



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İYİ HUYLU TİROİD NODÜLLERİ VE PAPİLLER TİROİD
KARSİNOMLARIN MOLEKÜLER AYIRICI TANISI**

Yusuf Ziya İĞCİ
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Prof. Dr. Ersin AKARSU

Gaziantep

2010

BEYAN

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

09/07/2010

Yusuf Ziya İĞCİ

TEŞEKKÜR

Çalışmanın tasarlanmasından bitimine kadar geçen süre içerisinde değerli bilimsel katkılarını ve desteklerini esirgemeyen tez danıőmanlarım Prof. Dr. Ahmet ARSLAN ve Prof. Dr. Ersin AKARSU'ya; doku örneklerinin temininde ve çalışmanın tasarlanmasında yaptığı katkılardan dolayı Prof. Dr. Suna ERKILIÇ'a; verilerin yorumlanması ve istatistikî hesapların yapılmasında yaptığı katkılardan dolayı Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRYÜREK'e; dizin analizi aőamasındaki yardımlarından dolayı Bio. Aysel DAĞCI'ya; pilot çalışma sırasındaki yardımlarından dolayı Bio. Esmâ ÖZKARA'ya teőekkürü borç bilirim.

Ayrıca, çalışmanın bir çok aőamasındaki katkıları dolayısı ile değerli bilim insanları Yrd. Doç. Dr. Beyhan CENGİZ, Dr. Serdar ÖZTUZCU ve Uz. Bio. Bülent GÖĞEBAKAN'a teőekkürü borç bilirim.

Son olarak, bu tez çalışmasının örneklerin temininden başlayarak her aşamasında emeği geçen ve her zaman maddi-manevi desteğini gördüğüm kıymetli eőim ve meslektaőım Uz. Bio. Mehri İĞCI'ye; verdikleri destek, gösterdikleri sabır için de aileme sonsuz teőekkürü borç bilirim.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF-09.12 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGE ve KISALTMALAR.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
RESİM LİSTESİ.....	x
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1 GİRİŞ ve AMAÇ	3
2 GENEL BİLGİLER	7
2.1 Tiroid Bezi.....	7
2.2 Tiroid neoplazileri	11
2.2.1 Foliküler Adenom	12
2.2.2 Papiller tiroid karsinom.....	13
2.2.3 Foliküler tiroid karsinom	15
2.2.4 Medüller tiroid karsinom	17
2.2.5 Farklılaşmamış (anaplastik) karsinom	17
2.2.6 Diğer tiroid neoplazileri	18
2.3 Hücre döngüsü ve kanser oluşumu	18
2.4 Tiroid neoplazilerinin oluşumu ve moleküler temeli.....	21
2.5 Tiroid kanser saldırganlığına yönelik belirteçler	26
2.6 Ailesel Geçiş özellikleri.....	27

2.7 İnce iğne aspirasyon biyopsisi	29
2.8 Tiroid kanser tanısında genetik belirteçler	31
2.8.1 BRAF	33
2.8.2 RET/PTC.....	34
2.8.3 PAX8-PPAR γ	35
2.9 İmmunohistokimyasal belirteçler	36
2.9.1 Galektin-3.....	36
2.9.2 HBME-1.....	37
2.9.3 hTERT ve Telomerase	37
2.9.4 İmmüno sitokimyasal paneller	38
2.10 Tiroid kanser tanısında mikro RNA	38
2.11 Mikrodizin analizleri	40
3 GEREÇ ve YÖNTEM.....	42
3.1 Grupların oluşturulması ve doku örneklerinin temini	42
3.2 Kullanılan çözeltiler.....	43
3.3 Örneklerden RNA eldesi.....	44
3.4 RNA konsantrasyonlarının hesaplanması.....	45
3.5 RNA örneklerinden tek sarmal cDNA yapılması	47
3.6 Differential Display-PCR yöntemi	48
3.6.1 İkinci sarmal cDNA eldesi.....	52
3.6.2 Örneklerin poliakrilamid jelde yürütülmesi	53
3.7 Farklı ifade edilen genlerin tespiti	55
3.7.1 Densitometrik ölçüm yolu ile gen ifade analizi	57
3.8 İstatistiksel hesaplamalar	59

3.9 DNA dizin analizi	60
3.10 BLAST işlemi.....	61
3.11 Bulunan genler arası etkileşimler	61
4 BULGULAR	62
4.1 Aday bölgelerin ölçüm yolu ile sınanması ve istatistikî bulgular.....	62
4.2 DNA dizin ve BLAST analizleri	64
4.3 Ölçüm değerlerinin grafiksel gösterimi	66
4.4 Gen ifadelerindeki ölçüm değerleri kullanılarak moleküler ayırım yapılması	74
4.5 İlişkili bulunan genlere ait bilgiler.....	76
4.6 Protein fonksiyonu veritabanında protein etkileşimlerinin karşılaştırılması	78
5 TARTIŞMA	80
6 KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	99

SİMGE ve KISALTMALAR

AFIP	Armed Forces Institute of Pathology
AMK	Ailesel medüller karsinom
ATK	Anaplastik tiroid karsinom
BLAST	The basic local alignment search tool
CAK	Cyclin-dependent kinase activating kinase
CDKs	Cyclin-dependent kinases
CKI	Cyclin-dependent kinase inhibitor protein
CSCs	Cancer stem-cells
DD-PCR	Differential display-polymerase chain reaction
FA	Foliküler adenom
FFPE	Formalin-fixed paraffin embedded
FTK	Foliküler tiroid karsinom
HBME-1	Human mesothelial cell 1
HHK	Hurthle hücreli karsinom
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
İİAB	İnce iğne aspirasyon biyopsisi
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCM	Minichromosome maintenance proteins
miRNA	Mikro RNA
MTK	Medüller tiroid karsinom
MTK-A	Ailesel medüller tiroid karsinom
NMTK-A	Ailesel medüller olmayan tiroid karsinom
ORC	Origin recognition complex
P3IK	Fosfatidil inositol 3-OH kinaz
PAX8	Paired box gene 8
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTK	Papiller tiroid karsinom
PTK-F	Papiller tiroid karsinomun foliküler alt tipi
PTK-K	Papiller tiroid karsinomun klasik alt tipi
PTK-TC	Papiller tiroid karsinomun uzun hücreli alt tipi
PTM	Papiller tiroid mikrokarsinom
RET/PTC	Rearranged during transfection/Papillary thyroid carcinoma
SDS	Sodyum dodesil sülfat
T ₃	3,5,3'-L-triyodotreoinin
T ₄	3,5,3,5'-L-tetraiyodotreoinin
Tg	Tiroglobulin
WHO	World Health Organization

