hs.83484.1.S1_3p_a_at	SOX4	3,69	8,00448E-12
Hs.283713.0.A1_3p_at	CTHRC1	3,68	6,67863E-09
Hs.43697.1.A1_3p_at	ETV5	3,68	8,89774E-09
207279_3p_s_at	NEBL	3,64	3,98466E-09
g3366801_3p_at	LGR5	3,63	2,31406E-07
Hs.58632.0.S1_3p_at	CSGALNACT2	3,62	7,312E-10
Hs.300772.1.A1_3p_x_at	TPM2	3,62	8,40329E-09
Hs.83484.0.S3_3p_x_at	SOX4	3,59	8,03917E-12
Hs.75617.0.A1_3p_at	COL4A2	3,58	1,10035E-10
Hs.23954.0.S2_3p_s_at	CERCAM /// LOC100506065	3,58	2,52227E-08
Hs.119129.0.A1_3p_at	COL4A1	3,55	1,28371E-08
Hs.103391.0.A1_3p_at	IGFBP5	3,53	3,13875E-06
Hs.146428.2.A1_3p_at	COL5A1	3,49	1,28711E-09
Hs.74566.0.S1_3p_a_at	DPYSL3	3,48	1,549E-07
g11612664_3p_a_at	FXYD5	3,47	1,30303E-09
Hs.152475.0.A1_3p_at	ASCL2	3,46	2,76985E-09
Hs.2399.1.S1_3p_s_at	MMP14	3,45	6,27171E-11
1558378_3p_a_at	AHNAK2	3,44	7,01701E-06
g1008912_3p_s_at	VCAN	3,44	4,74822E-09
Hs2.381938.1.S1_3p_at	---	3,42	3,57032E-08
Hs.23954.1.A1_3p_at	CERCAM	3,40	9,96245E-09
Hs.23954.0.S2_3p_x_at	CERCAM /// LOC100506065	3,38	6,8475E-08
g4505460_3p_at	ENC1	3,37	7,90077E-13
g5031712_3p_at	MAML3	3,35	3,75467E-07
1568765_3p_at	SERPINE1	3,35	5,56926E-08
g7705386_3p_a_at	GTF2IRD1	3,33	7,82831E-09
Hs.111779.1.S1_3p_at	LOC100505813 /// SPARC	3,32	2,14357E-06
g625085_3p_s_at	MET	3,30	2,85135E-06
g4507466_3p_at	LOC100652886 /// LOC100653157 /// TGFBI	3,29	1,11409E-10
Hs.91161.0.A1_3p_a_at	PFDN4	3,29	2,86314E-11
g393318_3p_a_at	POSTN	3,25	2,85791E-05
g13097680_3p_s_at	TGM2	3,25	2,54422E-07
Hs.278554.0.A1_3p_x_at	CBX3	3,24	2,09206E-10
Hs.170142.0.A1_3p_at	KIRREL	3,22	6,50167E-09
g6912249_3p_a_at	TRIM29	3,21	2,59613E-06
Hs2.407478.1.S1_3p_s_at	DIXDC1	3,19	2,62812E-06
Hs.75113.3.A1_3p_a_at	GTF3A	3,17	1,26226E-08
g10835158_3p_a_at	SERPINE1	3,14	5,04884E-06
g9963780_3p_a_at	RAB31	3,12	4,37933E-11

Hs.23954.1.A1_3p_x_at	CERCAM	3,12	3,72676E-08
g13374556_3p_at	ZNF117	3,12	1,43813E-07
g182650_3p_at	MDK	3,10	1,51389E-07
Hs.324125.0.S1_3p_s_at	APBB2	3,09	9,6856E-10
214121_3p_x_at	PDLIM7	3,07	1,82168E-07
Hs.16930.0.A1_3p_at	ZAK	3,07	1,12926E-06
g4755145_3p_at	AEBP1	3,06	6,55236E-09
g7549808_3p_at	PLS3	3,06	8,67098E-09
g7705388_3p_x_at	ZNF117	3,03	1,35257E-06
g5901560_3p_a_at	VEGFA	3,03	6,59752E-06
211620_3p_x_at	LOC100506403 /// RUNX1	3,03	2,81963E-13
Hs.2.424388.1.A1_3p_at	FN1	3,03	1,82793E-05
Hs.9295.0.A2_3p_at	ELN	3,02	4,75159E-06
g7262388_3p_at	PCOLCE	3,02	1,27479E-06
Hs.102948.1.S1_3p_a_at	PDLIM7	3,02	1,4601E-05
g4505290_3p_at	MX1	3,01	1,97199E-07
Hs.2399.1.S1_3p_a_at	MMP14	3,01	2,97965E-10
Hs.2316.0.S1_3p_a_at	SOX9	3,01	1,07911E-06
217279_3p_x_at	MMP14	3,01	5,22871E-10
g6006015_3p_x_at	LGALS1	3,00	8,6628E-09
g13129095_3p_at	DSCC1	3,00	0,000307421
Hs.77326.1.S2_3p_a_at	IGFBP3	2,99	6,46037E-09
Hs.133207.1.A1_3p_s_at	PPFIBP1	2,98	2,94298E-06
g4504152_3p_at	CXCL1	2,98	8,1283E-05
Hs.126036.0.A1_3p_at	---	2,96	4,83189E-06
Hs.44155.1.A1_3p_a_at	MTHFD1L	2,95	1,28589E-09
Hs.179573.0.A1_3p_a_at	COL1A2	2,95	2,04077E-12
Hs.2.399807.1.S1_3p_at	CYTH2	2,93	3,03903E-06
g4557798_3p_a_at	NOTCH3	2,93	5,17096E-12
Hs.750.0.S1_3p_a_at	FBN1	2,93	3,20804E-08
Hs.2.407020.1.S1_3p_at	C6orf183	2,91	0,000842602
Hs.296737.0.S1_3p_s_at	REXO2	2,91	2,52453E-07
Hs.105125.0.A1_3p_at	FOXK1	2,90	4,289E-11
Hs.98658.1.A1_3p_at	---	2,89	1,59979E-06
g7662555_3p_x_at	---	2,88	1,47278E-10
Hs.9805.0.S1_3p_a_at	XPO5	2,87	1,70601E-06
Hs.146428.0.S2_3p_a_at	COL5A1	2,87	1,73232E-09
g7705388_3p_at	ZNF117	2,87	2,34322E-06
g4758123_3p_at	DBN1	2,84	3,5342E-10
Hs.119571.0.A1_3p_s_at	COL3A1	2,84	7,79725E-11
Hs.2.399807.1.S1_3p_x_at	CYTH2	2,83	1,10886E-06
Hs.247525.1.A1_3p_a_at	SYTL4	2,83	5,40483E-07
Hs.80706.0.A1_3p_a_at	NQO1	2,82	0,00015366
Hs.2.84113.5.S1_3p_s_at	CDKN3	2,82	8,6876E-05
AFFX-	STAT1 /// STAT1	2,81	4,19846E-08

HUMISGF3A/M97935_5_at			
g9280404_3p_at	MXRA5	2,80	4,34792E-06
g1519557_3p_a_at	TIMP3	2,80	1,17494E-06
g13374556_3p_x_at	ZNF117	2,80	7,96046E-08
Hs.21858.2.A1_3p_at	SERPINE2	2,79	1,54993E-09
g4502380_3p_a_at	BCL2L1	2,77	6,44884E-10
Hs.17778.4.A1_3p_at	NRP2	2,77	1,87144E-07
g7415720_3p_a_at	SCD	2,77	0,000500267
Hs.103391.0.A2_3p_s_at	IGFBP5	2,76	5,02866E-06
g183115_3p_a_at	IGFBP3	2,75	1,68619E-08
g538208_3p_a_at	ELK1	2,74	7,04361E-09
229860_3p_x_at	C4orf48	2,72	7,12355E-08
g11993936_3p_s_at	SCD	2,71	0,000100186
207714_3p_s_at	SERPINH1	2,71	4,36594E-11
g12734643_3p_a_at	CDKN3	2,69	3,78835E-05
Hs.74335.1.S1_3p_a_at	HSP90AB1	2,68	2,62812E-11
g4504548_3p_at	TNC	2,68	0,000251874
Hs.132898.0.S2_3p_a_at	FADS1 /// MIR1908	2,67	5,57632E-06
Hs.89643.0.A1_3p_a_at	TKT	2,67	1,28418E-05
Hs.154993.0.A1_3p_at	XAF1	2,66	1,15169E-06
Hs.119129.0.A2_3p_at	COL4A1	2,64	7,94242E-10
Hs.5025.0.A2_3p_at	NEBL	2,62	1,53909E-06
Hs.285754.1.S1_3p_a_at	MET	2,61	5,04795E-05
g6073830_3p_a_at	TPX2	2,61	1,67822E-05
Hs.302073.0.S1_3p_s_at	CALU	2,60	5,68509E-08
Hs.33033.0.A1_3p_at	PLXDC2	2,59	1,54357E-06
Hs.247280.3.A1_3p_a_at	RBCK1	2,58	6,16603E-07
Hs.72639.0.A1_3p_at	---	2,56	5,30548E-05
Hs.119571.0.A1_3p_a_at	COL3A1	2,56	1,13349E-10
g7416119_3p_at	UBE2T	2,56	9,72386E-06
g1244509_3p_a_at	NREP	2,56	3,84159E-09
Hs.109798.0.A1_3p_at	---	2,54	6,58644E-08
g4507154_3p_a_at	SORD	2,54	1,12409E-05
210805_3p_x_at	LOC100506403 /// RUNX1	2,54	2,31488E-12
Hs2.432419.1.S1_3p_s_at	LINC00152 /// LOC541471	2,54	3,26462E-09
g4502858_3p_s_at	CKS2	2,53	0,000125796
Hs.83883.0.S2_3p_at	PMEPA1	2,53	4,65947E-08
g4557384_3p_at	C3	2,51	1,68094E-06
Hs.119597.0.A2_3p_a_at	SCD	2,51	2,69877E-06
Hs.226801.0.S1_3p_at	FMNL2	2,50	1,69315E-10
Hs.260150.1.S1_3p_a_at	PACS1	2,49	1,22888E-06
g4505046_3p_a_at	LUM	2,49	4,82354E-08
Hs.12913.0.S1_3p_at	WWC3	2,49	1,01317E-09
Hs2.379564.6.S1_3p_s_at	LOC100506453 /// LOC389906 /// LOC729162	2,49	6,40745E-05



g184426_3p_a_at	HSPG2	2,48	6,66027E-07
g4502396_3p_x_at	CFB	2,47	1,10814E-07
218000_3p_s_at	PHLDA1	2,47	3,01708E-06
Hs.2.392171.1.A1_3p_at	---	2,47	1,21345E-05
g6912245_3p_at	CD3EAP	2,47	4,18734E-06
g9910497_3p_a_at	PMEPA1	2,46	9,83053E-09
g4505178_3p_s_at	MGP	2,45	7,4934E-05
Hs.82101.0.S2_3p_at	PHLDA1	2,45	8,51991E-06
g12652656_3p_s_at	CCND1	2,45	3,53603E-10
AFFX- HUMISGF3A/M97935_MB_at	STAT1 /// STAT1	2,44	8,71113E-09
4902565C_3p_at	MRC2	2,43	4,33936E-07
4862730_3p_s_at	CELSR1	2,43	1,06121E-06
Hs.285753.0.S2_3p_at	STMN3	2,43	1,6994E-07
g4758865_3p_a_at	NREP	2,42	1,33254E-08
Hs.129061.0.S1_3p_at	C16orf88	2,41	2,16392E-08
Hs.133294.1.S1_3p_a_at	IQGAP3	2,40	2,37232E-06
Hs.21599.0.S2_3p_at	KLF7	2,40	6,88272E-07
g9257247_3p_at	TIMP2	2,39	2,77721E-07
g4996892_3p_a_at	HSPB1	2,39	6,28223E-08
Hs.240849.0.A1_3p_at	GBP4	2,39	2,15918E-06
Hs.156346.0.S1_3p_a_at	TOP2A	2,38	0,000155996
Hs.274446.2.A1_3p_a_at	EVC	2,37	4,60035E-07
Hs.48778.1.S1_3p_at	ANO6	2,37	6,59326E-06
g11641412_3p_s_at	CDC25B	2,37	1,48588E-09
g13447748_3p_a_at	FGFRL1	2,37	1,56694E-08
g8922284_3p_a_at	PACS1	2,36	3,3811E-06
g10257434_3p_s_at	RCN3	2,36	3,28637E-05
g12804610_3p_at	ANKRD10	2,36	2,51139E-08
Hs.288850.0.S1_3p_at	PHLDA1	2,36	4,67594E-05
g9966884_3p_at	CD248	2,36	3,22989E-05
Hs.297909.0.S1_3p_s_at	COL3A1	2,35	4,69338E-08
g10863087_3p_a_at	GREM1	2,34	0,00010509
g10834975_3p_a_at	GPX1	2,34	1,45051E-08
g5902145_3p_at	UBE2C	2,34	6,20504E-06
Hs.176139.0.S1_3p_at	---	2,34	1,42661E-07
Hs.75617.0.A2_3p_at	COL4A2	2,33	9,49459E-08
g13536990_3p_s_at	NPM1	2,33	2,46234E-06
Hs.288706.0.A1_3p_s_at	LOC220906 /// RPL7L1	2,33	2,13813E-07
Hs.180780.1.S1_3p_a_at	FAM60A	2,32	2,35775E-07
Hs.2.133294.1.A1_3p_s_at	IQGAP3	2,31	6,72E-07
g11056051_3p_x_at	FCGR2A	2,31	1,24509E-07
Hs.321129.0.S1_3p_s_at	OSBPL8	2,31	1,0297E-07
g13259549_3p_at	IFI6	2,31	5,44758E-13
Hs.154993.0.A1_3p_x_at	XAF1	2,31	1,72063E-06

g4505154_3p_at	MEST	2,31	1,79045E-06
Hs.97387.0.A1_3p_at	---	2,31	2,93926E-08
Hs.103391.0.A2_3p_at	IGFBP5	2,31	1,7739E-05
g4502734_3p_s_at	CDK4	2,30	1,02891E-07
Hs.82646.0.A1_3p_a_at	DNAJB1	2,30	1,0452E-06
g4504040_3p_at	GNAI2	2,30	1,56647E-08
Hs.122156.0.A1_3p_at	---	2,30	1,33479E-06
Hs.102948.1.S1_3p_x_at	PDLIM7	2,28	8,4311E-07
g5901560_3p_s_at	VEGFA	2,28	9,20178E-10
Hs2.8854.2.S1_3p_a_at	MIR1204 /// PVT1	2,27	1,91052E-08
Hs.285754.0.S2_3p_at	MET	2,27	3,0236E-06
g6653583_3p_a_at	AXIN2	2,27	2,87621E-06
Hs.287820.2.A1_3p_s_at	FN1	2,27	5,34417E-09
Hs2.434248.1.S1_3p_s_at	PHF20	2,26	1,61208E-08
Hs.76640.1.A1_3p_a_at	RGCC	2,25	6,20294E-06
Hs.78202.3.S1_3p_a_at	SMARCA4	2,25	9,22734E-07
g13518025_3p_a_at	LIMS1	2,25	5,0882E-09
g4758017_3p_x_at	CNN2	2,24	1,28465E-13
g13161183_3p_at	CYP2S1	2,24	1,62175E-06
g4758027_3p_at	COL6A3	2,24	3,41059E-08
g11034808_3p_s_at	PTRF	2,24	1,71644E-05
Hs.298184.0.S3_3p_at	KCNAB2	2,24	2,75468E-07
Hs.107169.0.S1_3p_a_at	IGFBP5	2,23	1,35135E-05
Hs2.381331.1.A1_3p_at	---	2,23	5,51623E-06
Hs.66170.1.A1_3p_a_at	SMYD2	2,22	4,06843E-09
Hs.296176.1.A1_3p_at	SOCS3	2,22	0,000771454
Hs.199316.0.A1_3p_at	FOXP4	2,22	2,83389E-07
g12408012_3p_x_at	APOL1	2,22	3,87895E-05
g11527778_3p_at	EIF4EBP1	2,22	2,95012E-07
200808_3p_s_at	ZYX	2,21	1,42569E-07
Hs.278503.1.A1_3p_s_at	DKK3	2,21	2,20957E-07
g4502396_3p_at	CFB	2,21	1,55856E-06
g576934_3p_a_at	BMP4	2,21	2,99248E-06
Hs.84775.0.S1_3p_at	MCFD2	2,20	1,57451E-06
Hs.241257.0.S1_3p_a_at	LTBP1	2,20	7,45278E-08
Hs.184572.0.S2_3p_at	CDK1	2,20	0,000971518
Hs.296288.0.A1_3p_at	PHLDB2	2,19	6,51546E-05
Hs.256315.2.A1_3p_at	ABI2	2,19	8,81338E-09
Hs.36927.1.S1_3p_x_at	HSPH1	2,19	2,08013E-09
Hs.277431.0.S1_3p_s_at	LYZ	2,19	6,6142E-05
Hs.173802.0.S2_3p_at	TBC1D4	2,18	1,59821E-05
Hs.63382.0.S2_3p_at	---	2,17	0,000528157
Hs2.160161.1.S1_3p_at	---	2,16	5,08411E-07
g9502216_3p_a_at	ANKH	2,15	0,000336663
207605_3p_x_at	ZNF117	2,15	2,8805E-07