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Tiroid hormon sistemine genel bir bakış.	7
Şekil 2.2. Tiroid hormonlarının salınımı.	8
Şekil 2.3. Tiroid bezinin anatomik yerleşimi.....	9
Şekil 2.4. Hücre döngüsünün evreleri.....	19
Şekil 2.5. Tiroid nodülünün klonal başlangıcı ile ilgili olarak öne sürülen hipotezler... 23	
Şekil 2.6. Farklı histolojik alt tipleri ile beraber foliküler hücre kökenli kanserlerde görülen mutasyonlar	24
Şekil 2.7. Farklı tiroid kanserlerinin ailesel geçişleri	28
Şekil 2.8. Nodüler guatrın İİAB temelli tanısı.....	30
Şekil 3.1. DD- PCR yönteminin tek bazla bağlanan tipinin şematik gösterimi.....	50
Şekil 4.1. Nodülde gen ifadesi artışı ya da kanser grubunda gen ifadesinde azalma bulunan 13 bölgeden 1 adedinin (162 nolu aday bölge) grafiği.	67
Şekil 4.2. Nodülde gen ifadesi artışı ya da kanser grubunda gen ifadesinde azalma bulunan 13 bölgeden 6 adedinin (RPL15, ZFP36L2, EFCAB5, NACA, SMYD2 ve NDUFC2) grafikleri.....	68
Şekil 4.3. Nodülde gen ifadesi artışı ya da kanser grubunda gen ifadesinde azalma bulunan 14 bölgeden 6 adedinin (MPP1, MFF, EXOSC7, KIAA1671, 213 ve 145 nolu aday bölgeler) grafikleri.....	69
Şekil 4.4. Kanser grubunda artış (veya nodülde düşüş) görülen tek bölge olan 113 nolu aday bölgeye ait grafik.....	70
Şekil 4.5. PTK-K'da gen ifadesi artışı görülen 6 bölgeden 6'sının (PSMG1, POP1, 115, 111, 151 ve 114 nolu aday bölgeler) grafikleri.....	71
Şekil 4.6. Yalnızca PTK-K'da azalma görülen 131 nolu bölgeye ait ölçüm grafiği	72
Şekil 4.7. Nodüle kıyasen aynı fakat alt tipler arası gen ifade farklılığı gösteren 215 nolu aday bölgeye ait grafik.....	72

Şekil 4.8.Yalnızca PTK-F’de azalma veya diğer iki grupta artış görülen 10 bölgeden 6’sının (ARPP19, BCL6, PPP1R16A, LOC284440, RPL7, DAD1) ölçüm grafikleri... 73
Şekil 4.9. Yalnızca PTK-F’de azalma ya da diğer iki grupta artma görülen 10 bölgeden 4 adedinin (MCM3, IK, SEPT7, ve 185 nolu aday bölge) ölçüm grafikleri. 74
Şekil 4.10. Cytoscape arayüzü ile elde edilmiş 14 adet gene ait karmaşık ilişki ağı..... 79
Şekil 4.11. Etkileşim ağına girmeyen SEPT7, POP1, ARPP19 ve MFF genlerinin Cytoscape’den elde edilen görüntülerinin ayrıntılı olarak gösterimi..... 79

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Tiroid neoplazilerinin WHO ve AFIP ölçütlerine göre sınıflandırılması.....	11
Tablo 2.2. Çeşitli gruplar tarafından yapılan güncel çalışmalarda elde edilen verilere göre belli gen bölgelerinin tiroid kanser oluşumu ile ilişkisi tespit edilmiştir.....	26
Tablo 2.3. Tiroid kanserlerinde tümör tipine göre rastlanan mutasyonların sıklıkları. ..	31
Tablo 2.4. Çeşitli araştırmacılar tarafından tiroid tümörlerinde moleküler ayırım yapılması amacı ile çalışılan aday belirteç/panel/yöntemler	32
Tablo 3.1. Doku örneklerinin elde edildiği bireylere ait yaş, cinsiyet ve doku tiplerini belirten tablo.	43
Tablo 3.2. RNA ölçüm değerleri.	46
Tablo 3.3. Takara ve Roche marka kitler kullanılarak cDNA eldesinde kullanılan kimyasal oranları.....	47
Tablo 3.4. cDNA eldesi için kullanılan ana karışıma eklenen RNA miktarları.	48
Tablo 3.5. RT-PCR tepkime koşulları	48
Tablo 3.6. Bu çalışmada kullanılan primer dizilimleri.	51
Tablo 3.7. Primer kombinasyonlarının eldesi. Üst satır ve soldaki sütunların birbiri ile kombinasyonları sonucu 15 set primer elde edilmiştir.	51
Tablo 3.8. Liang ve ark. yaptıkları çalışmalarda DD-PCR primerlerinin dizilimi tam olarak karşılama da çoğaltma yapabildiklerini göstermişlerdir.	52
Tablo 3.9. Değişken primer sayısına bağlı olarak transkriptomun ne kadarının kapsanabileceğine yönelik istatistikî hesap.	52
Tablo 3.10. Toplam hacmi 12.5 µl olacak şekilde PCR bileşenlerine ait iyileştirilmiş derişimler.	53
Tablo 3.11. İkinci sarmal cDNA eldesine ait PCR tepkime koşulları.	53
Tablo 3.12. Stok akrilamid çözeltisi hazırlanışı.	54
Tablo 3.13. Yüzde 7 konsantrasyonda akrilamid jel için eklenen kimyasal oranları.	54

Tablo 3.14. DNA dizin analizi için örneklerin hazırlanması aşamasında kullanılan karışım oranları.	60
Tablo 3.15. DNA dizin analizi öncesi yapılan PCR döngü koşulları.	60
Tablo 3.16. BLAST işlemi için kullanılan blastn algoritma değişkenleri.	61
Tablo 4.1. Kullanılan primerler esas alınarak aday bölgelerin isimlendirilmesi.	62
Tablo 4.2. Gruplar bazında aday bölgelerin elde edilen p değerleri.	63
Tablo 4.3. Çalışılan bölgelerin BLAST analizi sonucu elde edilen ilişkili genlerin “Gene id” ve isimleri.....	65
Tablo 4.4. Gruplar arası kıyaslama yapıldığında PTK'nın hem alt tiplerinde hem de alt tiplerin kendi aralarında gen ifadesi farklılığı görülmüştür.	66
Tablo 4.5. İlgili olduğu bulunan genlerin ifadesinde gözlenen değişimin gruplara yansımalarını gösteren tablo.	75
Tablo 4.6. İlişkili olduğu tespit edilen genlerin kromozomal yerleşim bilgileri ve alternatif isimlendirmeleri.....	77

RESİM LİSTESİ

Resim 2.1. Tiroid dokusunun hematoxilen ve eozin ile boyanmış görüntüsü.	10
Resim 2.2. Yaklaşık 1.5 cm çapında bir foliküler adenom.	12
Resim 2.3. A) Papiller tiroid karsinom dokusu. B) Bazı PTK dokularında rastlanabilen psammoma cismi.	14
Resim 2.4. FTK'ya ait mikroskopik görüntü.	16
Resim 3.1. DD-PCR jel görüntüsü.....	56
Resim 3.2. Gen ifade farklılığının jel görüntüsüne yansıması.....	57
Resim 3.3. Gimp resim işleme programı yardımı ile görüntülerin densitometrik analize hazır hale getirilmesi.....	58
Resim 3.4. ImageJ programı kullanılarak doğrudan alan ölçüm yöntemi ile Area, Mean ve ID değerlerinin sayısal olarak elde edilmesi.	59
Resim 4.1. DNA dizin analizi sonuçları..	64
Resim 4.2. RPL15 gen ürününe ait BLAST görüntüsü.	65
Resim 4.3. RPL15'in NDUFC2, RPL7 ve NACA ile moleküler işlev yönünden etkileşimi.....	78

ÖZET

İYİ HUYLU TİROİD NODÜLLERİ VE PAPİLLER TİROİD KARSİNOMLARIN MOLEKÜLER AYIRICI TANISI

Yusuf Ziya İĞCİ

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanları: Prof Dr Ahmet ARSLAN, Prof. Dr. Ersin AKARSU

Temmuz 2010, 98 sayfa

Somatik ya da germinal mutasyonlar sonucu ortaya çıkabilen papiller tiroid karsinom (PTK) tiroid kanserleri içerisinde yaklaşık %80 oranında sıklıkla en çok rastlanan tiroid kanser tipidir. İyi ve kötü huylu tiroid lezyonlarının ayırımında en etkili yöntem ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) yöntemidir. İİAB ile tanı sonucunda belirsiz veya şüpheli sonuç oranı yaklaşık %30'u bulabilmektedir. İİAB sonucu belirsiz olan ve dolayısıyla cerrahi operasyon yapılan dokuların daha sonra yapılan incelemelerinde ancak %30'a varabilen kısmı kötü huylu çıkmakta ve geri kalanında yapılan cerrahi müdahale ise gereksiz yere gerçekleştirilmiş olmaktadır. Bu nedenle tiroid kanser araştırmalarında en önemli hedeflerden biri de özellikle İİAB'nin yetersiz kaldığı durumlarda tanıya yardımcı belirteçlerin tespiti olmuştur. Bu zamana kadar genetik ve immunohistokimyasal belirteçler ile çeşitli epigenetik faktörlerin tiroid kanser tanısında kullanımıyla ilgili birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen tam güvenilir ve kabul görmüş herhangi bir belirteç tespit edilememiştir. Bu çalışmada PTK'yı iyi huylu nodüllerden ayıran gen ifadesi seviyesinde moleküler belirteçler araştırılmıştır. Çalışmamızda DD-PCR yöntemi kullanılarak PTK'nın alt tiplerinden ikisi; foliküler alt tip (PTK-F) ve klasik alt tip (PTK-K) ile iyi huylu tiroid nodülleri arasındaki gen ifade farklılıkları ortaya konmuştur. Buna göre, toplam sayısı 42 olan çalışılan doku örneklerin dağılımı 15 adet iyi huylu tiroid nodülü, 14 adet PTK-F ve 13 bireye ait PTK-K şeklindedir. Bu çalışma sonucunda 21 adet genin ifadesindeki değişimler kullanılarak kanserli doku ile iyi huylu nodülün; PTK-K içeren doku ile nodül veya PTK-F dokularının birbirinden ayrılacağı görülmüştür. Bu bulgulardan yola çıkılarak tiroid kanser tanısında yeni belirteçlerin geliştirilebileceği gibi aynı zamanda tiroid kanser biyolojisinin de daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: belirteç, DD-PCR, ince iğne aspirasyon biyopsisi, gen ifadesi, papiller tiroid karsinom

ABSTRACT

MOLECULAR DISCRIMINATIVE DIAGNOSIS OF BENIGN THYROID NODULES AND MALIGN THYROID CARCINOMAS

Yusuf Ziya İĞÇİ

Doctoral thesis, Department of Medical Biology

Supervisors: Prof Dr Ahmet ARSLAN, Prof. Dr. Ersin AKARSU

July 2010, 98 pages

Papillary thyroid carcinoma (PTC), which emerges as a result of somatic or germinal mutations, is the most common thyroid cancer type with an approximate frequency of eighty percent. Fine needle aspiration biopsy (FNA) is the most effective method in discriminating benign from malignant lesions. Up to 30% of FNA results are indeterminate or suspicious. These patients with suspicious or indeterminate results usually undergo surgery. According to the post-operational histopathological analysis, up to 30% of them carry a diagnosis of cancer which ultimately makes many of these operations unnecessary. For this reason, one of the greatest challenges in thyroid cancer research is to develop an adjunct to FNA to clarify the indeterminate lesions as benign or malignant. As for now, none of the potential immunohistochemical and genetic biomarkers or epigenetic mechanisms was proven to be totally succeeded in discrimination of these lesions. In this study potential biomarkers of PTC in gene expression level were investigated using DD-PCR method in 3 groups of totally 42 persons. Tissue distributions of the samples were 15 benign thyroid nodules, 14 follicular variant of PTC (FVPTC), and 13 classic variant of PTC (CVPTC). As a result of the study, using 21 genes' expression levels it was proven to be discriminated benign nodules and PTC lesions including its 2 subtypes (FVPTC or CVPTC). It is suggested that using the data obtained, not only new biomarkers can be developed in thyroid cancer diagnosis but also a chance of better understanding of thyroid cancer biology will be possible.