Hs.182183.0.A1_3p_at	CALD1	2,15	2,77499E-05
Hs.182241.2.S1_3p_x_at	IFITM3	2,15	1,69754E-10
Hs.87385.0.S1_3p_x_at	MALSU1	2,14	6,33994E-08
200824_3p_at	GSTP1	2,14	3,18364E-08
Hs.176139.0.S1_3p_x_at	---	2,13	7,16512E-07
Hs.146360.1.A1_3p_a_at	IFITM1	2,13	1,02132E-08
Hs.8265.0.S2_3p_at	TGM2	2,13	6,40826E-06
Hs.7594.1.A1_3p_a_at	SLC2A14 /// SLC2A3	2,13	2,72538E-05
Hs.292815.0.A1_3p_at	SNHG6 /// SNORD87	2,12	3,79832E-11
Hs.119387.0.S1_3p_a_at	TMEM63A	2,11	9,45889E-06
g13376651_3p_at	ATHL1	2,11	1,98307E-06
g4507170_3p_a_at	LOC100505813 /// SPARC	2,11	7,44142E-13
Hs.296585.0.S1_3p_s_at	MIR1292 /// NOP56 /// SNORD110 /// SNORD57 /// SNORD86	2,11	6,26218E-07
g13470085_3p_a_at	RAI14	2,10	6,87286E-05
g886049_3p_s_at	CASP4	2,10	2,42318E-05
g11493551_3p_at	SCD	2,10	2,10218E-05
g5453789_3p_at	NNMT	2,08	5,3965E-07
g184819_3p_s_at	IGFBP5	2,08	0,00029309
Hs.8939.0.A2_3p_at	YAP1	2,07	2,63245E-11
Hs.184340.0.S1_3p_a_at	MBNL2	2,07	1,57884E-07
g12653766_3p_a_at	SMOX	2,07	4,6221E-05
Hs.102948.1.A1_3p_s_at	PDLIM7	2,07	1,12394E-05
Hs.179662.1.S1_3p_a_at	NAP1L1	2,07	5,17835E-12
Hs2.239500.2.S1_3p_s_at	C16orf13	2,07	1,54686E-11
g2149627_3p_a_at	FCGR2A /// FCGR2C	2,06	1,24935E-07
Hs.75612.2.A1_3p_a_at	STIP1	2,06	1,5933E-05
Hs.296398.1.A1_3p_s_at	LAPTM4B	2,06	0,000194982
Hs.103441.1.S1_3p_a_at	LOC100233156 /// MAFIP /// TEKT4P2	2,05	0,000982154
g12804874_3p_a_at	RRM2	2,04	0,000168551
201841_3p_s_at	HSPB1	2,04	1,74884E-07
Hs.82254.0.S1_3p_a_at	DNAJC2	2,03	3,77885E-06
Hs.195175.8.S1_3p_at	---	2,03	6,7938E-12
g4758017_3p_at	CNN2	2,03	3,00811E-13
g12061050_3p_a_at	GADD45B	2,02	0,000153859
Hs.149846.1.A1_3p_at	ITGB5	2,02	3,04692E-06
Hs2.398195.1.S1_3p_s_at	DCAF13	2,02	7,70154E-06
Hs.279799.1.A1_3p_a_at	PHF11	2,02	5,6337E-09
Hs.149846.1.S1_3p_a_at	ITGB5	2,01	1,64648E-06
g13606055_3p_a_at	PRKDC	2,01	4,27502E-06
Hs.6441.0.A1_3p_a_at	TIMP2	2,01	1,30995E-06
222339_3p_x_at	---	2,01	1,47135E-07
g3560556_3p_at	CSE1L	2,00	3,36898E-05

Hs.62180.0.S2_3p_a_at	ANLN	2,00	1,0776E-05
g4502516_3p_a_at	CA1	-14,02	2,74603E-17
Hs.184507.0.S1_3p_at	ZG16	-13,70	6,06582E-15
g12025666_3p_at	CLCA4	-13,57	2,27017E-15
g4503944_3p_x_at	GCG	-13,02	2,32027E-11
Hs.162209.0.S2_3p_at	CLDN8	-12,58	1,5018E-12
Hs2.5462.2.A1_3p_s_at	SLC4A4	-12,49	5,28231E-17
g8923205_3p_at	MS4A12	-12,40	3,39186E-17
g179794_3p_at	CA2	-12,07	2,18617E-17
g4507024_3p_at	SLC4A4	-11,92	6,23615E-17
g4504208_3p_at	GUCA2A	-11,53	1,29161E-13
Hs2.366575.1.S1_3p_s_at	ABCC13	-11,32	1,72719E-15
g4506816_3p_at	SCNN1B	-11,30	2,33504E-17
g12655880_3p_at	PKIB	-11,13	5,87489E-17
g8886014_3p_a_at	SLC4A4	-11,08	2,26498E-17
g4585468_3p_at	CLCA1	-10,52	1,00609E-14
Hs2.306752.1.S1_3p_at	---	-10,30	7,49092E-15
Hs.12409.0.S1_3p_at	SST	-10,24	1,3247E-11
g4507820_3p_at	UGT2B17	-10,20	1,47701E-09
g10800418_3p_s_at	CHGA	-10,18	2,62803E-17
g11496888_3p_at	ADH1C	-10,15	5,55602E-12
Hs.306376.0.A1_3p_at	---	-10,09	8,17855E-12
g4557534_3p_at	SLC26A3	-9,93	1,10058E-15
g9966888_3p_at	CD177	-9,77	4,79886E-12
g471076_3p_a_at	CEACAM7	-9,56	2,95936E-15
g8923128_3p_at	NXPE4	-9,32	1,18939E-14
g5901929_3p_at	CEACAM7	-9,19	1,23351E-14
g178099_3p_a_at	ADH1B	-8,94	2,07658E-16
g11545810_3p_at	CHP2	-8,55	9,07539E-14
g2253375_3p_a_at	CEACAM7	-8,52	3,39093E-14
g7657318_3p_at	ADAMDEC1	-8,39	2,84038E-15
Hs2.377003.1.S1_3p_at	LOC340184	-8,28	3,07319E-14
g4503680_3p_at	FCGBP	-8,23	3,48159E-12
Hs.82204.0.A1_3p_at	C2orf88	-7,87	1,61095E-15
g5174396_3p_at	B3GALT5	-7,81	2,11656E-12
Hs2.374720.1.S1_3p_at	NXPE1	-7,63	1,74338E-14
g9082136_3p_s_at	DHRS9	-7,59	1,3878E-12
g7657620_3p_at	SULT1B1	-7,37	5,25018E-13
Hs2.374720.2.S1_3p_at	NXPE1	-7,35	3,99394E-15
Hs.64179.2.S1_3p_a_at	FKBP1A-SDCBP2 /// SDCBP2	-7,35	2,42608E-13
Hs.225949.1.S1_3p_a_at	BTNL3	-7,33	7,1699E-13
Hs.73853.0.S2_3p_at	BMP2	-7,27	3,8531E-14
g7669513_3p_a_at	NRG1	-7,27	1,52276E-12
Hs.284199.0.S1_3p_at	MUC12	-7,20	2,95628E-13
g9507232_3p_s_at	UGT1A8 /// UGT1A9	-7,20	8,69609E-11

Hs.163924.0.A1_3p_at	---	-7,19	3,34793E-15
Hs.306903.0.A1_3p_at	---	-7,15	1,49432E-13
Hs.105352.0.S1_3p_at	ST6GALNAC1	-7,09	1,52801E-12
g8096220_3p_at	ITLN1	-7,04	4,60371E-10
Hs.188518.0.S1_3p_at	MT1M	-7,04	2,98816E-10
g8400731_3p_a_at	SFRP1	-7,04	4,35629E-12
217022_3p_s_at	IGH@ /// IGHA1 /// IGHA2	-7,04	6,49894E-13
Hs.191098.0.A1_3p_at	SEMA6D	-6,99	2,30126E-16
Hs.7363.1.A1_3p_a_at	MFSD4	-6,83	3,80658E-11
g10312151_3p_a_at	CCL28	-6,74	2,31148E-14
Hs.33455.0.S2_3p_at	PADI2	-6,73	1,22687E-14
1561387_3p_a_at	NXPE1	-6,73	4,36486E-14
Hs.5344.1.A1_3p_s_at	CA12	-6,71	2,36029E-12
Hs.124660.0.S1_3p_at	C10orf99	-6,70	3,85378E-14
Hs2.374720.2.S1_3p_a_at	NXPE1	-6,69	7,65937E-12
Hs.205126.0.A1_3p_a_at	PIGR	-6,69	2,87563E-11
232885_3p_at	BBIP1	-6,63	1,51729E-12
g4505674_3p_a_at	PDE9A	-6,62	1,86686E-12
Hs.188518.0.S1_3p_x_at	MT1M	-6,58	3,18928E-10
Hs.284199.0.S1_3p_x_at	MUC12	-6,55	3,24874E-13
Hs.326779.0.A1_3p_s_at	---	-6,48	8,67472E-10
g4504498_3p_at	HSD11B2	-6,48	1,44434E-14
Hs.7363.0.A1_3p_x_at	MFSD4	-6,44	2,0732E-11
g13376395_3p_x_at	CES3	-6,44	7,7783E-11
g4505198_3p_at	NR3C2	-6,40	3,28468E-16
Hs.163271.0.S1_3p_s_at	IGHA1	-6,40	3,85878E-14
Hs.306833.0.A1_3p_x_at	---	-6,37	1,71962E-08
g4505284_3p_at	MUC2	-6,37	3,02685E-08
g4826753_3p_at	FGFBP1	-6,34	7,14457E-11
Hs.293441.3.A1_3p_s_at	IGH@ /// IGHA1 /// IGHA2	-6,33	1,40866E-13
Hs.168732.0.A1_3p_x_at	MDM2	-6,31	3,04975E-12
Hs.168732.0.A1_3p_at	MDM2	-6,30	2,32403E-12
g9963852_3p_at	SEMA6A	-6,29	2,81625E-15
Hs.241569.0.A1_3p_at	CPM	-6,27	1,97414E-14
Hs.302738.0.S2_3p_at	SLC26A2	-6,23	1,11764E-13
g13236541_3p_a_at	DHRS11	-6,21	1,88748E-14
g4505638_3p_a_at	PCK1	-6,13	1,32378E-12
g4759235_3p_at	TSPAN7	-6,09	2,24468E-15
g2739163_3p_at	CCL15	-6,08	2,22638E-11
g11034812_3p_a_at	MUC4	-6,08	2,3312E-10
Hs.84905.0.S1_3p_at	KRT20	-6,05	7,06792E-13
Hs.173343.0.A1_3p_at	---	-6,04	4,32448E-11
Hs.29981.0.S2_3p_at	SLC26A2	-5,98	4,27487E-11
g12653028_3p_a_at	CA12	-5,94	2,1559E-12
Hs.302738.0.S1_3p_at	SLC26A2	-5,87	1,12252E-11

Hs.22971.0.A1_3p_at	---	-5,87	6,61488E-10
Hs.21103.0.S1_3p_at	CLIC5	-5,87	2,89751E-11
Hs.285290.0.A1_3p_at	---	-5,83	6,427E-14
g4557576_3p_at	FABP1	-5,83	6,09437E-12
Hs.4984.0.S1_3p_at	AHCYL2	-5,79	2,62217E-14
214164_3p_x_at	CA12	-5,72	2,61392E-12
Hs.148661.0.A1_3p_x_at	IGKC	-5,70	1,13496E-10
Hs2.243272.1.S1_3p_s_at	NKX2-3	-5,66	1,1033E-10
Hs.79881.0.S1_3p_at	---	-5,64	9,21903E-13
Hs.267158.0.A1_3p_at	CPM	-5,60	2,27053E-12
g6434903_3p_at	TSPAN1	-5,51	6,34922E-13
g5453933_3p_at	POU2AF1	-5,48	1,83252E-10
Hs.272366.0.S1_3p_x_at	IGHD	-5,47	8,70007E-09
g12584207_3p_s_at	RETNLB	-5,46	7,53898E-07
Hs.5241.2.A1_3p_at	FABP1	-5,45	8,43355E-12
Hs.77348.0.S1_3p_a_at	HPGD	-5,45	7,72518E-14
g7662241_3p_a_at	ARHGAP44	-5,44	5,58098E-11
g10835084_3p_x_at	MT1H	-5,42	7,50707E-10
g12804852_3p_s_at	IGHM	-5,40	1,92611E-08
Hs.288973.2.A1_3p_at	---	-5,35	1,68957E-10
Hs.76325.1.A1_3p_at	IGJ	-5,33	7,15111E-13
g6912579_3p_s_at	SPDEF	-5,30	3,5774E-06
g12656020_3p_at	C15orf48	-5,30	9,0486E-14
g4502684_3p_a_at	CD79A	-5,29	3,03776E-11
Hs.79414.2.S1_3p_s_at	SPDEF	-5,29	3,74685E-06
g7706157_3p_at	PLAC8	-5,28	2,87799E-11
Hs.42945.0.A1_3p_at	SMPDL3A	-5,28	1,96851E-12
Hs.288711.0.S1_3p_x_at	IGHM	-5,26	4,86412E-05
g11612675_3p_a_at	FXD3	-5,24	5,45167E-15
g5031560_3p_at	GPA33	-5,24	9,20805E-12
Hs.79414.1.S1_3p_s_at	SPDEF	-5,24	4,94806E-06
g4758421_3p_at	GCNT3	-5,22	3,72253E-09
Hs.50964.3.S2_3p_at	CEACAM1	-5,17	1,83353E-11
Hs.147924.0.A1_3p_at	ANO7	-5,17	5,46907E-11
Hs.263395.1.S1_3p_at	SEMA6A	-5,16	7,66943E-15
Hs.76325.1.A1_3p_x_at	IGJ	-5,10	8,01795E-13
g4758321_3p_a_at	KLF4	-5,08	2,41918E-13
g5031750_3p_at	HMGCS2	-4,97	2,28431E-08
g4557368_3p_a_at	BMP2	-4,96	6,4395E-13
g398493_3p_s_at	LOC96610	-4,92	2,87801E-08
g4557576_3p_s_at	FABP1 /// PRDM10	-4,90	9,52685E-11
Hs.42699.0.A1_3p_at	THBS1	-4,78	3,88745E-10
g9951924_3p_at	CA12	-4,78	1,09593E-11
Hs2.434228.1.S1_3p_at	TMPRSS2	-4,77	3,36866E-12
Hs.6634.0.S1_3p_at	PARM1	-4,77	6,07539E-13