Key words: DD-PCR, fine-needle aspiration biopsy, gene expression, marker, papillary thyroid carcinoma

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser birçok ülkede en önemli toplumsal sağlık problemlerinden biridir. Örneğin, ABD’de her dört ölümden biri kanser kaynaklıdır (1). Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de kanser vakaları her geçen gün artış göstermektedir (2).

En sık görülen endokrin neoplazisi olan tiroid kanseri bütün kanserler içerisinde %1 ile %2.5 arası bir oranla yer almaktadır (1,3). Dünya çapında her yıl yaklaşık 122000 adet yeni tiroid kanseri vakası bildirilmektedir (4,5). Amerikan Kanser Derneği verilerine göre 2003 yılında tespit edilen tiroid kanser sıklığı 1/10000’dir (3). Muhtemelen küçük tümörlerin tespitinde elde edilen gelişmelerin de etkisiyle, ABD’de 10 yıllık dönem içerisinde tespit edilen tiroid kanser vakası iki katına çıkmıştır (6). Ülkemizde Sağlık Bakanlığı’nın 2004-2006 yılları arası dönemi kapsayan çalışmasına göre, tüm kanser vakaları içerisinde tiroid kanserinin yüzdesi erkeklerde %1; kadınlarda ise %6.3 olarak bulunmuştur (2).

Tiroid kanserine bağlı olarak gerçekleşen ölüm oranları diğer birçok kansere kıyasla düşüktür (3). ABD’de 2008 yılı içerisinde tespit edilen 37340 tiroid kanseri vakasından 1590 adedi ölümlle sonuçlanmıştır (1). Bu verilere göre, tüm kanserlerden kaynaklı ölümler içerisinde tiroid kanserinin oranı yalnızca %0.28’dir (1). Ölüm oranının düşük seyretmesinin nedeni olarak, kötü huylu lezyonlarda neoplazinin çok yavaş büyümesi ve yeterli tedavi gören hastalardaki tedavi cevabının yüksek olması gösterilebilir (7). Örneğin, tiroid kanserlerinden en sık görülen tipi olan papiller tiroid karsinomun (PTK) tedavi sonrası 40 yıllık süre içerisinde sağ kalım oranı %84 olarak bildirilmiştir (8). Bu oran foliküler tiroid kanserlerinde %94’tür (9). Tedavi cevabının en düşük olduğu, dolayısı ile ölüm oranının en yüksek olduğu tiroid kanserleri anaplastik tiroid kanserleridir (9).

Genel nüfusa oranlandığında klinikte tespit edilen tiroid nodül sıklığı %4.2’dir (7,10). Fakat otopside tespit edilen nodül sıklıkları daha yüksek olup, tespit yüzdeleri %8 ile

%65 arasında değişmektedir (7,10). Tiroid nodülleri kadın hastalarda, ileri yaşlarda ve radyasyona maruz kalanlarda daha sık görülmektedir (7,10).

Tiroid bezinde iyi sınırlı, iyi huylu adenomlardan çok saldırgan seyreden anaplastik karsinomlara kadar değişen özellikte çeşitli tümörler gelişir (11). Tiroid nodülleri olan hastalarda klinik açıdan önemli olan, tümör bulunma olasılığıdır (11).

Kanser şüphesi ile gelen olguya tanı amaçlı ilk müdahale fizik muayene ile yapılmakta; yaş, cinsiyet, radyasyona maruz kalma, nodül büyüklüğü, aile hikayesi, dokuda hassasiyet vb. klinik veriler tiroid fonksiyon testleri, sintigrafi, ultrasonografi, biyopsi vb. çeşitli laboratuvar yöntemleri ile desteklenmektedir (7). Anaplastik tiroid kanseri haricinde foliküler kökenli tiroid kanserlerinin çoğunda prognoz oldukça iyi olmasına karşın, hasta için en uygun tedavi yöntemi tiroidektomiden, profilaktik veya tedavi amaçlı lenf düğümü çıkarılmasına veya rutin dozda radyoaktif iyot tedavisine kadar değişkenlik göstermektedir (9,12).

Günümüzde tiroid nodüllerinin tanısında kullanılan en etkili yöntem ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) olarak kabul edilmektedir (13). İİAB, 1970'li yıllardan bugüne dek tiroid nodül tanısında kullanılmaktadır ve cerrahi operasyon sayısının en az %25 oranında düşmesine ve tiroid kanseri tanısında iki kat artışa neden olmuştur (10,12). Ancak İİAB'nin tanıda yetersiz kaldığı durumlar da mevcuttur (13). Yapılan İİAB testlerinin sonucunda tiroid nodüllerinin %60-80'i iyi huylu, %4-10'u kötü huylu ve %10-20'si belirsiz olarak bulunmaktadır (10,12). Ayrıca, İİAB sonuçlarının değerlendirilmesinde %10'a varabilen oranlarda kişiden kişiye farklılıklar da bildirilmiştir (10,12). Bu hata payı ile beraber düşünüldüğünde İİAB'den elde edilen belirsiz sonuç oranı yaklaşık %30'u bulmaktadır (12). Lezyonun belirsiz olarak tespit edildiği grup, kanser tanısı koyabilmek için şartları sağlayamayan hücresel atipi, şüpheli lezyonlar ve foliküler lezyonları içermektedir (10).

Belirsiz veya şüpheli lezyonlar için uygulanan işlem cerrahi operasyon yapılmasıdır (10). İİAB testi sonucunun belirsiz veya şüpheli çıkması nedeni ile tiroidektomi yapılan lezyonların histopatolojik incelemesi neticesince sadece %4 ile %30 arası bir kısmı kötü

huyly çıkmakta ve yapılan cerrahi operasyonu büyük ölçüde gereksiz kılmaktadır (10). Bu nedenle, tiroid kanser araştırmalarında en önemli hedeflerden biri de özellikle İİAB'nin yetersiz kaldığı durumlarda tanıda yardımcı bir metot geliştirilmesidir (10). Diğer yandan, tümör olduğu bilinen olgulardaki tümör saldırganlığının derecesinin tespitinde kullanılmak üzere belirteç araştırmaları da devam etmektedir (12,14). Bu durumda daha güvenli bir şekilde tanı konarak gereksiz cerrahi operasyonların sayısı azaltılabileceği gibi tümör saldırganlığı konusunda da bilgi sahibi olunabilecektir (10,14). Fakat hâlihazırda bu anlamda tam güvenilir ve kabul görmüş herhangi bir belirteç bulunmamaktadır (10).

İİAB bulgularını destekleyecek veya daha iyimser bir ifadeyle, tiroid kanseri tespitinde tek başına kullanılacak belirteç veya panel(ler)'in geliştirilmesine yönelik çalışmalar birçok grup tarafından devam ettirilmektedir (10,13,15,16). Tiroid kanser tanısı alanında yapılan çalışmaların ilk yıllarında tek bir belirteç kullanarak ayırım yapılabileceği konusunda mitlendirici veriler elde edilmesine karşın, takip eden çalışmalarda tek bir belirtecin hassasiyet ve seçicilik konusunda yeterli olmadığı görülmüştür (10). Mevcut veriler ışığında, birden fazla belirtecin kullanılmasıyla oluşturulmuş panel(ler)in daha güvenilir olabileceği düşünülmektedir (10,17).

Tiroid kanser belirteçlerine yönelik çalışmalarda immnositokimya, mikrodizin analizi, RT-PCR, enzime bağlı immünosorbent analizi, DD-PCR, Genefishing gibi birçok teknik kullanılmaktadır (10,15,18). Diğer yandan, daha önceki çalışmalarda elde edilmiş transkriptom ve proteinler arası etkileşim verilerinin bilgisayar ortamında değerlendirilmesi sureti ile biyoinformatik alanında da meta-analiz çalışmaları devam etmektedir (15,19). Son zamanlarda iyice yaygınlaşmış olan mikrodizin teknolojisinin aynı anda neredeyse transkriptomun tamamının karşılaştırmalı olarak incelenmesine imkân tanınması nedeni ile tiroid kanser çalışmalarında bu teknoloji çokça kullanılmaktadır (15,16). Tiroid kanser araştırmalarında son yıllarda ilgili yayın sayısının artış gösterdiği diğer bir araştırma alanı da mikro RNA (miRNA) alışmalarıdır. miRNA moleküllerinin metastaz, hücre yayılımı, hücre döngüsü ve apoptoz ile ilgili olduğu yönünde veriler her geçen gün artmakta; dolayısıyla kanser tanısı, prognozu ve tedavisi alanındaki araştırmaların bir kısmı bu alanda artarak devam

etmektedir (10). Mikro RNA'ya ek olarak CpG adacıklarının hipermetilasyonu, histon düzenlemeleri gibi bazı epigenetik düzenlemelerin de tiroid kanseri ile ilişkisi gösterilmiştir (14).

PTK, tiroid kanserleri içerisinde yaklaşık %80 oranıyla en sık rastlanan türdür (8). Diğer karsinomlardan foliküler tiroid karsinom (FTK) %10-20; medüller tiroid karsinom (MTK) %5 ve anaplastik tiroid karsinom (ATK) ise %5'ten az sıklıkla görülmektedir (11,20).

Bu çalışmada tiroid kanserleri içinde baskın olarak yer alan PTK'yı tiroid nodüllerden ayıran gen ifadesi seviyesinde moleküler belirteçler araştırılmıştır. Çalışmamızda Differential Display-PCR (DD-PCR) yöntemi kullanılarak PTK'nın alt tiplerinden ikisi; foliküler alt tip (PTK-F) ve klasik alt tip (PTK-K) ile iyi huylu olduğu patolojik analiz sonucu kesinleşmiş tiroid nodülleri arasındaki gen ifade farklılıkları ortaya konmuştur.

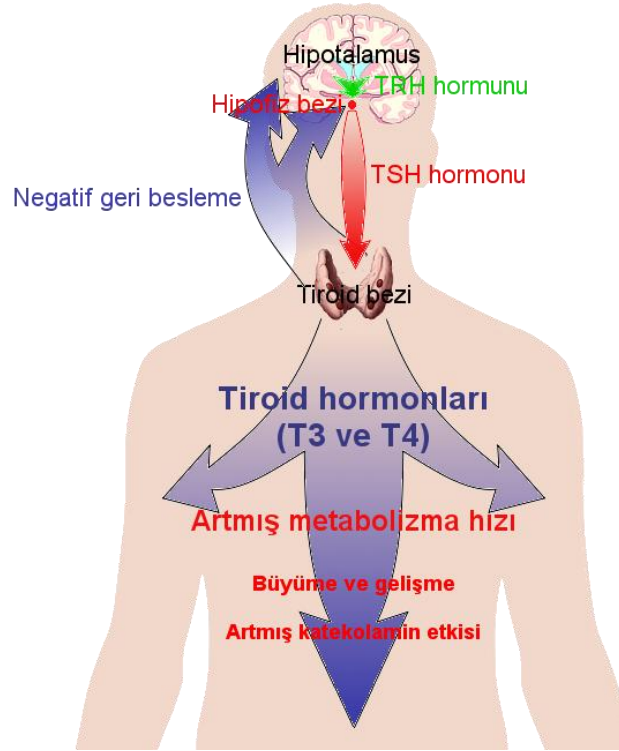
Bu çalışmadan elde edilen bulgularla, hem tiroid kanser olgularına özel belirteçler geliştirilebileceği hem de tiroid kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Tiroid Bezi

Tiroid bezi yaklaşık 20 g. olan ağırlığı ile insan vücudundaki iç salgı bezi işlevi yürüten en büyük organdır (20). Bununla beraber tiroid bezinin büyüme potansiyeli oldukça fazladır. Bazı guatrlar birkaç bin gram ağırlığa kadar bile ulaşabilmektedir (20,21).