234632_3p_x_at	---	-4,76	6,77686E-09
g13112010_3p_at	MALL	-4,73	1,39423E-12
g4759307_3p_a_at	VIPR1	-4,69	4,0856E-12
Hs.95612.0.A1_3p_at	DSC2	-4,66	2,67294E-11
g5803016_3p_at	FOSB	-4,66	4,44174E-08
g4502094_3p_s_at	ANPEP	-4,63	1,85527E-06
Hs.82132.1.S1_3p_a_at	IRF4	-4,57	3,47645E-09
Hs.127828.1.A1_3p_at	---	-4,57	7,98988E-14
Hs.247898.0.A1_3p_s_at	---	-4,57	6,4684E-09
Hs.288553.0.S1_3p_s_at	IGHV4-31	-4,57	1,24381E-09
Hs.306833.0.S1_3p_x_at	---	-4,56	2,63618E-08
g4502850_3p_at	CKB	-4,52	7,27482E-12
g8923550_3p_at	SEMA4G	-4,48	2,32402E-11
Hs.59507.1.A1_3p_at	LOC100505633	-4,46	2,24986E-07
g4557734_3p_a_at	MAOA	-4,45	3,85037E-11
Hs.14757.0.A1_3p_at	---	-4,45	2,64153E-10
217227_3p_x_at	CYAT1 /// IGLV1-44	-4,45	9,4745E-11
214916_3p_x_at	IGHA1 /// IGHG1 /// IGHM /// IGHV3-23 /// IGHV4-31	-4,44	4,17321E-09
Hs.100686.0.A1_3p_at	AGR3	-4,44	3,17477E-07
234764_3p_x_at	IGLV1-44	-4,44	1,41268E-09
Hs.87773.0.S2_3p_at	PRKACB	-4,39	1,02386E-12
Hs.218707.0.A1_3p_at	CCL28	-4,35	1,59504E-11
g13376764_3p_at	PIGZ	-4,35	3,34558E-09
Hs.5541.1.A1_3p_at	ATP2A3	-4,34	1,10229E-13
234792_3p_x_at	IGHA1 /// IGHV4-31 /// LOC100291917	-4,33	7,56445E-10
Hs.323936.0.S1_3p_x_at	IGKC	-4,33	9,04416E-11
Hs.321110.0.S1_3p_x_at	MUC5B	-4,32	2,23404E-07
g13129087_3p_at	ELOVL6	-4,31	5,82202E-09
Hs.323936.0.S1_3p_at	IGKC	-4,31	5,75818E-11
g4557426_3p_at	ENTPD5	-4,31	4,2029E-15
Hs.4984.1.S1_3p_a_at	AHCYL2	-4,30	2,30419E-14
222268_3p_x_at	MUC5B	-4,29	2,17279E-07
g13435365_3p_a_at	DSC2	-4,29	3,55297E-11
Hs.301365.0.S1_3p_s_at	IGHM	-4,28	8,15609E-08
Hs.314762.0.S1_3p_at	LOC642838	-4,27	2,51851E-07
Hs.293380.0.A1_3p_at	AGR2	-4,25	9,12391E-07
Hs.288973.1.S1_3p_a_at	SELENBP1	-4,24	7,13512E-14
Hs.285885.0.S1_3p_x_at	MIER3	-4,22	8,85236E-11
Hs.248043.0.S1_3p_x_at	IGLL5	-4,20	7,47483E-10
g398493_3p_at	LOC96610	-4,20	4,84228E-09
Hs.247847.0.S1_3p_at	---	-4,18	9,71615E-11
217557_3p_s_at	CPM	-4,18	8,14902E-14
g11342673_3p_at	PIGR	-4,17	2,7618E-09

Hs.11114.0.A1_3p_at	TP53INP2	-4,16	1,03292E-12
1561421_3p_a_at	---	-4,15	9,77671E-10
Hs.95110.0.S1_3p_s_at	PLCD3	-4,14	6,03447E-11
Hs.321110.0.S1_3p_at	MUC5B	-4,14	2,52923E-07
g4885590_3p_a_at	SEPP1	-4,14	3,44276E-11
g5729886_3p_at	IQGAP2	-4,13	6,14201E-14
g4505848_3p_s_at	PLA2G2A	-4,13	1,72487E-08
211637_3p_x_at	IGHG1	-4,12	3,57982E-09
Hs2.380094.1.S1_3p_s_at	PLCD3	-4,12	8,51056E-10
Hs.5541.2.A2_3p_a_at	ATP2A3	-4,08	1,74489E-11
Hs.12896.0.S1_3p_at	SATB2	-4,05	1,17732E-07
g8923191_3p_at	FAM46C	-4,05	7,91137E-14
g13537517_3p_at	ANGPTL1	-4,03	6,97519E-11
224342_3p_x_at	LOC96610	-4,03	3,03496E-09
Hs.294158.1.S1_3p_s_at	TPSAB1 /// TPSB2	-4,02	3,12599E-08
Hs.137274.0.A1_3p_at	EFNA2	-4,01	2,87947E-09
Hs.59507.1.A1_3p_x_at	LOC100505633	-3,98	2,69711E-07
g4506056_3p_a_at	PRKACB	-3,98	3,67119E-11
g9506568_3p_a_at	EPB41L4B	-3,97	1,34158E-08
g13540003_3p_s_at	TMPRSS2	-3,97	1,89085E-09
Hs.248081.0.A1_3p_at	---	-3,94	5,32716E-10
Hs.306239.0.S1_3p_at	IGLC1	-3,94	8,72522E-07
g6683748_3p_a_at	MT1F	-3,92	2,03206E-08
g398493_3p_x_at	LOC96610	-3,91	1,57773E-08
Hs.285290.1.A1_3p_at	ENTPD5	-3,91	8,47333E-10
g10337602_3p_at	LEFTY1	-3,90	2,80566E-05
g2739163_3p_s_at	CCL14 /// CCL14-CCL15 /// CCL15	-3,89	8,20311E-10
Hs.247847.0.S1_3p_x_at	---	-3,87	1,09604E-10
g2078479_3p_a_at	FHL1	-3,87	1,44539E-10
Hs2.152384.1.S1_3p_at	---	-3,86	6,99201E-11
Hs.37089.0.S1_3p_x_at	IGKC	-3,86	1,71038E-08
Hs.188631.0.A1_3p_at	LOC100130175	-3,85	6,31488E-11
211639_3p_x_at	IGHD /// IGHG1 /// IGHM	-3,84	4,41467E-08
Hs.248035.0.A1_3p_at	IGHG1	-3,84	8,93778E-08
g13129087_3p_x_at	ELOVL6	-3,83	1,2371E-08
g4503308_3p_at	CFD	-3,81	2,6171E-16
217258_3p_x_at	IGLV1-44	-3,80	5,71056E-11
g12597640_3p_at	LRRC19	-3,80	2,87833E-11
g12654918_3p_a_at	ELOVL6	-3,80	1,86638E-12
g8922827_3p_at	C4orf19	-3,79	5,2482E-10
Hs.126658.0.A1_3p_at	---	-3,78	8,55835E-12
g4505844_3p_at	LOC100652777 /// PLA2G10	-3,77	2,87079E-11
g7661631_3p_at	PARM1	-3,77	1,01803E-12
g13378140_3p_s_at	METTL7A	-3,74	1,80972E-09



242751_3p_at	---	-3,74	3,01684E-12
214777_3p_at	---	-3,72	4,51552E-09
Hs.44343.0.A1_3p_at	ATP8B1	-3,71	2,34475E-10
g9910147_3p_s_at	C8orf4	-3,69	3,63403E-10
Hs.168102.0.S1_3p_at	F2RL1	-3,68	5,47184E-11
Hs.82635.0.S2_3p_at	SLC35D1	-3,68	1,34278E-09
g7657448_3p_at	MIR4680 /// PDCD4	-3,66	5,27507E-13
g8923700_3p_a_at	LGR4	-3,65	5,11306E-10
g13569884_3p_s_at	ITM2C	-3,64	1,6794E-15
g13184045_3p_s_at	CYP4F12	-3,64	3,29264E-09
g4503802_3p_at	FUCA1	-3,62	6,48417E-12
g13186252_3p_a_at	FGFR2	-3,61	1,00009E-06
Hs.296552.1.S1_3p_at	IGLL3P	-3,61	2,67154E-10
g13537517_3p_s_at	ANGPTL1	-3,61	2,23089E-11
Hs.143873.0.A1_3p_at	S100A10	-3,60	9,77472E-12
Hs.49614.0.A1_3p_at	GCET2	-3,57	1,16021E-08
Hs2.375949.1.S1_3p_at	KLHL6	-3,57	4,4812E-08
g6912667_3p_a_at	SLC35A3	-3,56	1,39719E-07
g10835266_3p_at	XK	-3,56	7,83223E-08
g3859848_3p_a_at	FHL1	-3,55	2,35002E-12
Hs.5378.0.S2_3p_a_at	SPON1	-3,54	5,70884E-11
Hs.326248.1.A1_3p_at	MIR4680 /// PDCD4	-3,54	6,91802E-13
g7705261_3p_at	TDP2	-3,54	6,55215E-12
g7661703_3p_a_at	OGN	-3,52	0,000273159
g4507812_3p_at	UGDH	-3,49	2,98985E-15
g7657686_3p_at	ETHE1	-3,48	5,75786E-11
Hs.121194.0.S1_3p_at	HNF4G	-3,46	5,43256E-08
Hs.169600.0.S2_3p_a_at	FRYL	-3,46	1,54117E-08
Hs.296552.1.S1_3p_x_at	IGLL3P	-3,45	1,70117E-10
Hs.151529.0.A1_3p_at	EFNA2	-3,43	5,45384E-09
214768_3p_x_at	IGKC	-3,42	1,33628E-10
Hs.239388.0.A1_3p_at	PAQR8	-3,42	1,61973E-07
Hs2.135715.1.A1_3p_s_at	BCL10	-3,42	7,32829E-09
g4501850_3p_a_at	ABP1	-3,41	4,9172E-11
g10186502_3p_s_at	SIAE	-3,40	3,15191E-08
Hs.247898.0.S1_3p_x_at	CKAP2 /// IGLC1	-3,40	6,69907E-09
Hs.183109.1.S1_3p_at	MAOA	-3,40	2,52662E-11
Hs.24192.0.S2_3p_at	SYNPO2	-3,40	1,68127E-06
g9506660_3p_a_at	FAM134B	-3,39	1,72263E-10
Hs.38038.1.A1_3p_a_at	---	-3,38	4,76593E-11
Hs.239727.0.S1_3p_a_at	DSC2	-3,36	4,82991E-11
Hs.85335.0.A1_3p_at	TMEM30B	-3,35	1,52085E-10
Hs.167115.0.S1_3p_at	ENDOD1	-3,34	1,27077E-10
Hs.12532.0.A2_3p_s_at	C1orf21	-3,33	5,48525E-10
g8923121_3p_s_at	CDHR2	-3,33	4,83473E-08

g7705938_3p_at	RAPGEFL1	-3,32	4,08528E-11
Hs.306357.0.A1_3p_at	IGKC	-3,32	5,06723E-08
Hs.283552.1.S1_3p_a_at	TMEM45B	-3,32	7,5584E-08
Hs.227505.0.A1_3p_at	---	-3,31	1,77578E-07
Hs.293441.3.A1_3p_a_at	IGH@ /// IGHA2	-3,31	8,66356E-10
g10864010_3p_at	SQRDL	-3,31	2,31064E-14
g4503720_3p_at	FHL1	-3,30	3,33624E-11
g9055283_3p_at	MYO5C	-3,30	3,0567E-08
216576_3p_x_at	IGKC	-3,30	1,37936E-09
Hs.6986.0.S1_3p_at	PANK3	-3,28	2,29532E-11
g11545856_3p_at	PBLD	-3,27	8,57353E-06
g6006017_3p_at	LGALS4	-3,25	1,49283E-12
216852_3p_x_at	---	-3,24	3,7625E-08
g5032094_3p_at	SLCO2A1	-3,24	1,93684E-08
g8051581_3p_at	F2RL1	-3,24	3,08493E-10
Hs.171096.0.S1_3p_at	GOLGA2P5	-3,23	4,42036E-09
Hs.109672.0.S2_3p_at	ST6GALNAC6	-3,22	3,16616E-11
Hs.5378.0.S2_3p_x_at	SPON1	-3,22	1,88356E-10
Hs.12082.2.A1_3p_at	EPB41L4A-AS1	-3,22	1,02681E-10
g10835229_3p_a_at	MT1G	-3,22	3,8801E-10
g292072_3p_s_at	LOC100287705 /// PTN	-3,22	1,57528E-08
Hs.144971.0.A1_3p_at	CASD1	-3,21	6,06522E-12
g13529196_3p_at	RNLS	-3,21	2,96089E-07
g4502404_3p_x_at	CEACAM1	-3,20	6,65397E-12
Hs.116467.0.A1_3p_at	PRAC	-3,20	1,99179E-06
Hs.52620.2.S2_3p_at	CDS1	-3,19	1,26277E-08
Hs.227777.0.S5_3p_a_at	PTP4A1	-3,19	6,46977E-13
Hs.248081.0.S1_3p_at	MUC3	-3,18	1,97686E-07
211645_3p_x_at	---	-3,18	1,25852E-08
Hs.332742.0.S1_3p_s_at	HSPB6	-3,17	9,42603E-07
Hs.12017.1.S2_3p_at	NEDD4L	-3,17	7,88062E-13
g4505896_3p_at	PLS1	-3,15	5,82157E-09
Hs2.255890.1.A1_3p_at	---	-3,15	4,89859E-08
Hs.248756.0.S1_3p_x_at	IGKC	-3,14	5,01319E-08
Hs.155538.0.A1_3p_s_at	LPAR5	-3,14	1,48266E-06
Hs2.343765.1.S1_3p_s_at	COX6B2	-3,12	0,000201526
Hs.25910.0.S1_3p_at	MFSD4	-3,12	1,23918E-08
g6631096_3p_x_at	NOX1	-3,11	0,00014334
g13236537_3p_at	FA2H	-3,11	1,24378E-07
g7657310_3p_at	VWA5A	-3,11	6,14492E-09
Hs.11177.0.A1_3p_at	STEAP4	-3,09	3,55628E-06
g11641403_3p_s_at	CKMT1A /// CKMT1B	-3,09	2,98005E-10
Hs.132906.0.A2_3p_at	SLAMF7	-3,09	4,0755E-08
Hs.292437.0.A1_3p_at	---	-3,09	5,41135E-09
Hs.306882.0.S1_3p_at	---	-3,08	9,68698E-08

g3800813_3p_a_at	CMAHP	-3,07	5,49303E-06
g4092066_3p_at	BCL10	-3,07	9,39128E-11
1557275_3p_a_at	TLCD2	-3,07	1,26815E-11
Hs.130749.0.A1_3p_x_at	GGT6	-3,07	4,11556E-13
g4505802_3p_x_at	PIK3CG	-3,07	2,08146E-08
Hs.82432.0.S1_3p_at	GPD1L	-3,06	2,9803E-10
g4502650_3p_at	CD22	-3,06	0,000632765
g5032090_3p_at	SGK1	-3,05	1,60229E-11
217378_3p_x_at	LOC100130100	-3,05	5,11883E-09
Hs.74170.0.S1_3p_x_at	LOC100505584 /// MT1E	-3,05	1,18937E-10
g7662103_3p_a_at	SH3PXD2A	-3,04	1,27971E-08
g5052074_3p_a_at	PAPSS2	-3,04	7,68136E-10
Hs.38038.1.A1_3p_at	---	-3,03	1,79545E-11
g4758879_3p_a_at	PAPSS2	-3,02	3,26794E-08
212593_3p_s_at	MIR4680 /// PDCD4	-3,00	8,54806E-15
Hs.576.1.A1_3p_at	FUCA1	-3,00	2,15995E-11
Hs.122489.0.S2_3p_at	---	-2,99	4,11957E-12
g8923274_3p_at	RETSAT	-2,99	3,22903E-11
Hs.89134.0.A1_3p_at	TRIB1	-2,99	3,47194E-08
209667_3p_at	CES2	-2,98	1,57951E-11
Hs.170162.0.A1_3p_a_at	NHSL1	-2,96	6,83829E-08
Hs.227777.0.S4_3p_a_at	PTP4A1	-2,96	3,03258E-13
g10835009_3p_a_at	CTNND1 /// TMX2-CTNND1	-2,95	3,47135E-08
217138_3p_x_at	---	-2,94	9,31947E-10
Hs.274230.0.S2_3p_a_at	PAPSS2	-2,94	9,67891E-10
Hs.3314.1.A1_3p_at	SEPP1	-2,94	1,15891E-09
g13376748_3p_at	ATP10B	-2,92	1,08443E-06
Hs.165464.0.A1_3p_x_at	RASEF	-2,92	2,60976E-07
216510_3p_x_at	IGHA1 /// IGHG1 /// IGHM /// IGHV3-23 /// IGHV4-31	-2,91	2,81667E-08
g4502404_3p_a_at	CEACAM1	-2,91	3,7865E-11
Hs.170162.1.A1_3p_at	NHSL1	-2,91	2,94824E-09
Hs.326248.0.A1_3p_at	BBIP1	-2,90	2,27518E-14
Hs.198427.0.S3_3p_at	HK2	-2,90	2,29846E-10
Hs.47047.0.A1_3p_at	RASSF6	-2,90	8,5658E-08
Hs.272249.0.S1_3p_at	---	-2,86	8,72009E-11
g8923274_3p_x_at	RETSAT	-2,86	1,15013E-11
g7662259_3p_at	KBTBD11	-2,85	6,09602E-10
Hs.95549.2.A1_3p_at	RBM47	-2,85	5,49221E-08
Hs.99369.0.A1_3p_at	LOC100216546	-2,84	2,0368E-06
Hs.124044.0.A1_3p_at	---	-2,84	2,18736E-06
g7661619_3p_a_at	HIGD1A	-2,82	1,16123E-13
g7657235_3p_at	IMPA2	-2,82	6,36291E-09
g13528881_3p_a_at	FXYD3	-2,82	9,68495E-10
Hs.52620.2.S1_3p_at	CDS1	-2,82	3,87501E-07