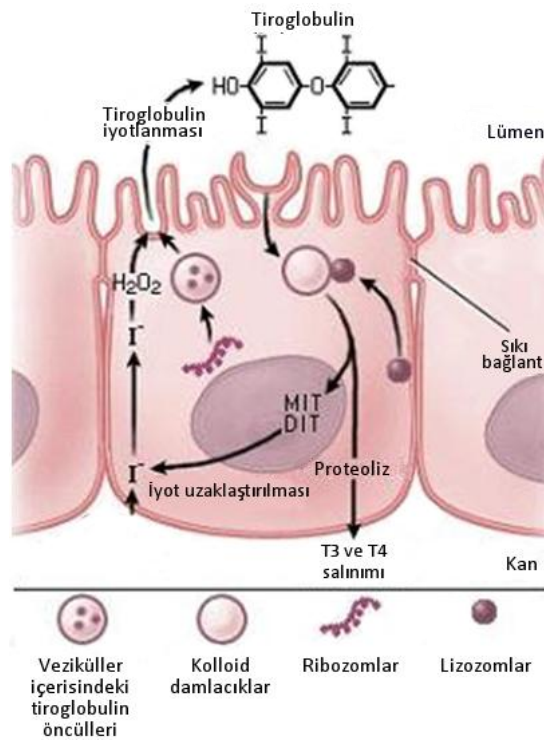
Tiroid bezi T_4 hormonu (3,5,3',5'-L-tetrayodotreoinin) ve T_3 (3,5,3'-L-triiodotreoinin) hormonlarını salgılamaktadır. Tiroid hormonları büyüme ve gelişim, ısı ve enerji üretimi gibi birçok yaşamsal işlevin düzenlenmesinde yer aldıkları gibi kalp, karaciğer, iskelet kası, böbrek ve deride de dokuya özel etkileri bulunmaktadır (Şekil 2.1) (21). Ayrıca tiroid bezince yer alan parafoliküler hücreler kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesinde önemli olan kalsitonin hormonu salgılamaktadırlar (21).



Şekil 2.1. Tiroid hormon sistemine genel bir bakış. Tiroid hormonları T_3 ve T_4 , metabolizmanın artmasında ve gelişmede etkilidir (21, 22).

Tiroid hormonları etkilerini iki genel mekanizma yolu ile; (I) T_3 hormonunun nükleer alıcıları ile etkileşimleri yoluyla gen ifadesi düzenlenmesiyle, (II) T_3 ve T_4 hormonlarının belli enzimlerle (kalsiyum ATPaz, adenilat siklaz, monomerik piruvat kinaz vb.) genomik olmayan etkileşimleri sonucu göstermektedirler (21).

Tiroid hormonları %59-65 arası bir oranda iyot elementi içerirler (21). Tiroid hormonları glikoprotein yapıdaki tiroglobulin (Tg) molekülünün tirozin amino asidi kalıntılarındaki fenolik halkasal yapıların iyotlanması ile sentezlenmektedirler (Şekil 2.2) (21).

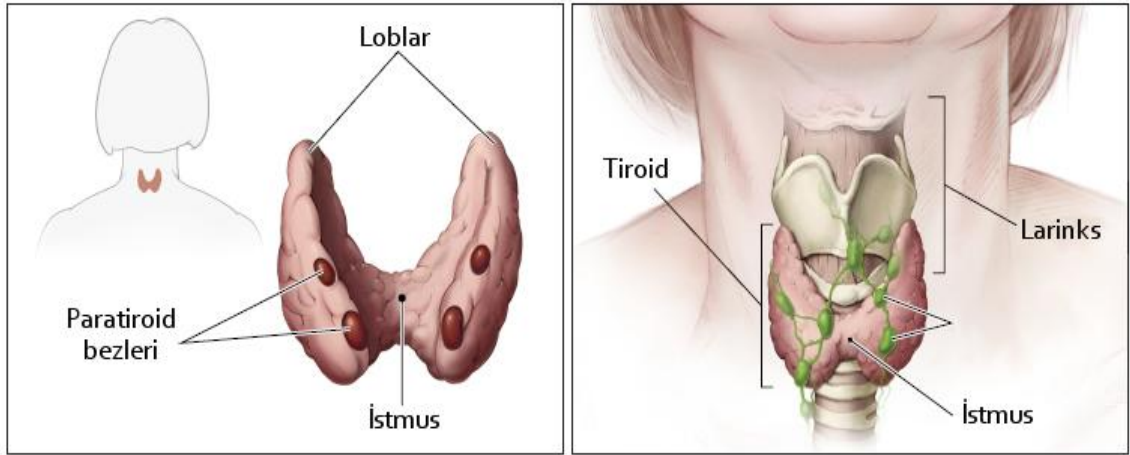


Şekil 2.2. Tiroid hormonlarının salınımı. Lümen doğru girinti yapmış mikrovillus yapılar Tg endositozunda görev almaktadırlar. MIT: monoiyodo tirozin, DIT: diiyodo tirozin (21).

T_3 ve T_4 hormonlarının sentezlenmesi 6 ana adımı içermektedir: (I) I^- iyonlarının aktif taşıma yolu ile tiroid hücrelerine taşınması; (II) iyotun yükseltgenmesi, Tg'de yer alan tirozil kalıntılarının iyotlanması; (III) iyodotirozin moleküllerinin T_3 ve T_4 oluşturmak üzere Tg ile eşleşmesi; (IV) Tg'nin iyodotreinin ve iyodotirozin oluşturmak üzere proteolizi; (V) tiroid hücrelerinde iyodotirozinlerden iyot uzaklaştırılması ve serbest

kalan iyodun muhafazası ve tekrar kullanımı; (VI) T_3 ve T_4 'ten bazı özel durumlarda intratiroidal $5'$ iyot uzaklaştırılması (Şekil 2.2) (20,21).

Tiroid bezi trakea'nın ventral taraflarında yer alan, şekil olarak ise kelebeğin kanatlarına benzeyen iki lobdan oluşmaktadır (20,21). Her bir lobun boyu yaklaşık 4 cm. kalınlığı ise 2 cm.dir. Loblar birbirine istmus adı verilen ince bir tabaka bağ dokusu ile bağlıdır (Şekil 2.3) (21,23).



Şekil 2.3. Tiroid bezinin anatomik yerleşimi. Kelebek benzeri bir yapı oluşturan tiroid bezinde sağ ve sol loblar istmus adı verilen bölge ile birbirine bağlanmaktadır (22).

Tiroid bezine doğru eksternal karotis ve subklavian arterlerden yüksek miktarda kan akışı olmaktadır (21,23). Tiroid bezi ünite başı gram olarak böbreklerden daha fazla kanlanmaktadır; hipertiroidi olduğu durumlarda kan akışı steteskopla duyulabilecek kadar (5mL/g/dak) artabilmektedir (21,23).

Tiroid bezinin işlevsel birimi, birbirine zengin kapiller damar ağı ile bağlanmış foliküler hücrelerdir (20). Tiroid dokusunun çok büyük bir kısmını protein içeriği zengin kolloid bir yapı teşkil etmektedir (20).