Hs.283552.0.S1_3p_x_at	TMEM45B	-2,81	1,04732E-07
Hs.12460.0.S1_3p_at	FBXL14	-2,80	3,52666E-10
Hs.331099.0.A1_3p_at	SNORD3B-1 /// SNORD3B-2 /// SNORD3D	-2,80	3,08677E-08
Hs.288742.0.S1_3p_at	CNST	-2,79	1,56099E-09
g13544008_3p_s_at	EPB41L3	-2,79	6,44917E-07
g4827037_3p_a_at	TPD52	-2,78	1,8934E-09
g7657448_3p_s_at	MIR4680 /// PDCD4	-2,78	6,18874E-13
Hs.184325.0.A5_3p_at	UBE2J1	-2,78	2,66209E-09
Hs.44829.0.A1_3p_at	---	-2,77	4,32776E-11
Hs.117447.0.A1_3p_at	SLC41A2	-2,77	5,98633E-10
g459835_3p_a_at	SRI	-2,77	2,55145E-11
Hs.205126.1.A1_3p_at	PIGR	-2,77	8,84409E-08
Hs.18760.1.S1_3p_a_at	SIPA1L2	-2,77	2,18169E-12
Hs.82567.0.A1_3p_x_at	CCNYL1	-2,76	3,81116E-12
g12711663_3p_x_at	SLAMF7	-2,76	5,83406E-07
212594_3p_at	MIR4680 /// PDCD4	-2,76	9,14997E-12
g6624210_3p_at	AKR1C3	-2,76	5,59262E-06
g11320819_3p_a_at	SPON1	-2,75	1,47499E-05
224339_3p_s_at	ANGPTL1	-2,75	1,80313E-11
g13376867_3p_at	SLC44A4	-2,75	2,38357E-10
g13540528_3p_s_at	BCL2L14	-2,75	2,91432E-06
Hs2.292645.1.A1_3p_at	---	-2,74	1,89732E-06
Hs2.337635.1.S1_3p_x_at	LOC440993	-2,74	2,25941E-08
Hs.196284.0.A1_3p_at	C3orf70	-2,74	8,72137E-06
g425147_3p_a_at	ACVRL1	-2,72	2,12588E-08
Hs.8087.3.A1_3p_at	CAMK1D /// LOC283070	-2,72	1,06788E-06
Hs2.145582.1.S1_3p_s_at	PROM2	-2,72	6,91334E-07
Hs.239388.1.S1_3p_at	PAQR8	-2,71	6,45198E-10
Hs2.376934.1.S1_3p_at	---	-2,71	0,000195078
Hs2.435995.1.S1_3p_s_at	EDIL3	-2,69	3,07259E-06
Hs.92254.1.S1_3p_a_at	SYTL2	-2,69	8,83713E-11
Hs.9167.0.S1_3p_s_at	SH3BGRL2	-2,68	6,48128E-07
Hs.165464.0.A1_3p_at	RASEF	-2,68	4,06698E-07
Hs.89603.6.A1_3p_a_at	MUC1	-2,67	0,000259986
Hs.78746.0.S1_3p_a_at	PDE8A	-2,67	2,96541E-08
g13194196_3p_at	KIF13B	-2,67	3,8407E-09
g6005825_3p_a_at	PACSIN2	-2,67	5,96494E-12
Hs.326248.2.S2_3p_at	BBIP1	-2,66	8,62616E-14
Hs.289088.2.A1_3p_at	PRDM1	-2,65	7,01492E-06
Hs.145377.1.S1_3p_at	---	-2,64	9,46418E-06
232158_3p_x_at	NIPAL1	-2,63	2,40156E-08
g13435965_3p_at	C14orf129	-2,62	1,66027E-05
Hs.94952.0.A1_3p_at	TCEA3	-2,62	1,16409E-06
Hs2.169600.3.A1_3p_at	FRYL	-2,62	7,01535E-05

1557293_3p_at	LOC440993	-2,61	7,00281E-11
Hs.161051.0.S1_3p_at	---	-2,61	1,15176E-06
Hs.154263.0.A1_3p_at	FGD4	-2,61	1,10608E-10
Hs2.213741.1.A1_3p_at	---	-2,61	6,37245E-06
Hs.75309.3.A1_3p_at	HSPB6	-2,60	5,02879E-06
Hs.31412.0.A2_3p_at	SYNPO2	-2,59	0,000107569
Hs.193974.0.S1_3p_at	GSR	-2,58	5,42183E-07
Hs.145377.0.A1_3p_a_at	---	-2,58	2,1392E-06
215176_3p_x_at	LOC642838	-2,58	1,0701E-08
g4504672_3p_at	IL6R	-2,58	1,22857E-06
g12653452_3p_at	GOT1	-2,57	3,24929E-09
Hs2.281721.1.S1_3p_s_at	---	-2,56	6,32911E-07
1562378_3p_s_at	PROM2	-2,55	0,000373451
Hs.85065.0.A1_3p_at	CALCOCO2	-2,55	1,7755E-09
g8096550_3p_a_at	EPB41L4B	-2,54	6,1003E-08
Hs2.382183.1.S1_3p_at	---	-2,54	4,10902E-07
Hs.3593.0.S1_3p_at	GLTP	-2,54	3,61636E-11
Hs.295727.0.A1_3p_at	---	-2,53	6,357E-07
236248_3p_x_at	TADA2B	-2,51	8,9267E-09
Hs.7946.0.S2_3p_a_at	MTUS1	-2,51	4,01512E-09
Hs.138380.0.S1_3p_at	EXPH5	-2,51	2,56365E-06
g6691454_3p_a_at	FGFR2	-2,50	3,47481E-06
227522_3p_at	CMBL	-2,49	6,90481E-07
Hs.247309.0.A1_3p_a_at	SUCLG2	-2,49	2,36134E-07
g4102187_3p_a_at	ABCC3	-2,49	3,12476E-06
Hs.31412.0.A1_3p_at	SYNPO2	-2,48	1,3322E-05
g13279130_3p_a_at	ZNF655	-2,48	1,75039E-10
Hs.82567.0.A1_3p_at	CCNYL1	-2,48	6,37964E-10
g13376141_3p_at	NHEJ1 /// SLC23A3	-2,47	6,73152E-07
Hs.10706.0.A1_3p_a_at	LIMA1	-2,47	1,24719E-06
g7705444_3p_at	SOCS6	-2,47	9,46425E-08
Hs2.271566.1.S1_3p_s_at	---	-2,47	1,4631E-07
Hs.282975.0.A2_3p_a_at	CES2	-2,47	7,10964E-07
g179434_3p_at	CEACAM1	-2,46	2,34715E-07
Hs.109748.0.S1_3p_x_at	TMEM54	-2,46	7,07004E-10
49452_3p_at	ACACB	-2,46	2,783E-05
Hs.246945.0.S1_3p_s_at	SYNPO2	-2,46	0,000214559
g7106422_3p_at	SSBP2	-2,45	1,54284E-06
g9506670_3p_a_at	RBM47	-2,45	5,13619E-11
Hs.290927.0.A1_3p_at	PLXNA2	-2,45	2,38841E-07
Hs.293649.0.A1_3p_at	ACOX1	-2,45	4,57338E-07
g8922687_3p_a_at	AP5M1	-2,44	3,73036E-09
Hs.109358.0.A1_3p_a_at	ATP10B	-2,44	2,60666E-07
Hs.122489.0.S1_3p_at	C4orf34	-2,43	7,65754E-12
g13436100_3p_a_at	FAM107B	-2,43	3,6902E-07

Hs.288858.0.S1_3p_at	---	-2,43	4,09869E-07
g5031776_3p_a_at	IDH3A	-2,43	4,86697E-14
Hs.101799.1.S1_3p_at	USP53	-2,43	3,88509E-08
g4503558_3p_at	EMP1	-2,43	6,84554E-08
Hs.173638.0.S3_3p_at	TCF7L2	-2,42	8,39021E-10
g7669507_3p_a_at	NOX1	-2,42	0,000285597
g483391_3p_at	CDH17	-2,42	6,94021E-07
Hs.3964.0.S1_3p_at	MGLL	-2,41	2,94165E-08
Hs2.282885.1.S1_3p_at	LOC100289019	-2,41	5,40273E-08
Hs.278628.0.S1_3p_at	SHROOM3	-2,40	4,78132E-10
g6691454_3p_x_at	FGFR2	-2,40	1,02648E-06
Hs.77837.3.A1_3p_at	FLJ36848	-2,40	9,14608E-12
Hs.139033.1.S1_3p_s_at	MFAP5	-2,39	0,00025701
Hs.24192.0.S1_3p_at	SYNPO2	-2,39	7,10896E-06
g5729996_3p_s_at	RAB27B	-2,39	0,000458707
Hs.100501.0.A1_3p_at	LOC100505549	-2,38	7,87835E-09
Hs.198232.1.A1_3p_at	RALGAPA1	-2,38	1,85667E-08
g1877030_3p_at	TST	-2,38	3,40214E-09
g12803840_3p_at	C17orf81	-2,38	1,26286E-07
g4505374_3p_at	NEO1	-2,38	2,63685E-10
g7705372_3p_a_at	LIMA1	-2,37	2,17363E-10
g5870890_3p_a_at	MTMR11	-2,36	2,99879E-06
Hs.165337.1.A1_3p_x_at	RAB27A	-2,36	2,14022E-08
g7705754_3p_a_at	PLLP	-2,36	0,000177252
g184269_3p_a_at	ATP2B1	-2,36	8,59256E-09
Hs2.190399.1.S1_3p_s_at	---	-2,36	1,45156E-06
Hs.164989.0.S1_3p_at	PRELID2	-2,36	3,5155E-07
Hs.91109.0.A1_3p_at	PRR15	-2,35	3,21087E-05
Hs.323463.0.S1_3p_x_at	NBPF1 /// NBPF10	-2,35	1,79897E-06
Hs.131624.0.A1_3p_at	GALNT5	-2,35	9,58803E-07
Hs.283552.0.S1_3p_a_at	TMEM45B	-2,33	5,62045E-06
Hs.284205.3.A1_3p_at	---	-2,33	1,83878E-07
Hs.111460.0.A2_3p_x_at	CAMK2D	-2,33	4,57221E-07
Hs.109748.0.S1_3p_at	TMEM54	-2,32	9,49989E-08
Hs.104696.0.S1_3p_a_at	KIAA1324	-2,32	8,37589E-05
g483391_3p_x_at	CDH17	-2,32	1,27573E-06
Hs.101515.0.A1_3p_at	USP53	-2,31	6,22018E-09
Hs.160999.1.A1_3p_at	---	-2,31	8,10905E-08
Hs.620.1.S1_3p_a_at	DST /// LOC100652766	-2,29	1,00883E-07
Hs.24605.0.A1_3p_at	---	-2,29	1,21005E-08
Hs.247309.0.A1_3p_x_at	SUCLG2	-2,28	3,61142E-06
g8923068_3p_a_at	MUC13	-2,27	4,49467E-09
g5817105_3p_s_at	TSC22D3	-2,26	1,37833E-08
Hs2.383932.1.S1_3p_at	---	-2,26	1,3804E-08
Hs.109012.1.A1_3p_x_at	MXD1	-2,25	3,07599E-08

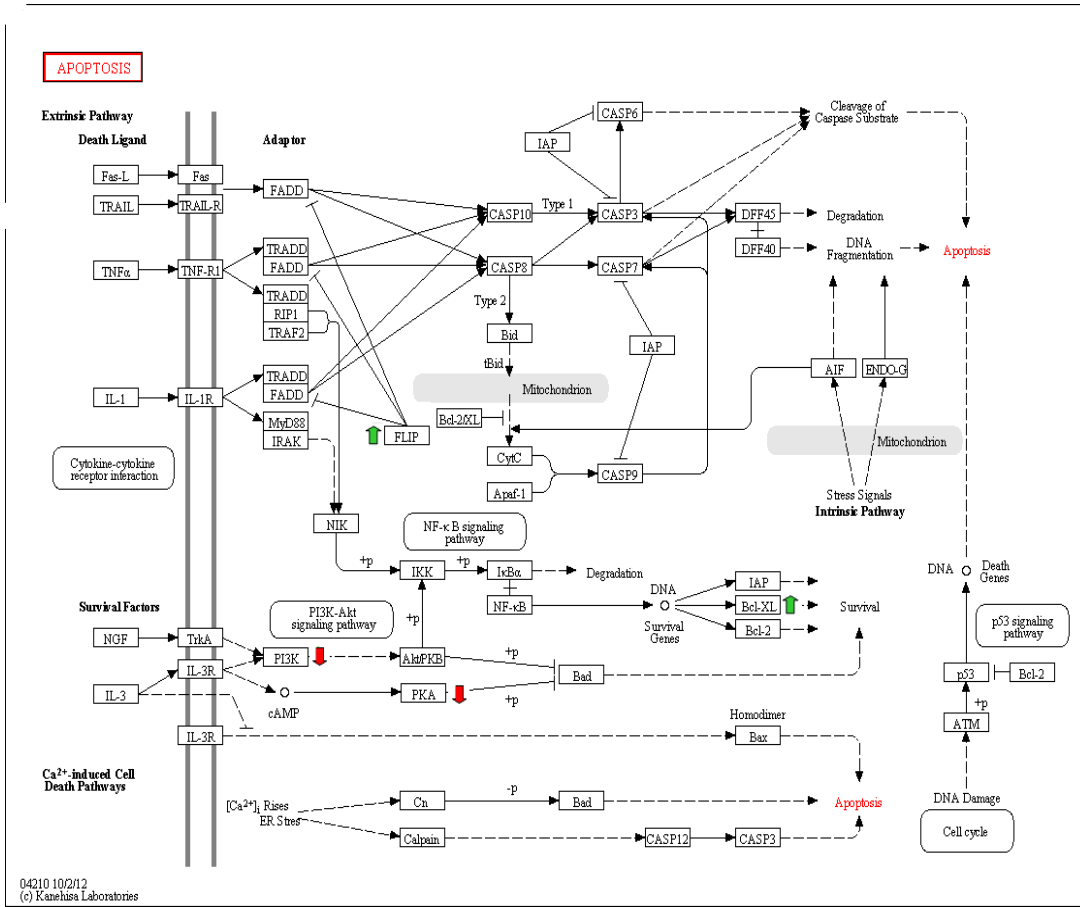
g7106799_3p_a_at	UBE2J1	-2,25	8,43749E-11
Hs.247309.1.S1_3p_a_at	SUCLG2	-2,25	7,2865E-09
Hs.36011.0.A1_3p_at	---	-2,25	7,23515E-07
g5730074_3p_at	FGL2	-2,25	7,46468E-08
g12654782_3p_at	VWA5A	-2,24	1,24548E-07
215949_3p_x_at	IGHM /// LOC100653245	-2,24	1,97041E-08
g12052883_3p_at	GBP3	-2,23	7,38136E-06
g10835026_3p_a_at	MAP2K6	-2,23	1,09516E-05
g12653726_3p_at	UQCRFS1	-2,23	2,1627E-06
g7706155_3p_a_at	KRCC1	-2,22	1,1639E-06
g5725505_3p_a_at	ADAMTS1	-2,22	5,02058E-07
Hs.296276.0.A1_3p_at	FGL2	-2,22	5,77505E-09
g6995995_3p_at	CFTR	-2,21	0,000459138
g10947125_3p_at	ABCD3	-2,21	7,11362E-10
Hs.278611.0.S1_3p_a_at	GALNT3	-2,21	3,60021E-06
Hs.144904.0.S3_3p_at	NCOR1	-2,21	6,50348E-08
g11034854_3p_a_at	TMEM9B	-2,20	7,80234E-10
g12657580_3p_a_at	SLC39A8	-2,20	6,83242E-08
Hs.11899.0.S2_3p_a_at	HMGCR	-2,20	1,3738E-06
227850_3p_x_at	CDC42EP5	-2,20	3,0846E-10
Hs.169600.0.S1_3p_a_at	FRYL	-2,20	1,79751E-09
g7706368_3p_at	BRP44L	-2,20	1,75823E-09
Hs.105500.0.A1_3p_at	---	-2,19	1,89632E-08
Hs.272227.0.S1_3p_at	---	-2,18	6,61805E-05
Hs.99206.0.A1_3p_at	ST7L	-2,18	2,82678E-07
Hs2.351442.2.S1_3p_at	RASEF	-2,18	8,0371E-06
Hs.182265.1.A1_3p_at	KRT19	-2,17	0,000187775
Hs.125608.0.A1_3p_at	C9orf152	-2,17	8,07808E-05
Hs2.18842.3.S1_3p_s_at	PACSIN2	-2,17	2,1343E-10
Hs.321571.0.S1_3p_at	MUC12	-2,17	2,40208E-08
Hs.29716.0.S1_3p_at	FAM214A	-2,17	4,84186E-09
Hs.323512.0.S1_3p_at	CYSTM1	-2,16	4,12578E-10
215946_3p_x_at	IGLL3P	-2,16	1,5895E-08
g4505860_3p_a_at	PLAT	-2,16	8,17049E-07
Hs.209061.0.S3_3p_at	RIOK3	-2,15	6,36732E-09
g3411156_3p_a_at	RPS6KA5	-2,15	3,9922E-09
Hs.150557.0.A2_3p_a_at	KLF9	-2,15	1,56608E-09
g9295191_3p_s_at	FAM162A	-2,14	3,09997E-10
Hs.5476.0.A1_3p_at	SLC25A25	-2,14	7,73575E-07
Hs2Affx.1.249.S1_3p_at	BCL2L11	-2,14	2,08055E-05
g11119427_3p_at	AVPI1	-2,14	1,36473E-05
g4507178_3p_s_at	SPINK1	-2,14	0,000250421
Hs.109012.1.A1_3p_at	MXD1	-2,13	7,30548E-09
g4506814_3p_at	SCNN1A	-2,13	2,69938E-05
Hs.28803.0.A1_3p_at	SLC35A3	-2,12	7,22054E-06

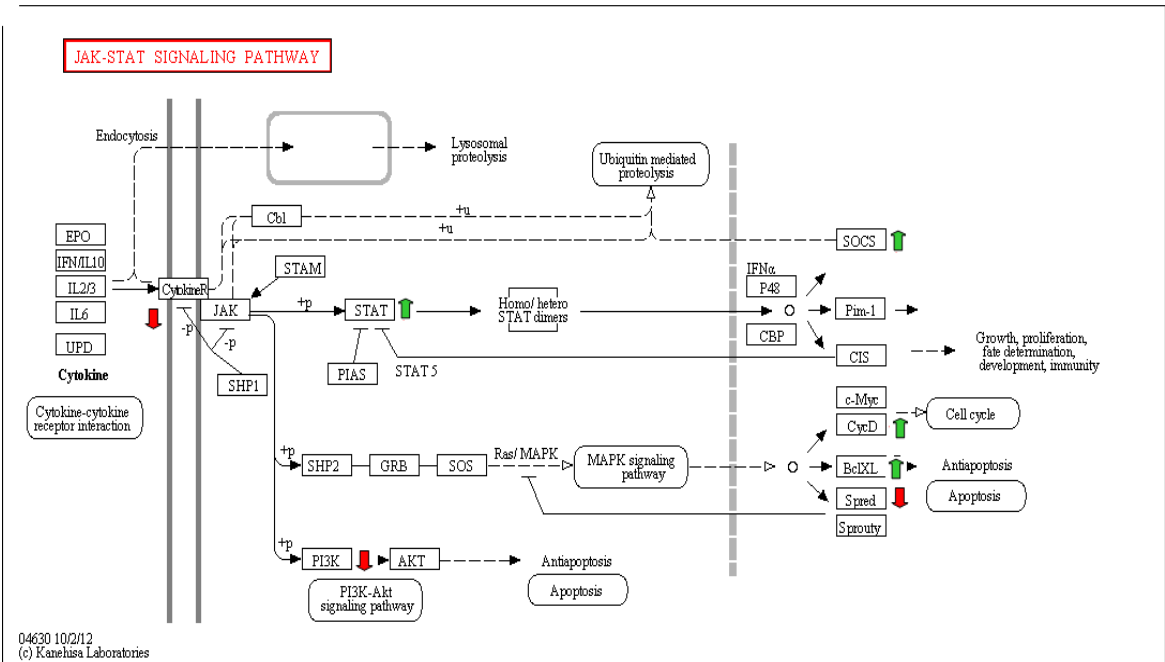
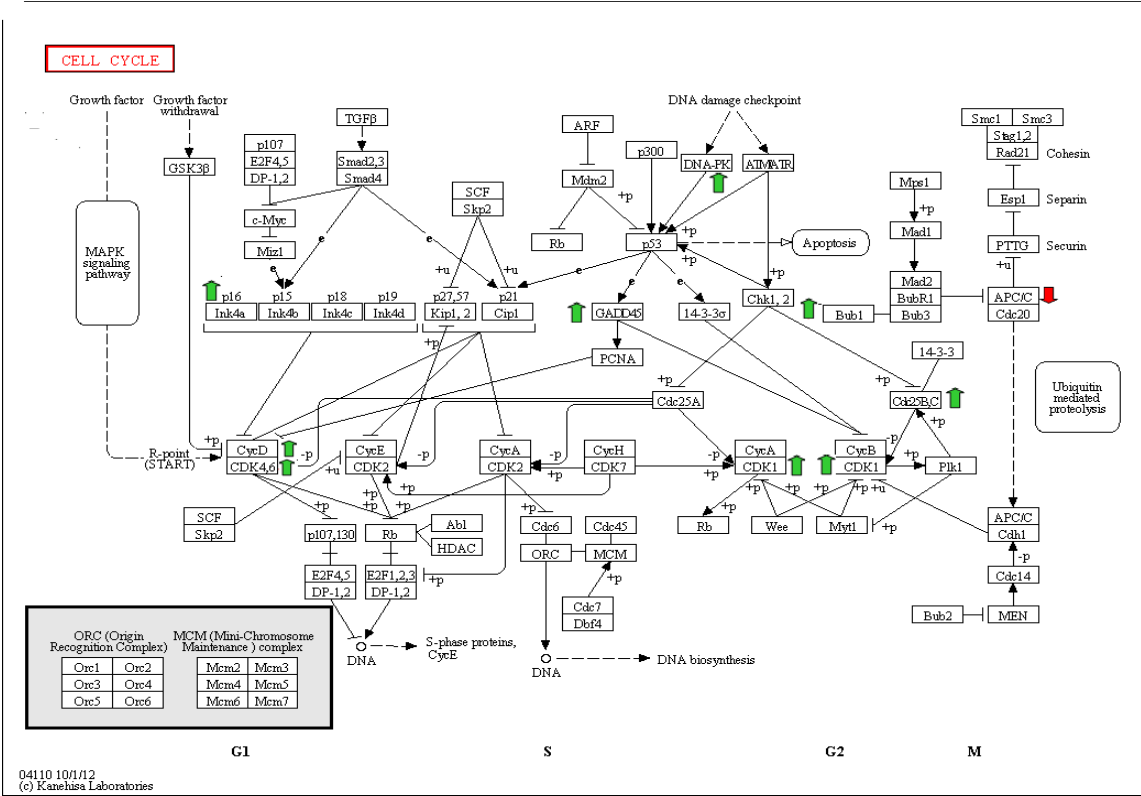
g6382074_3p_at	GNE	-2,12	1,53421E-06
Hs.111460.2.A1_3p_at	---	-2,12	1,0087E-07
Hs.321571.0.S1_3p_x_at	MUC12	-2,11	3,23076E-08
Hs.47099.0.S1_3p_a_at	GALNT12	-2,11	2,95066E-08
223103_3p_at	STARD10	-2,10	1,68582E-08
Hs.113271.1.A1_3p_at	---	-2,10	3,63426E-05
Hs.2384.0.S3_3p_a_at	TPD52	-2,10	3,60417E-06
Hs.13913.0.A1_3p_at	ZSWIM6	-2,10	1,10738E-10
Hs.188465.0.A1_3p_at	WNK4	-2,09	0,000187701
Hs.111460.0.A2_3p_at	CAMK2D	-2,09	6,83306E-08
Hs2.136414.2.S1_3p_s_at	B3GNT5 /// LOC100505668	-2,09	6,85359E-05
Hs.10957.1.A1_3p_at	FAM122A	-2,09	5,59728E-10
1554726_3p_at	ZNF655	-2,08	7,29652E-08
Hs.8087.2.S1_3p_at	CAMK1D /// LOC283070	-2,08	8,49602E-08
Hs.266175.0.S2_3p_at	PAG1	-2,08	1,10916E-06
g9955971_3p_s_at	ABCC3	-2,08	3,09226E-09
Hs.10784.3.S1_3p_a_at	FAM46A	-2,07	2,29155E-06
Hs.21201.0.S2_3p_at	PVRL3	-2,06	4,57644E-06
Hs2.57787.1.S1_3p_s_at	TC2N	-2,06	1,02869E-08
Hs.163603.0.A1_3p_at	---	-2,06	1,11686E-08
g7705904_3p_at	HSD17B11	-2,05	6,10035E-09
Hs.277543.0.S3_3p_at	ACSBG1	-2,05	4,86726E-05
Hs.173638.2.S1_3p_x_at	TCF7L2	-2,05	3,20073E-06
Hs.172803.2.S1_3p_a_at	STARD5	-2,05	7,45704E-08
Hs.165337.1.A1_3p_at	RAB27A	-2,05	1,15379E-06
Hs.306755.0.A1_3p_at	---	-2,05	0,000383956
Hs.312076.0.S1_3p_at	COX16 /// SYNJ2BP-COX16	-2,04	7,87171E-07
230972_3p_at	ANKRD9	-2,04	3,49842E-08
Hs.170345.0.S2_3p_at	THSD4	-2,04	4,80671E-05
g6552324_3p_at	CAPN5	-2,04	6,58223E-09
Hs2.407308.1.S1_3p_s_at	---	-2,03	3,39522E-06
g8923349_3p_a_at	FLVCR2	-2,03	2,31805E-06
Hs.209100.0.S1_3p_at	CCDC69	-2,03	3,4104E-07
Hs.282093.1.A3_3p_at	NFATC3	-2,03	9,69435E-07
Hs.3991.0.A1_3p_at	CDC26	-2,03	3,00564E-07
Hs.106210.0.S1_3p_a_at	AP5M1	-2,02	3,40496E-06
Hs.184598.0.S1_3p_at	RHPN2	-2,02	2,99088E-06
g6996000_3p_a_at	ARF6	-2,02	7,86816E-08
Hs.162189.1.S1_3p_at	KALRN	-2,02	3,82806E-07
Hs2.351804.1.S1_3p_at	---	-2,01	1,79006E-06
Hs.82110.3.S1_3p_at	---	-2,01	1,26176E-07
g4758097_3p_a_at	CTSS	-2,01	1,00671E-07