Doku kültürü çalışmaları ile her bir folikül hücresinin farklı birer klon oluşturabilme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (21). Bu hücreler TSH ile uyarıldıklarında

yuvarlak olan yapılarını kaybedip uzun bir yapı kazanmakta istirahat anında ise eski şekillerine dönmektedirler (21).

Folikül hücrelerinden folikül lümeninden dışarı salınmak üzere Tg sentezlenmektedir. T₃ ve T₄ hormonlarının sentezi, hücre-kolloid kesişim noktasında folikül hücrelerinden sentezlenen Tg kullanılarak gerçekleştirilmektedir (21). Folikül hücrelerinin yüzeylerinde bol miktarda yer alan lümeneye doğru yönelmiş mikrovilluslar Tg'yi endositoz yolu ile alarak tiroid hormonlarının salınmasında rol almaktadırlar (Şekil 2.2) (21).

Kolloidin çapı değişkenlik göstermekle beraber ortalama olarak 200µm uzunluktadır (20). Kolloidin etrafında kümelenmiş olan foliküler hücreler apikal olarak kolloide bazal olarak ise kan damarlarına yönelmişlerdir (Resim 2.1) (23).



Resim 2.1. Tiroid dokusunun hematoksilen ve eozin ile boyanmış görüntüsü. 1- Tiroid folikülü. 2- İçi kolloid ile dolu tiroid folikülü. 3- Kan damarı 4- Foliküller arası kümelenmiş parafoliküler hücreler (24).

2.2 Tiroid neoplazileri

Tiroid tümörleri en sık rastlanan endokrin neoplazisidir (20). Genellikle tiroide palpasyon ile teşhis edilebilir büyüklükle anterior boyun nodülleri şeklinde ortaya çıkarlar (20). Bu nodüllerin çoğu hiperplastik (kolloid) özelliindedir (20). Geri kalan yaklaşık %5 ile %20 arasındaki nodüller klinik açıdan önem taşıyan gerçek neoplazilerdir (20).

Tiroid tümörlerinin çoğu tek nodül olarak ortaya çıkar (11). Tiroid neoplazileri iyi huylu nodüller ve adenomlar, foliküler hücre kökenli (farklılaşmış veya farklılaşmamış) kötü huylu tümörler, parafoliküler C hücresi kökenli medüller tiroid karsinom ve nadir olarak diğer şekilleri ile ortaya çıkabilirler (Tablo 2.1) (11,12,20,21).

Tablo 2.1. Tiroid neoplazilerinin WHO ve AFIP ölçütlerine göre sınıflandırılması (20).

Primer epitel tümörler	Primer epitel olmayan tümörler
Foliküler Hücre kökenliler	Kötü huylu lenfomalar
İyi huylu: Foliküler adenom	Sarkomalar
Kötü huylu: Karsinom	Diğerleri
Farklılaşmış Papiller karsinom Foliküler karsinom	İkincil tümörler
Az farklılaşmış İnsülar karsinom Diğerleri	
Farklılaşmamış (anaplastik)	
C Hücre kökenliler	
Medüller karsinom	
Hem foliküler hem de C hücre kökenliler	
Medüler-foliküler karsinom karışımı	

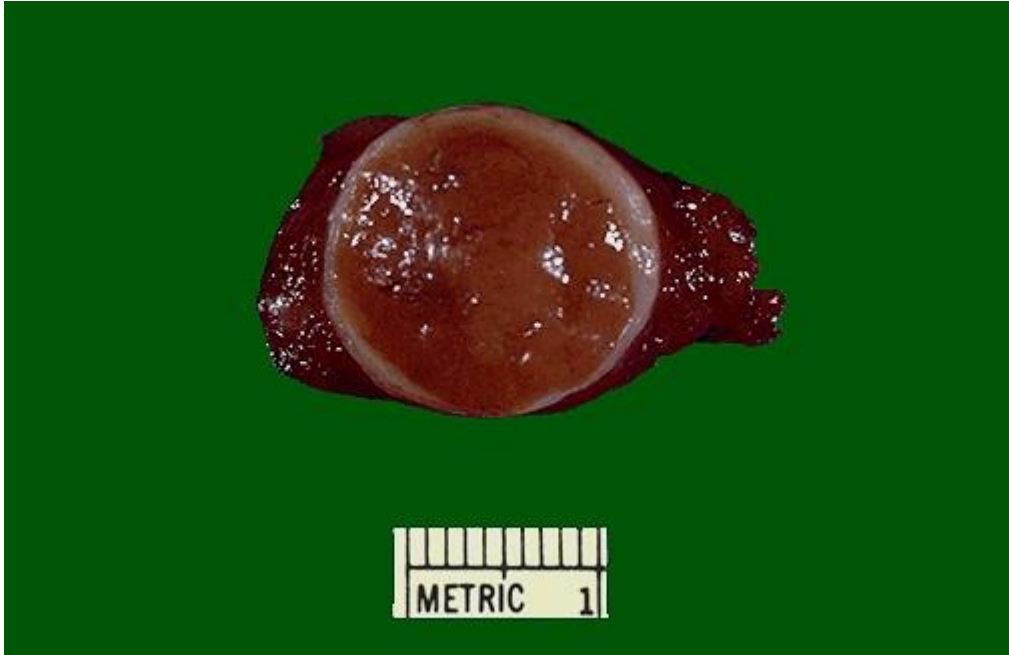
Tiroid nodülleri özellikle kadınlarda erkeklere oranla 4 kat yaygındır (21). Genç çocuklarda rastlanma sıklığı %1'den az; 11-18 yaş arası %1.5 ve 60 yaş üzeri insanlarda rastlanma sıklığı yaklaşık %5'dir (21). Tiroid nodüllerinin tersi olarak, tiroid tümörleri oldukça nadirdir (21). Tiroid tümörleri bütün kanserler içerisinde %1 ile %2.5 arası bir oranla yer almaktadır (1,3). Dünyada en yüksek görülme oranları olan bölgeler endemik guatrın görüldüğü bölgelerdir (25).

Kötü huylu olduğundan şüphelenilen nodüllerde tam bir aile hikâyesi ve dikkatli bir fizik muayene laboratuvar testleri, görüntüleme işlemleri ve en önemlisi İİAB ile desteklenmelidir (20). Bu yaklaşım doğru bir şekilde uygulandığında büyük oranda hasta için uygun tedavi uygulanabilmektedir (20).