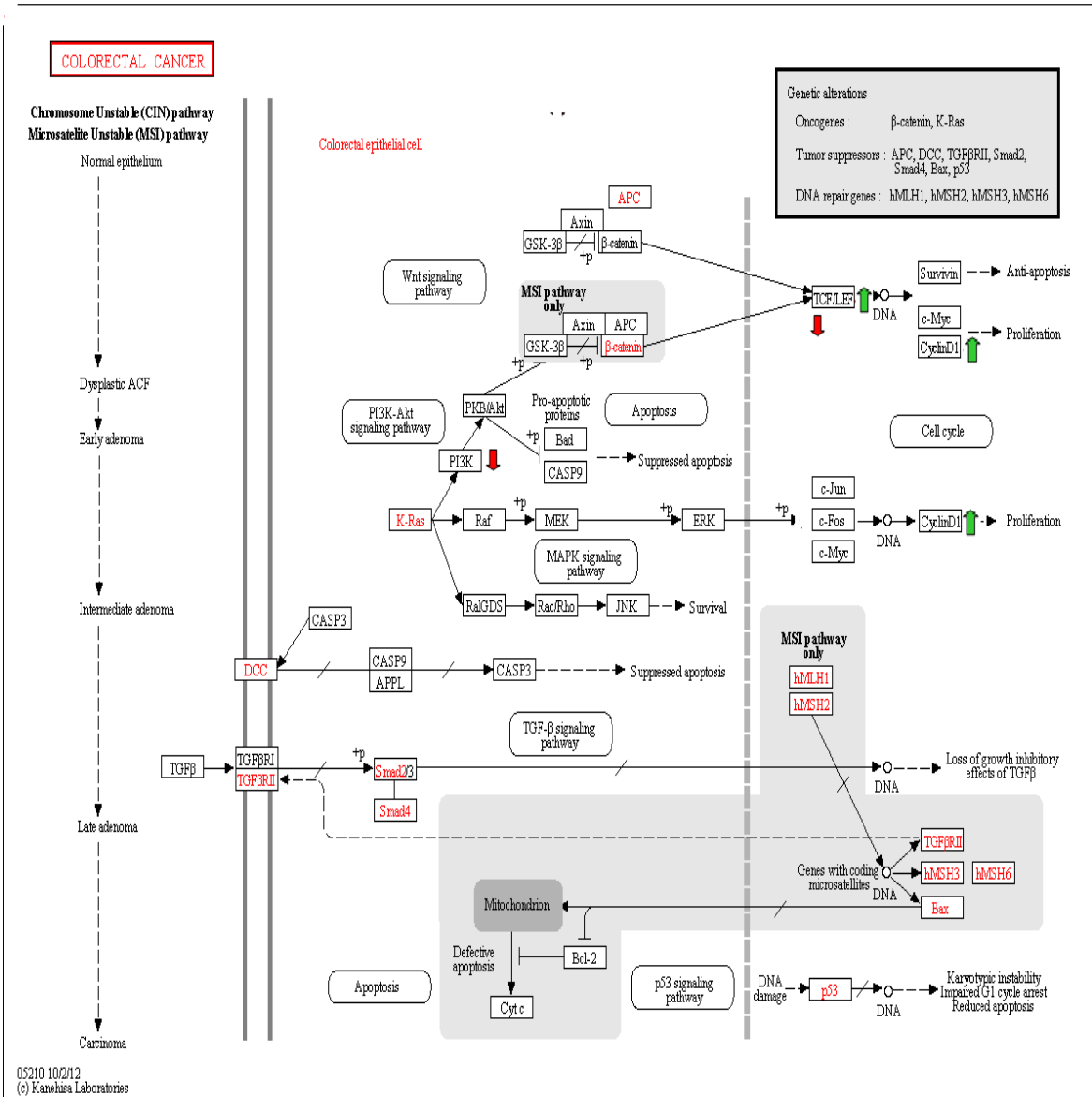


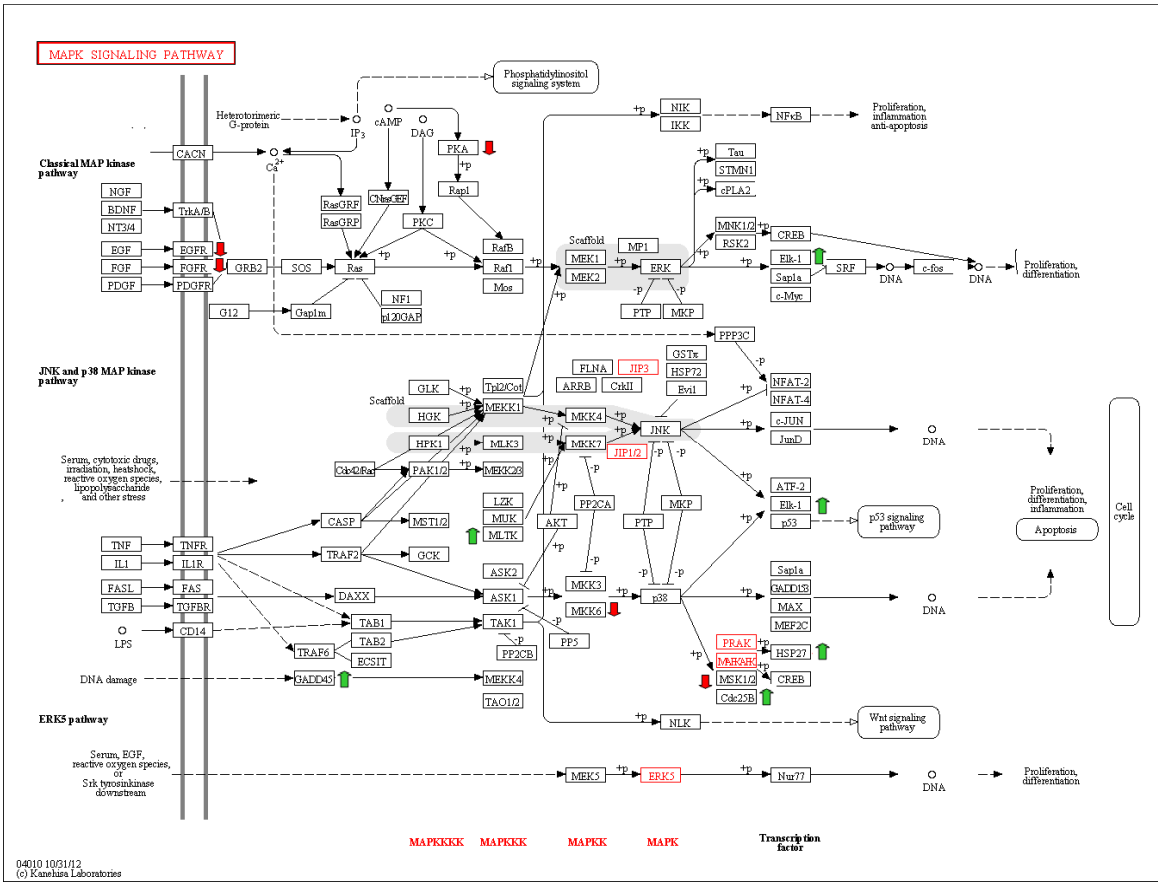
**Ek-3:**

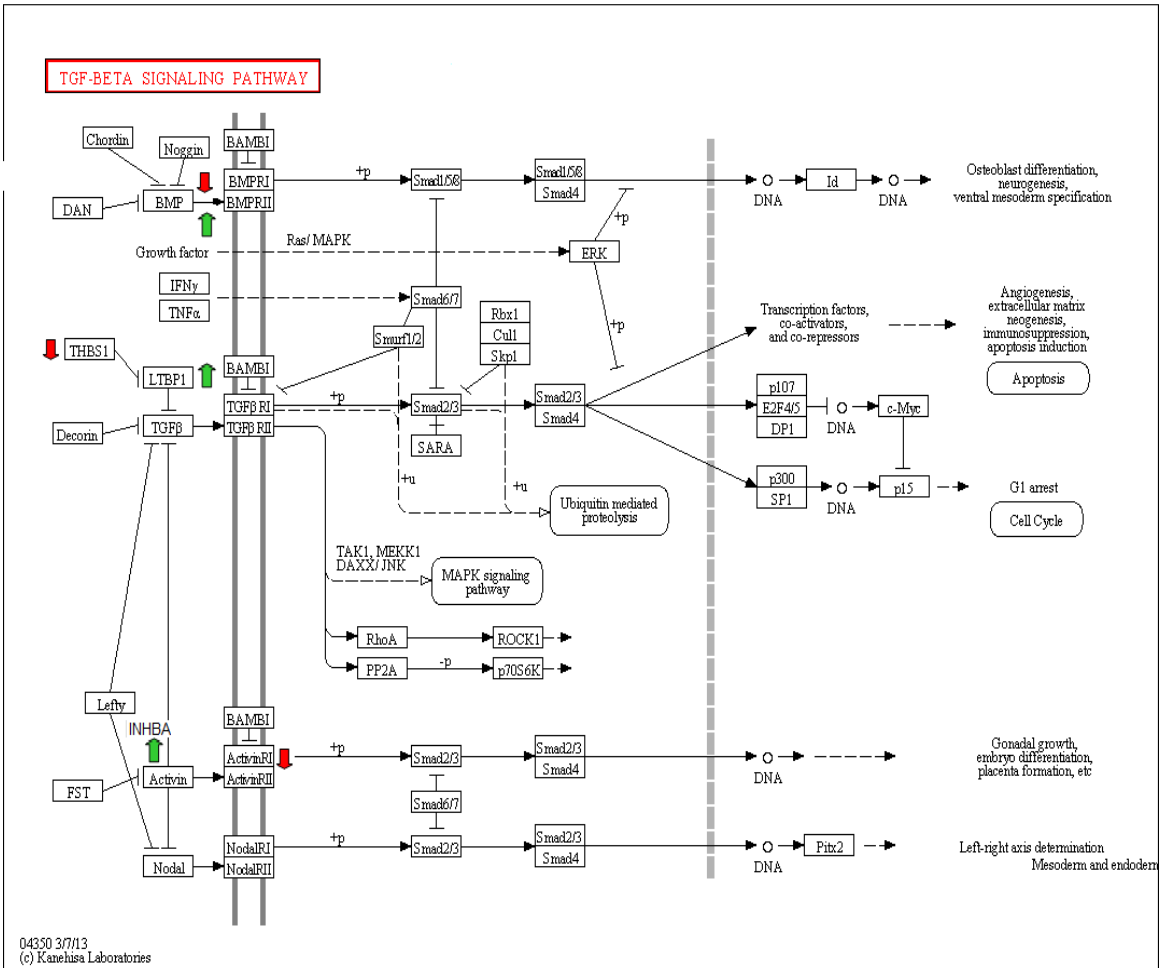
**Tümör-kontrol karşılaştırmasında gen ifade analiz çalışmalarında ön plana çıkan yollar**

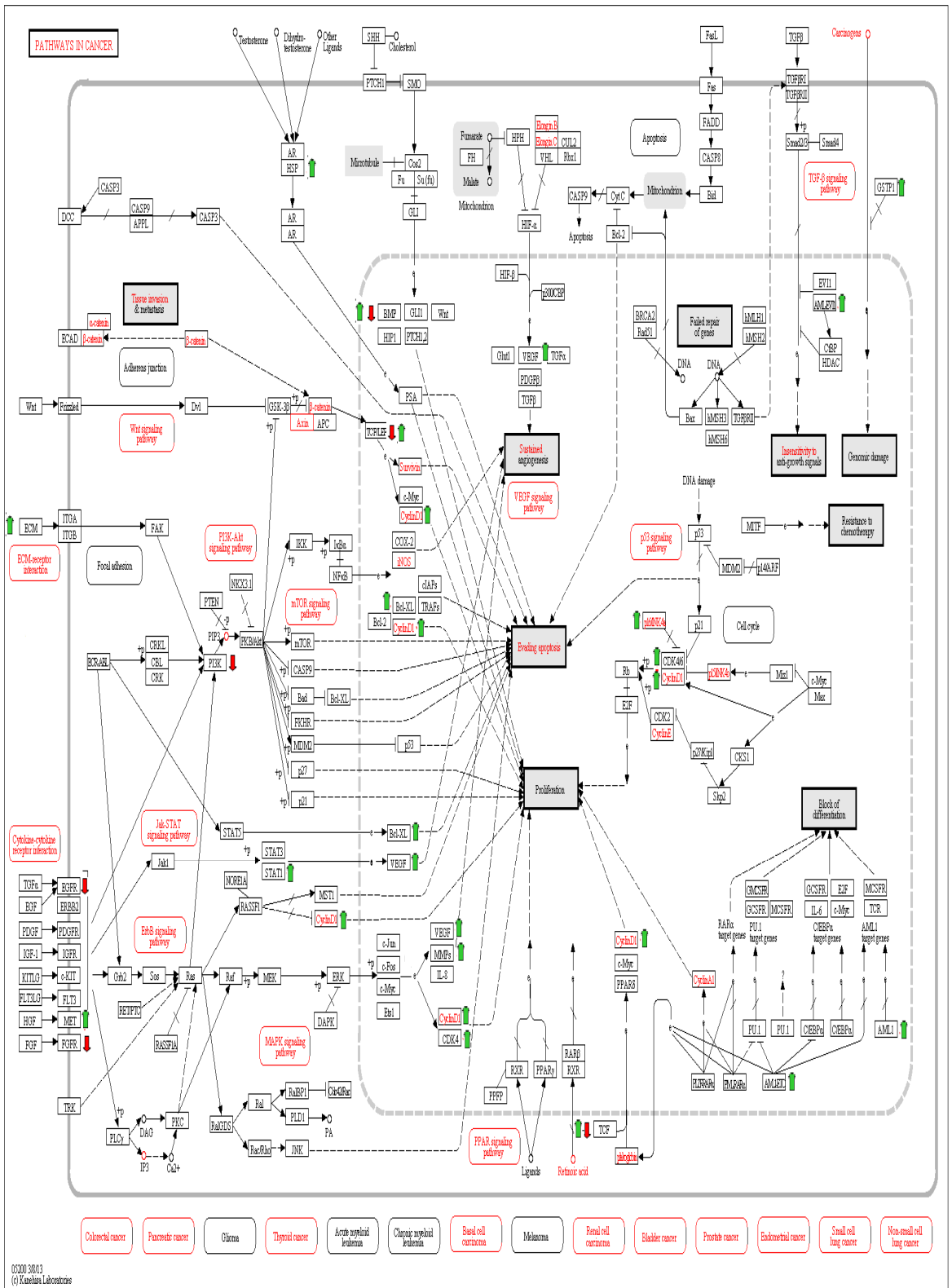












**Ek-4 G rade II Grade II karşılaştırması farklı ifade edilen gen listesi**

Probe Set ID	Gen Sembol	Sitogenetik Lokasyon	Kat Değişimi
1555950_3p_a_at	CD55	1q32	2,19
204087_3p_s_at	SLC5A6	2p23	-2,15
207279_3p_s_at	NEBL	10p12	-3,04
214723_3p_x_at	ANKRD36	2q11.2	2,21
234335_3p_s_at	FAM84A	2p24.3	-3,01
g10863767_3p_at	SPAG1	8q22.2	-3,23
g11037056_3p_a_at	MYO10	5p15.1-p14.3	-2,17
g11345477_3p_a_at	SMAP1	6q13	-2,02
g11386170_3p_at	CEACAM5	19q13.1-q13.2	-3,14
g11493551_3p_at	SCD	10q24.31	-2,65
g11993936_3p_s_at	SCD	10q24.31	-4,18
g12621025_3p_at	REG4	1p13.1-p12	5,06
g12653766_3p_a_at	SMOX	20p13	-2,75
g13111815_3p_at	GPR160	3q26.2-q27	-3,66
g13129099_3p_at	DCTPP1	16p11.2	-2,44
g13129107_3p_a_at	MLPH	2q37.3	3,76
g13276702_3p_a_at	STAU1	20q13.1	-2,14
g13279253_3p_s_at	HSDL2	9q32	-2,58
g13376231_3p_at	PLBD1	12p13.1	-2,13
g13376561_3p_at	USH1C	11p14.3	-2,12
g13376686_3p_at	KIAA0226L	13q14.13	-4,26
g13385593_3p_a_at	CYB5B	16q22.1	-2,14
g13446226_3p_a_at	TRIM2	4q31.3	-4,01
g13477106_3p_s_at	CEACAM6	19q13.2	-3,84
g13641303_3p_s_at	CDCA7	2q31	-2,97
g187239_3p_a_at	PECAM1	17q23.3	2,08
g189084_3p_at	CEACAM6	19q13.2	-3,18
g2995860_3p_at	TSPAN6	Xq22	-3,01
g3560556_3p_at	CSE1L	20q13	-2,69
g3800813_3p_a_at	CMAHP	6p21.32	2,92
g4323580_3p_at	CLDN1	3q28-q29	-4,07
g4416405_3p_a_at	VAV3	1p13.3	-3,66
g4502198_3p_at	AREG /// AREGB	4q13-q21 /// 4q13.3	-6,38
g4503230_3p_at	CYP3A5	7q21.1	2,52
g4503280_3p_at	DDC	7p12.2	-4,01
g4503336_3p_at	DKC1 /// SNORA56	Xq28	-3,31
g4503362_3p_at	DPM1	20q13.13	-2,34
g4503986_3p_at	GGH	8q12.3	-3,94
g4504960_3p_at	LBR	1q42.1	-2,81
g4505058_3p_a_at	EPCAM	2p21	-2,36
g4505284_3p_at	MUC2	11p15.5	5,93

g4507030_3p_at	SLC5A1	22q12.3	-4,13
g4507218_3p_a_at	SRPK1	6p21.31	-2,75
g4507424_3p_a_at	TDGF1 /// TDGF1P3	3p21.31 /// Xq22.3	-5,66
g4557624_3p_a_at	GCLC	6p12	-2,27
g4580325_3p_a_at	MED14	Xp11.4	-2,18
g4758321_3p_a_at	KLF4	9q31	3,76
g4885496_3p_at	MYB	6q22-q23	-3,24
g5174566_3p_s_at	MIPEP	13q12	-2,33
g5174668_3p_s_at	SCML1 /// SCML2	Xp22	-2,80
g5453757_3p_a_at	NEBL	10p12	-3,64
g5803158_3p_a_at	SCML1	Xp22	-2,62
g6631096_3p_x_at	NOX1	Xq22	-5,04
g6912345_3p_at	HDHD1	Xp22.32	-2,52
g6912487_3p_a_at	LSM5	7p14.3	-2,16
g6912579_3p_s_at	SPDEF	6p21.3	6,18
g7415720_3p_a_at	SCD	10q24.31	-4,29
g7661669_3p_s_at	SH3YL1	2p25.3	-2,40
g7705386_3p_a_at	GTF2IRD1	7q11.23	-2,94
g7705609_3p_a_at	SLMO2	20q13.32	-2,49
g7706520_3p_s_at	NEBL	10p12	-3,04
g7959734_RC_3p_s_at	SCD	10q24.31	-2,59
g8051578_3p_a_at	AK4 /// LOC100507855	1p31.3	-3,21
g8051633_3p_at	RARRES3	11q23	2,59
g8922152_3p_at	LOC100506282	---	-2,02
g8922264_3p_a_at	BCL11A	2p16.1	-2,16
g8922849_3p_a_at	UEVLD	11p15.1	-2,30
g8923115_3p_at	FERMT1	20p12.3	-3,59
g8923115_3p_s_at	FERMT1	20p12.3	-2,41
g8923371_3p_at	HEATR2	7p22.3	-2,25
g8923371_3p_x_at	HEATR2	7p22.3	-2,11
g8923650_3p_at	FBXO34	14q22.3	-2,26
g8923807_3p_a_at	ZC3H15	2q32.1	-2,20
g9506640_3p_at	FAM105A	5p15.2	-3,15
g9506650_3p_a_at	KCTD5	16p13.3	-2,10
Hs.101282.0.A2_3p_a_at	CERS6	2q24.3	-3,28
Hs.102178.1.A2_3p_a_at	STX16	20q13.32	-2,49
Hs.110826.1.S1_3p_a_at	TOX3	16q12.1	-3,91
Hs.110826.3.A1_3p_a_at	TOX3	16q12.1	-4,36
Hs.116462.0.S1_3p_at	HNF4A	20q13.12	-2,96
Hs.117102.0.S2_3p_at	XPO4	13q11	-2,36
Hs.118047.0.A1_3p_at	TET3	2p13.1	-2,10
Hs.118249.0.S3_3p_at	ARFGEF2	20q13.13	-2,42
Hs.119597.0.A2_3p_a_at	SCD	10q24.31	-2,49
Hs.124675.0.A1_3p_at	GIMAP7	7q36.1	2,58



Hs.1360.1.S1_3p_x_at	CYP2B6	19q13.2	-4,77
Hs.148324.0.S1_3p_x_at	QPRT	16p11.2	-6,02
Hs.150275.0.S3_3p_at	AVL9	7p14.3	-2,63
Hs.151903.0.S2_3p_at	GRPEL1	4p16	-2,41
Hs.152475.0.A1_3p_at	ASCL2	11p15.5	-2,82
Hs.155029.0.A1_3p_at	---	---	-2,22
Hs.166068.1.A1_3p_at	VIL1	2q35	-3,26
Hs.169615.0.S1_3p_a_at	C8orf33	8q24.3	-2,36
Hs.172129.0.A1_3p_at	SLC12A2	5q23.3	-2,06
Hs.174905.0.S1_3p_at	TMEM41B	11p15.4	-2,40
Hs.177788.0.A1_3p_at	---	---	-4,17
Hs.180895.0.S2_3p_at	RBM12	20q11.21	-2,42
Hs.192183.0.S1_3p_x_at	ARHGAP30	1q23.3	2,03
Hs.19221.0.S1_3p_at	C20orf112	20q11.21	-2,12
Hs.192715.0.A1_3p_at	---	---	-2,14
Hs.2316.0.S1_3p_a_at	SOX9	17q23	-3,56
Hs.237198.1.A1_3p_at	---	---	-3,12
Hs.239926.0.A2_3p_at	MSMO1	4q32-q34	-2,93
Hs.24644.0.A1_3p_a_at	MIR1257 /// TAF4	20q13.33	-2,23
Hs.249195.0.S2_3p_at	HOXA13	7p15.2	-2,89
Hs.25328.0.A1_3p_at	PHC3	3q26.2	-2,23
Hs.260855.0.A1_3p_a_at	FAM84A	2p24.3	-3,03
Hs.26213.0.S1_3p_at	DNTTIP1	20q13.12	-2,91
Hs.27192.1.S2_3p_at	RPRD1B	20q11.21-q12	-2,44
Hs.27192.1.S2_3p_x_at	RPRD1B	20q11.21-q12	-2,54
Hs.2780.3.A1_3p_a_at	JUND	19p13.2	2,25
Hs.279607.3.A1_3p_at	PTBP3	9q32	-2,21
Hs.283552.0.S1_3p_a_at	TMEM45B	11q24.3	-2,91
Hs.283575.0.S1_3p_x_at	LOC729852	7p21.3	-2,36
Hs.284199.0.S1_3p_at	MUC12	7q22	-5,09
Hs.284199.0.S1_3p_x_at	MUC12	7q22	-4,33
Hs.287720.0.S1_3p_at	---	---	-2,39
Hs.288232.0.S1_3p_at	SERINC5	5q14.1	-2,41
Hs.296398.1.A1_3p_s_at	LAPTM4B	8q22.1	-3,06
Hs.303125.0.S2_3p_at	PERP	6q24	-2,40
Hs.306602.0.S1_3p_at	---	---	-2,20
Hs.315478.0.S1_3p_s_at	PCM1	8p22-p21.3	2,26
Hs.323816.0.S1_3p_at	C17orf28	17q25.1	2,53
Hs.326035.0.A1_3p_a_at	EGR1	5q31.1	2,25
Hs.328801.0.S1_3p_x_at	---	---	-4,72
Hs.37054.0.S2_3p_at	EFNA3	1q21-q22	-3,44
Hs.37848.1.A1_3p_at	---	---	-3,94
Hs.3945.0.A1_3p_a_at	SLMO2	20q13.32	-2,21
Hs.3945.1.A1_3p_at	SLMO2	20q13.32	-2,39
Hs.4310.0.S2_3p_at	EIF1AX	Xp22.12	-2,25

Hs.44566.1.A1_3p_at	ANKRD36 /// ANKRD36B /// ANKRD36C	2q11.1 /// 2q11.2	3,69
Hs.5025.0.A2_3p_at	NEBL	10p12	-3,10
Hs.51483.0.A1_3p_at	METTL7B	12q13.2	-2,67
Hs.54424.1.S1_3p_at	HNF4A	20q13.12	-3,84
Hs.62180.0.S2_3p_a_at	ANLN	7p15-p14	-2,32
Hs.69997.1.S1_3p_at	ZNF238	1q44-qter	-2,79
Hs.69997.1.S1_3p_x_at	ZNF238	1q44-qter	-2,19
Hs.70604.0.S1_3p_at	ATP9A	20q13.2	-2,24
Hs.71622.2.S1_3p_at	LRP11	6q25.1	-2,29
Hs.77886.1.S1_3p_a_at	LMNA	1q22	3,05
Hs.78683.0.S2_3p_at	USP7	16p13.3	-2,78
Hs.7942.0.S2_3p_at	AFTPH	2p14	-2,03
Hs.82359.1.S1_3p_a_at	FAS	10q24.1	2,07
Hs.82845.0.S1_3p_at	SORL1	11q23.2-q24.2	-2,37
Hs.91109.0.A1_3p_at	PRR15	7p14.3	-3,62
Hs.98491.0.A1_3p_at	NUDT16P1	3q22.1	-2,06
Hs2.105484.2.S1_3p_s_at	REG4	1p13.1-p12	7,36
Hs2.241392.2.S1_3p_s_at	CCL5	17q11.2-q12	2,85
Hs2.278056.3.S1_3p_s_at	C17orf57	17q21.32	-2,71
Hs2.407020.1.S1_3p_at	C6orf183	6q21	-4,51
Hs2.407478.1.S1_3p_s_at	DIXDC1	11q23.1	2,67
Hs2.460.4.S1_3p_s_at	ATF3	1q32.3	3,03
L33930_3p_s_at	CD24	6q21	-3,01

**Ek-5 %20 sıklıkla amplifiye olan bölgelerdeki genler**

Sayı	Gen Sembolü	Frekansı	Kromozom	Sitogenetik Lokasyon
1	NAA40	19.62	11	q13.1
2	RNU6-45	19.62	11	q13.1
3	COX8A	19.62	11	q13.1
4	AP000721.4	19.62	11	q13.1
5	OTUB1	19.62	11	q13.1
6	MACROD1	19.62	11	q13.1
7	RP11-21A7A.2	19.62	11	q13.1
8	RP11-21A7A.4	19.62	11	q13.1
9	FLRT1	19.62	11	q13.1
10	RP11-21A7A.3	19.62	11	q13.1
11	STIP1	19.62	11	q13.1
12	FERMT3	19.62	11	q13.1
13	TRPT1	19.62	11	q13.1
14	NUDT22	19.62	11	q13.1
15	RP11-783K16.14	19.62	11	q13.1
16	DNAJC4	19.62	11	q13.1
17	VEGFB	19.62	11	q13.1
18	FKBP2	19.62	11	q13.1
19	PPP1R14B	19.62	11	q13.1
20	RP11-783K16.5	19.62	11	q13.1
21	RP11-783K16.13	19.62	11	q13.1
22	PLCB3	19.62	11	q13.1
23	BAD	19.62	11	q13.1
24	GPR137	19.62	11	q13.1
25	KCNK4	19.62	11	q13.1
26	RP11-783K16.10	19.62	11	q13.1
27	Y_RNA	19.62	11	q13.1
28	TEX40	19.62	11	q13.1
29	ESRRA	19.62	11	q13.1
30	TRMT112	19.62	11	q13.1
31	PRDX5	19.62	11	q13.1
32	AP003774.1	19.62	11	q13.1
33	CCDC88B	19.62	11	q13.1
34	RPS6KA4	19.62	11	q13.1
35	MIR1237	19.62	11	q13.1
36	AP003774.6	19.62	11	q13.1
37	AP003774.5	19.62	11	q13.1
38	AP003774.4	19.62	11	q13.1

39	AP005273.1	19.62	11	q13.1
40	AP006288.1	19.62	11	q13.1
41	SLC22A11	19.62	11	q13.1
42	SLC22A12	19.62	11	q13.1
43	NRXN2	19.62	11	q13.1
44	AP001092.4	19.62	11	q13.1
45	RASGRP2	19.62	11	q13.1
46	PYGM	19.62	11	q13.1
47	ARFGEF2	19.62	20	q13.13
48	SNAP23P	19.62	20	q13.13
49	RP1-155G6.4	19.62	20	q13.13
50	CSE1L	19.62	20	q13.13
51	STAU1	19.62	20	q13.13
52	ARPC3P1	19.62	20	q13.13
53	DDX27	19.62	20	q13.13
54	ZNFX1	19.62	20	q13.13
55	ZFAS1	19.62	20	q13.13
56	SNORD12C	19.62	20	q13.13
57	SNORD12B	19.62	20	q13.13
58	SNORD12	19.62	20	q13.13
59	KCNB1	19.62	20	q13.13
60	PTGIS	19.62	20	q13.13
61	AL035457.1	19.62	20	q13.13
62	AL079339.1	19.62	20	q13.13
63	NFATC2	19.62	20	q13.13
64	MIR3194	19.62	20	q13.13
65	ATP9A	19.62	20	q13.13
66	RP5-827A12.2	19.62	20	q13.13
67	ZDHHC11	19.62	5	p15.33
68	ZDHHC11B	19.62	5	p15.33
69	CTD-2589H19.4	19.62	5	p15.33
70	SPCS2P3	19.62	5	p15.33
71	BRD9	19.62	5	p15.33
72	TRIP13	19.62	5	p15.33
73	RP11-661C8.2	19.62	5	p15.33
74	RP11-661C8.3	19.62	5	p15.33
75	RP11-43F13.3	19.62	5	p15.33
76	AC116351.1	19.62	5	p15.33
77	AC116351.2	19.62	5	p15.33
78	NKD2	19.62	5	p15.33
79	SLC12A7	19.62	5	p15.33
80	MIR4635	19.62	5	p15.33
81	CTD-3080P12.3	19.62	5	p15.33
82	SLC6A19	19.62	5	p15.33
83	SLC6A18	19.62	5	p15.33

84	TERT	19.62	5	p15.33
85	RP11-90P13.1	19.62	7	p22.3
86	AC093627.11	19.62	7	p22.3
87	AC093627.12	19.62	7	p22.3
88	FAM20C	19.62	7	p22.3
89	AC145676.2	19.62	7	p22.3
90	AC187652.1	19.62	7	p22.3
91	WI2-237311.1	19.62	7	p22.3
92	WI2-237311.2	19.62	7	p22.3
93	AC226118.1	19.62	7	p22.3
94	AC147651.1	19.62	7	p22.3
95	PDGFA	19.62	7	p22.3
96	AC147651.3	19.62	7	p22.3
97	PRKAR1B	19.62	7	p22.3
98	AC147651.2	19.62	7	p22.3
99	AC147651.5	19.62	7	p22.3
100	AC147651.4	19.62	7	p22.3
101	HEATR2	19.62	7	p22.3
102	SUN1	19.62	7	p22.3
103	GET4	19.62	7	p22.3
104	ADAP1	19.62	7	p22.3
105	COX19	19.62	7	p22.3
106	CYP2W1	19.62	7	p22.3
107	C7orf50	19.62	7	p22.3
108	MIR339	19.62	7	p22.3
109	AC073957.15	19.62	7	p22.3
110	GPR146	19.62	7	p22.3
111	RP11-449P15.1	19.62	7	p22.3
112	AC091729.7	19.62	7	p22.3
113	AC091729.8	19.62	7	p22.3
114	GPER	19.62	7	p22.3
115	MAD1L1	19.62	7	p22.3
116	FTSJ2	19.62	7	p22.3
117	NUDT1	19.62	7	p22.3
118	SNX8	19.62	7	p22.3
119	RP5-1125K23.1	19.62	7	p22.3
120	EIF3B	19.62	7	p22.3
121	AC004840.8	19.62	7	p22.3
122	RP4-607J2.1	19.62	7	p22.3
123	CHST12	19.62	7	p22.3
124	AC004840.9	19.62	7	p22.3
125	GRIFIN	19.62	7	p22.3
126	LFNG	19.62	7	p22.3
127	MIR4648	19.62	7	p22.3
128	BRAT1	19.62	7	p22.3

129	snoU13	19.62	7	p22.3
130	IQCE	19.62	7	p22.3
131	TTYH3	19.62	7	p22.3
132	AMZ1	19.62	7	p22.3
133	GNA12	19.62	7	p22.3
134	RP11-661A12.12	19.62	8	q24.3
135	ZNF623	19.62	8	q24.3
136	RNU7-109P	19.62	8	q24.3
137	ZNF707	19.62	8	q24.3
138	RP11-429J17.2	19.62	8	q24.3
139	CCDC166	19.62	8	q24.3
140	RP11-429J17.4	19.62	8	q24.3
141	MAPK15	19.62	8	q24.3
142	RP11-429J17.5	19.62	8	q24.3
143	FAM83H	19.62	8	q24.3
144	MIR4664	19.62	8	q24.3
145	RP11-429J17.6	19.62	8	q24.3
146	RP11-429J17.7	19.62	8	q24.3
147	RP11-429J17.8	19.62	8	q24.3
148	SCRIB	19.62	8	q24.3
149	MIR937	19.62	8	q24.3
150	PUF60	19.62	8	q24.3
151	RP11-299M14.2	19.62	8	q24.3
152	NRBP2	19.62	8	q24.3
153	AC105049.1	19.62	8	q24.3
154	EPPK1	19.62	8	q24.3
155	PLEC	19.62	8	q24.3
156	MIR661	19.62	8	q24.3
157	PARP10	19.62	8	q24.3
158	GRINA	19.62	8	q24.3
159	SPATC1	19.62	8	q24.3
160	CTD-3065J16.6	19.62	8	q24.3
161	OPLAH	19.62	8	q24.3
162	CTD-3065J16.9	19.62	8	q24.3
163	EXOSC4	19.62	8	q24.3
164	GPAA1	19.62	8	q24.3
165	CYC1	19.62	8	q24.3
166	SHARPIN	19.62	8	q24.3
167	MAF1	19.62	8	q24.3
168	KIAA1875	19.62	8	q24.3
169	FAM203A	19.62	8	q24.3
170	TSSK5P1	19.62	8	q24.3
171	MROH1	19.62	8	q24.3
172	AC104592.1	19.62	8	q24.3

173	KM-PA-2	19.62	8	q24.3
174	SCXB	19.62	8	q24.3
175	FAM203B	19.62	8	q24.3
176	AC110280.1	19.62	8	q24.3
177	CTD-3232M19.2	19.62	8	q24.3
178	BOP1	19.62	8	q24.3
179	SCXA	19.62	8	q24.3
180	HSF1	19.62	8	q24.3
181	PPFIA1	21.80	11	q13.3
182	H2AFZP4	21.80	11	q13.3
183	AP000487.6	21.80	11	q13.3
184	MIR548K	21.80	11	q13.3
185	CTA-797E19.1	21.80	11	q13.3
186	CTA-797E19.2	21.80	11	q13.3
187	AP000487.4	21.80	11	q13.3
188	AP000487.5	21.80	11	q13.3
189	CTTN	21.80	11	q13.3
190	SHANK2	21.80	11	q13.3
191	AP001271.3	21.80	11	q13.3
192	AP001271.5	21.80	11	q13.3
193	SHANK2-AS1	21.80	11	q13.3
194	SHANK2-AS2	21.80	11	q13.3
195	Y_RNA	21.80	11	q13.3
196	SHANK2-AS3	21.80	11	q13.3
197	MIR3664	21.80	11	q13.3
198	MMP9	21.80	20	q13.12
199	RP11-465L10.10	21.80	20	q13.12
200	AL162458.1	21.80	20	q13.12
201	SLC12A5	21.80	20	q13.12
202	RP11-465L10.7	21.80	20	q13.12
203	NCOA5	21.80	20	q13.12
204	RPL13P2	21.80	20	q13.12
205	CD40	21.80	20	q13.12
206	RP5-998H6.2	21.80	20	q13.12
207	CDH22	21.80	20	q13.12
208	SLC35C2	21.80	20	q13.12
209	ELMO2	21.80	20	q13.12
210	RP5-981L23.1	21.80	20	q13.12
211	MKRN7P	21.80	20	q13.12
212	ZNF840	21.80	20	q13.12
213	ZNF334	21.80	20	q13.12
214	OCSTAMP	21.80	20	q13.12
215	SLC13A3	21.80	20	q13.12

216	TP53RK	21.80	20	q13.12
217	RP1-28H20.3	21.80	20	q13.12
218	SLC2A10	21.80	20	q13.12
219	AL031055.1	21.80	20	q13.12
220	RN7SKP33	21.80	20	q13.12
221	RP11-323C15.1	21.80	20	q13.12
222	EYA2	21.80	20	q13.12
223	RP11-323C15.2	21.80	20	q13.12
224	GAPDHP54	21.80	20	q13.12
225	RP5-1050K3.3	21.80	20	q13.12
226	MXRA5P1	21.80	Y	q11.21
227	RPS24P1	21.80	Y	q11.21
228	ARSFP1	21.80	Y	q11.21
229	RN7SL702P	21.80	Y	q11.21
230	FAM8A4P	21.80	Y	q11.21
231	ARSEP1	21.80	Y	q11.21
232	AC002992.4	21.80	Y	q11.21
233	ARSDP1	21.80	Y	q11.21
234	GYG2P1	21.80	Y	q11.21
235	AC002992.1	21.80	Y	q11.21
236	XGPY	21.80	Y	q11.21
237	RP11-251M8.1	21.80	Y	q11.23
238	OFD1P13Y	21.80	Y	q11.23
239	TRAPPC2P5	21.80	Y	q11.23
240	RAB9AP2	21.80	Y	q11.23
241	USP9YP30	21.80	Y	q11.23
242	RNU1-107P	21.80	Y	q11.23
243	TTY3	21.80	Y	q11.23
244	USP9YP9	21.80	Y	q11.23
245	USP9YP19	21.80	Y	q11.23
246	XKRYP5	21.80	Y	q11.23
247	CDY22P	21.80	Y	q11.23
248	TCEB1P17	21.80	Y	q11.23
249	OFD1P18Y	21.80	Y	q11.23
250	TRAPPC2P4	21.80	Y	q11.23
251	RAB9AP3	21.80	Y	q11.23
252	USP9YP20	21.80	Y	q11.23
253	RNU1-40P	21.80	Y	q11.23
254	USP9YP21	21.80	Y	q11.23
255	XKRYP6	21.80	Y	q11.23
256	AC007965.1	21.80	Y	q11.23
257	PRYP4	21.80	Y	q11.23
258	TCEB1P11	21.80	Y	q11.23
259	CDY23P	21.80	Y	q11.23
260	USP9YP26	21.80	Y	q11.23



261	HSFY8P	21.80	Y	q11.23
262	OFD1P15Y	21.80	Y	q11.23
263	RBMV2DP	21.80	Y	q11.23
264	AC007965.12	21.80	Y	q11.23
265	COL5A1	23.98	9	q34.3
266	AL603650.2	23.98	9	q34.3
267	AL603650.3	23.98	9	q34.3
268	MIR3689C	23.98	9	q34.3
269	MIR3689A	23.98	9	q34.3
270	MIR3689D1	23.98	9	q34.3
271	AL603650.4	23.98	9	q34.3
272	AL603650.1	23.98	9	q34.3
273	MIR3689B	23.98	9	q34.3
274	MIR3689D2	23.98	9	q34.3
275	MIR3689E	23.98	9	q34.3
276	MIR3689F	23.98	9	q34.3
277	RP11-263F14.3	23.98	9	q34.3
278	FCN2	23.98	9	q34.3
279	FCN1	23.98	9	q34.3
280	RP11-447M12.2	23.98	9	q34.3
281	OLFM1	23.98	9	q34.3
282	RP11-399H11.3	23.98	9	q34.3
283	RP11-399H11.2	23.98	9	q34.3
284	AL390778.1	23.98	9	q34.3
285	C9orf62	23.98	9	q34.3
286	RP11-555H7.2	23.98	9	q34.3
287	SOCS5P2	23.98	9	q34.3
288	RP11-426A6.7	23.98	9	q34.3
289	PPP1R26	23.98	9	q34.3
290	C9orf116	23.98	9	q34.3
291	MRPS2	23.98	9	q34.3
292	RP11-426A6.5	23.98	9	q34.3
293	LCN1	23.98	9	q34.3
294	AL161452.1	23.98	9	q34.3
295	OBP2A	23.98	9	q34.3
296	PAEP	23.98	9	q34.3
297	RP11-98L5.2	23.98	9	q34.3
298	RP11-98L5.4	23.98	9	q34.3
299	RP11-98L5.5	23.98	9	q34.3
300	GLT6D1	23.98	9	q34.3
301	LCN9	23.98	9	q34.3
302	SOHLH1	23.98	9	q34.3
303	KCNT1	23.98	9	q34.3
304	CAMSAP1	23.98	9	q34.3
305	RP11-305P22.9	30.52	20	q13.33

306	HAR1B	30.52	20	q13.33
307	HAR1A	30.52	20	q13.33
308	RP5-963E22.5	30.52	20	q13.33
309	RP5-963E22.4	30.52	20	q13.33
310	MIR124-3	30.52	20	q13.33
311	YTHDF1	30.52	20	q13.33
312	BIRC7	30.52	20	q13.33
313	MIR3196	30.52	20	q13.33
314	NKAIN4	30.52	20	q13.33
315	ARFGAP1	30.52	20	q13.33
316	MIR4326	30.52	20	q13.33
317	COL20A1	30.52	20	q13.33
318	RNU6-994P	30.52	20	q13.33
319	CHRNA4	30.52	20	q13.33
320	RP11-261N11.8	30.52	20	q13.33
321	KCNQ2	30.52	20	q13.33
322	RP11-358D14.2	30.52	20	q13.33
323	EEF1A2	30.52	20	q13.33
324	RP4-697K14.3	30.52	20	q13.33
325	PPDPF	30.52	20	q13.33
326	PTK6	30.52	20	q13.33
327	SRMS	30.52	20	q13.33
328	C20orf195	30.52	20	q13.33
329	HELZ2	30.52	20	q13.33
330	RP4-697K14.12	30.52	20	q13.33
331	GMEB2	30.52	20	q13.33

**Ek-6 %20 Sıklıkla delesyona uğramış bölgelerdeki genler**

Sayı	Gen Sembolü	Frekans	Kromozom	Sitogenetik Lokasyon
1	KCTD2	19.62	17	q25.1
2	ATP5H	19.62	17	q25.1
3	RP11-1112G13.3	19.62	17	q25.1
4	AC111186.1	19.62	17	q25.1
5	SLC16A5	19.62	17	q25.1
6	Y_RNA	19.62	17	q25.1
7	ARMC7	19.62	17	q25.1
8	NT5C	19.62	17	q25.1
9	HN1	19.62	17	q25.1
10	RP11-649A18.5	19.62	17	q25.1
11	RP11-649A18.4	19.62	17	q25.1
12	RP11-649A18.7	19.62	17	q25.1
13	SUMO2	19.62	17	q25.1
14	NUP85	19.62	17	q25.1
15	GGA3	19.62	17	q25.1
16	MRPS7	19.62	17	q25.1
17	MIF4GD	19.62	17	q25.1
18	RP11-649A18.12	19.62	17	q25.1
19	SLC25A19	19.62	17	q25.1
20	GRB2	19.62	17	q25.1
21	AC011933.1	19.62	17	q25.1
22	AC011933.2	19.62	17	q25.1
23	RP11-16C1.3	19.62	17	q25.1
24	RP11-16C1.2	19.62	17	q25.1
25	RP11-16C1.1	19.62	17	q25.1
26	MIR3678	19.62	17	q25.1
27	RNU6-938P	19.62	17	q25.1
28	KIAA0195	19.62	17	q25.1
29	AC100787.1	19.62	17	q25.1
30	CASKIN2	19.62	17	q25.1
31	TSEN54	19.62	17	q25.1
32	LLGL2	19.62	17	q25.1
33	MYO15B	19.62	17	q25.1
34	RECQL5	19.62	17	q25.1
35	SMIM5	19.62	17	q25.1
36	SMIM6	19.62	17	q25.1
37	SAP30BP	19.62	17	q25.1
38	RP11-474I11.8	19.62	17	q25.1
39	RP11-474I11.7	19.62	17	q25.1
40	ITGB4	19.62	17	q25.1
41	GALK1	19.62	17	q25.1
42	H3F3B	19.62	17	q25.1

43	MIR4738	19.62	17	q25.1
44	UNK	19.62	17	q25.1
45	RP11-552F3.4	19.62	17	q25.1
46	UNC13D	19.62	17	q25.1
47	WBP2	19.62	17	q25.1
48	TRIM47	19.62	17	q25.1
49	RP11-552F3.9	19.62	17	q25.1
50	TRIM65	19.62	17	q25.1
51	RP11-552F3.10	19.62	17	q25.1
52	MRPL38	19.62	17	q25.1
53	RP11-552F3.12	19.62	17	q25.1
54	FBF1	19.62	17	q25.1
55	ACOX1	19.62	17	q25.1
56	RP11-552F3.13	19.62	17	q25.1
57	TEN1	19.62	17	q25.1
58	TEN1-CDK3	19.62	17	q25.1
59	CDK3	19.62	17	q25.1
60	MICD	19.62	6	p22.1
61	HCG9	19.62	6	p22.1
62	DDX39BP2	19.62	6	p22.1
63	MCCD1P2	19.62	6	p22.1
64	ZNRD1-AS1	19.62	6	p22.1
65	HCG4P3	19.62	6	p22.1
66	HLA-J	19.62	6	p22.1
67	ETF1P1	19.62	6	p22.1
68	ZNRD1	19.62	6	p22.1
69	PPP1R11	19.62	6	p22.1
70	RNF39	19.62	6	p22.1
71	AL669914.1	19.62	6	p22.1
72	TRIM31	19.62	6	p22.1
73	TRIM31-AS1	19.62	6	p22.1
74	SNORA48	19.62	6	p22.1
75	TRIM40	19.62	6	p22.1
76	TRIM10	19.62	6	p22.1
77	TRIM15	19.62	6	p22.1
78	TRIM26	19.62	6	p22.1
79	PAIP1P1	19.62	6	p22.1
80	HCG17	19.62	6	p22.1
81	TRIM26BP	19.62	6	p22.1
82	HLA-L	19.62	6	p22.1
83	HCG18	19.62	6	p22.1
84	TRIM39	19.62	6	p22.1
85	TRIM39-RPP21	19.62	6	p22.1
86	RPP21	19.62	6	p22.1
87	HLA-N	19.62	6	p22.1

88	HCG19P	19.62	6	p22.1
89	UBQLN1P1	19.62	6	p22.1
90	MICC	19.62	6	p22.1
91	TMPOP1	19.62	6	p22.1
92	SUCLA2P1	19.62	6	p22.1
93	RANP1	19.62	6	p22.1
94	HLA-E	19.62	6	p22.1
95	XXbac- BPG249D20.9	19.62	6	p22.1
96	GNL1	19.62	6	p22.1
97	PRR3	19.62	6	p22.1
98	ABCF1	19.62	6	p22.1
99	MIR877	19.62	6	p22.1
100	PPP1R10	19.62	6	p22.1
101	AL662800.1	19.62	6	p22.1
102	MRPS18B	19.62	6	p22.1
103	ATAT1	19.62	6	p22.1
104	PTMAP1	19.62	6	p22.1
105	C6orf136	19.62	6	p22.1
106	AL662800.2	19.62	6	p22.1
107	DHX16	19.62	6	p22.1
108	PPP1R18	19.62	6	p22.1
109	NRM	19.62	6	p22.1
110	RPL7P4	19.62	6	p22.1
111	MDC1	19.62	6	p22.1
112	MDC1-AS1	19.62	6	p22.1
113	TUBB	19.62	6	p22.1
114	FLOT1	19.62	6	p22.1
115	Y_RNA	19.62	6	p22.1
116	IER3	19.62	6	p22.1
117	RN7SL353P	19.62	6	p22.1

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:**Nevin BELDER

**Doğum Yeri:** ANKARA

**Doğum Tarihi:**02.08.1981

**Medeni Hali:**Evli

**Yabancı Dili:**İngilizce

### Eğitim Durumu

**Lise:**Yıldırım Beyazıt Süper Lisesi (1999)

**Lisans:**Ankara Üniversitesi , Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2004)

**Yüksek Lisans:** Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Bölümü(2007)

### İş Tecrübesi

**Kurumu:**Genmar Teşhis Ürünleri **Görevi:** Satış Uzmanı **Yılları:**2004-2005

**Kurumu:**MedSanTek Laboratuvar Malzemeleri Sanayi ve Ticaret Ltd. şti.

**Görevi:**Satış Uzmanı **Yılları:** 2005

### Yayınlar

#### SCI'da Yer Alan Makaleler:

1. Sevim U, Fatma D, Ihsan E, Gulay C, **Nevin B.** A neonate with contiguous deletion syndrome in XP21. J Pediatr Endocrinol Metab. 2011;24(11-12):1095-8.

#### Diğer:

1. Fidanoglu P. Belder N. Erdoğan B., İlk Ö., Rajabli F., Özdağ H.,Genom projeleri 5n1p:ne, nerede, ne zaman, nasıl, neden ve hangi popülasyonda?Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi . 2013. (yayına kabul edildi)

#### Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. **Belder, N,** Ozansoy, G, Arı, N. Short-term rosiglitazone treatment decreases expression of receptors for advanced glycation end products (RAGE) and proinflammatory cytokines in aortic tissue from AGE-injected rats. European

Pharmacology Congress (EPHAR), 13-17 July 2008, Manchester, UK. Fund Clin Pharmacol 22(suppl 2):101, p192, 2008.

2. Dilay ığlıdağ Dngl, Farid Rajabli, Gl İnan, **Nevin Belder**, Ethem Geim, Ayhan Kuzu, Berna Savaş, Arzu Ensari, H.Gkhan İlk, zlem İlk, Hilal zdağ, A Family Based Genome Wide Association Study in Turkish Sporadic Colorectal Cancer Cases, Aralık 2010, İngiltere
3. Melike zbilgin ztrk, **Nevin Belder**, Nuriye zlem Kk, Pervin Topcuoğlu, Muhit zcan, Işınsu Kuzu, Hilal zdağ. Molecular gene profiling for the treatment of diffuse large b cell lymphoma in Turkish population. 3. Uluslararası Lsemi-Lenfoma-Myeloma Kongresi, 11-14 Mayıs 2011
4. **Nevin Belder**, znur Coşkun, Berna Savaş, Arzu Ensari. From RNA Isağation to Microarray Analysis:Comparison of Methods in FFPE Tissues. I.Moleküler Biyoloji Derneği Uluslararası Kongresi, 23-24 Kasım 2012, İstanbul
5. **Nevin Belder**, Berna Savaş, Arzu Ensari, Mehmet Ayhan Kuzu; Hilal zdağ. Transcriptome profiling of colorectal cancer. European Biotechnology Congress 2013. 16-18 May 2013, Bratislava, Slovakia .(Oral –Abstract). Abstract -Current Opinion in Biotechnology.

#### **Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:**

1. Dilay ığlıdağ Dngl, **Nevin Belder**, Mehmet Korkmaz, Arzu Ensari, Berna Savaş, Ayhan Kuzu, Ethem Geçim, zlem İlk, H.Gökhan İlk, Hilal zdağ,Sporadik Kolorektal Kanser Vakalarında Genom Ebadında TNP Profilinin Belirlenmesi ile Yeni Genetik Yatkinlık Genlerinin ve Kanserin Gelişmesinde Etken Olan Genlerin Belirlenmesi, Kongresi, XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi . 14-16 Aralık, 2009, Antalya
2. **Nevin Belder**, Hilal zdağ. Formalin ile fikse edilmiş, parafine gömülü doku kesitlerinden DNA izolasyonunun optimizasyonu. XIII Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi,26-30 Ekim,2011. Antalya
3. Dilay ığlıdağ Dngl,**Nevin Belder**, Mehmet Korkmaz, Arzu Ensari, Berna Savaş, Ayhan Kuzu, Ethem Geçim, zlem İlk, H.Gökhan İlk, Hilal zdağ,Sporadik Kolorektal Kanser Vakalarında Genom Ebadında TNP Profilinin Belirlenmesi ile Yeni Genetik Yatkinlık Genlerinin ve Kanserin Gelişmesinde Etken Olan Genlerin Belirlenmesi,XII Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi,26-30 Ekim,2011, Antalya

4. Dilay ığlıdağ Dngl, **Nevin Belder**, Farid Rajebli, Hlyla Sümer, Ayhan Kuzu, Arzu Ensari ,Berna Savaş, Nejat Akar, Gl İnan, Nurten Akarsu, H. Gökhan İlk, zlem İlk, Hilal zdağ. Sporadik kolorektal kanser vakalarında genom ve transkriptom boyu analizlerle yeni genetik yatkınlık genlerinin ve kanserin gelişmesinde etken-olan genlerin belirlenmesi. 6.Cerrahi Araştırma Kongresi. 8-11 Aralık 2011, Ankara. (Oral-Abstract)
5. Öznur Erdoğan, Berna Savaş, **Nevin Belder**, Nazmiye Kurşun, Sibel Perçinel, Arzu Ensari. Kolorektal Kanser nc Lezyonlarında KRAS ve BRAF Onkogen Mutasyon Profili. XII Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi,26-30 Ekim,2011, Antalya.
6. **Nevin Belder**, Farid Rajabli, Berna Savaş, Mehmet Ayhan Kuzu, Işın Pak, Arzu Ensari, Hilal zdağ.Sporadik Kolorektal Kanser Gelişimi ve İlerlemesinde Etkin Genlerin Transkriptom Profillemesi ile Tanımlanması. XIII Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi,26-30 Ekim,2013, İzmir. (Oral-Abstract).



## TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

1. **BELDER N.**, COSKUN O., ERDOGAN B.D., SAVAS B., ENSARI A., ÖZDAG H. From RNA Isolation to Microarray Analysis: Comparison of Methods in FFPE Tissues. **Submit edildi. -The Scientific World Journal.**