2.2.1 Foliküler Adenom

Foliküler adenomlar (FA) foliküler hücre farklılaşmasının neticesinde oluşmuş etrafında kapsül bulunduran iyi huylu tümörlerdir (17). Tiroid tümörleri içerisinde en sık görülen neoplazi türüdür (20). Yapılan otopsilerin % 4 ile %20'si arası bir kısmında foliküler adenoma rastlanılmaktadır (20).

Genellikle tek bir tümör şeklinde ortaya çıkan foliküler adenomlarda sınırları oldukça belli, etrafındaki parenkim doku ile oldukça keskin bir şekilde ayrılabilir fibröz yapıda bir kapsül bulunmaktadır (Resim 2.2) (20).



Resim 2.2. Yaklaşık 1.5 cm çapında bir foliküler adenom. Tümörün etrafını çevreleyen fibröz yapı çok net bir şekilde görülmektedir (26).

Çap olarak 1-3 cm. uzunlukta bulunan foliküler adenomların kanama, ödem, fibröz, kalsifikasyon, osifikasyon ve sistik dejenerasyon gibi bozucu etkileri görülmektedir (20).

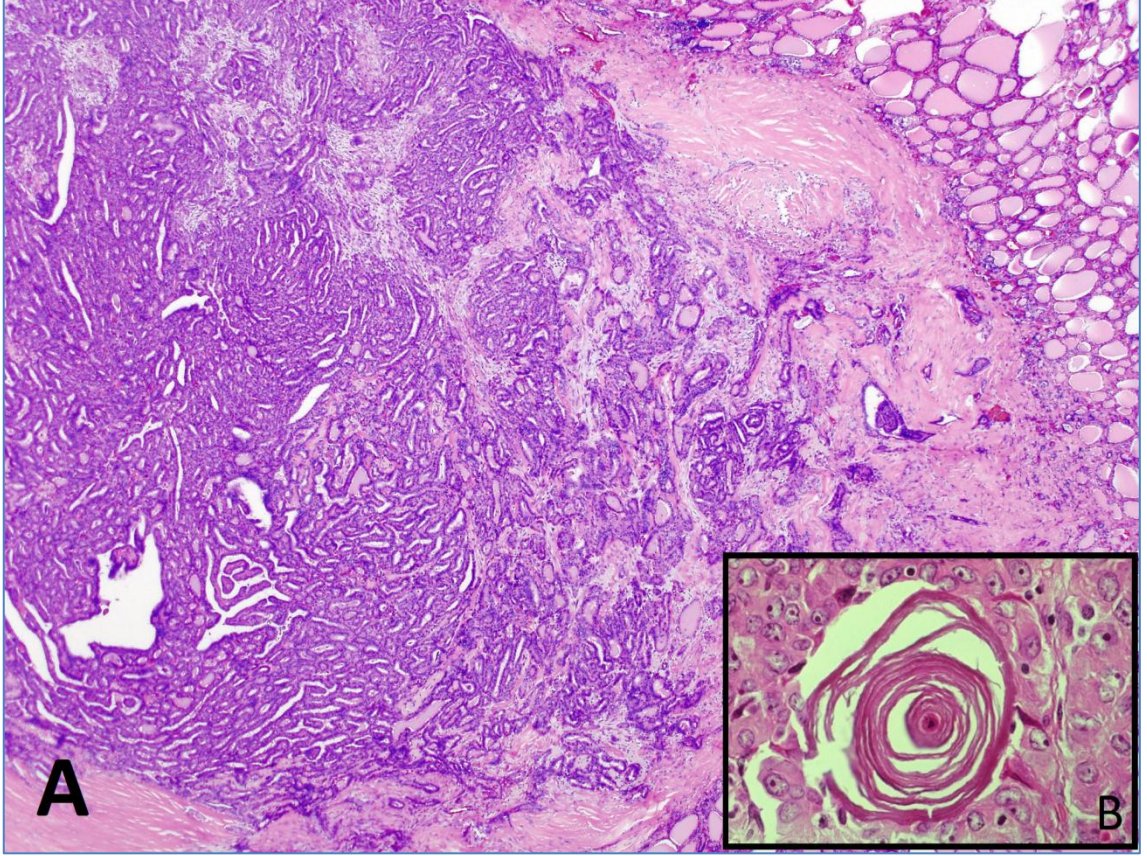
2.2.2 Papiller tiroid karsinom

PTK, histolojik olarak foliküler hücre farklılaşması gösteren, özgün olarak papilla ve bir dizi nükleer değişim geçirmiş kötü huylu epitel tümörü olarak tanımlanmıştır (20).

PTK ve FTK histolojik olarak farklılaşmış karsinomlardır (3). Papiller tiroid karsinom tiroid kanserlerinin en sık rastlanılanı olarak ABD’de görülen tüm tiroid kanserlerinin yaklaşık %80’ini teşkil etmektedir (15). Birçok tiroid tümörü sonradan somatik mutasyonlar sonucu ortaya çıksa da kalıtsal tiroid karsinom da germinal mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (3).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasına göre 1 cm çapın altında kalan PTK’lar papiller tiroid mikrokarsinom (PTM) olarak adlandırılmaktadır. PTM’ler PTK’lara nazaran çok daha fazla görülmektedirler (20). PTM’lerin otopsilerde görülme sıklıkları %4 ile %36 arasında değişmektedir (20).

PTK hücreleri tanısal açıdan öneme sahip farklılıkta çekirdek yapısına (normalden büyük olma, hatlarda kayma, nükleer sınırlarda düzensizlik, girintiler ve yalancı inklüzyonlar vb.) sahiptirler (27). Cerrahi operasyon öncesi PTK’nın tanımlanması İİAB örneğinde görülen hücrelerin özgün yapılarına bakılarak yapılmaktadır (20). Ayrıca PTK dokularının %40’ında psammoma cisimleri adı verilen kalsiyum içerikli yapılar bulunmakta ve bunlar PTK’nın ayırıcı tanısında kullanılmaktadır (Resim 2.3.B) (21).



Resim 2.3. A) Papiller tiroid karsinom dokusu. Resmin sol tarafında baskın olarak papiller yapılar görülebilmektedir. B) Bazı PTK dokularında rastlanabilen psammoma cismi (28,29).

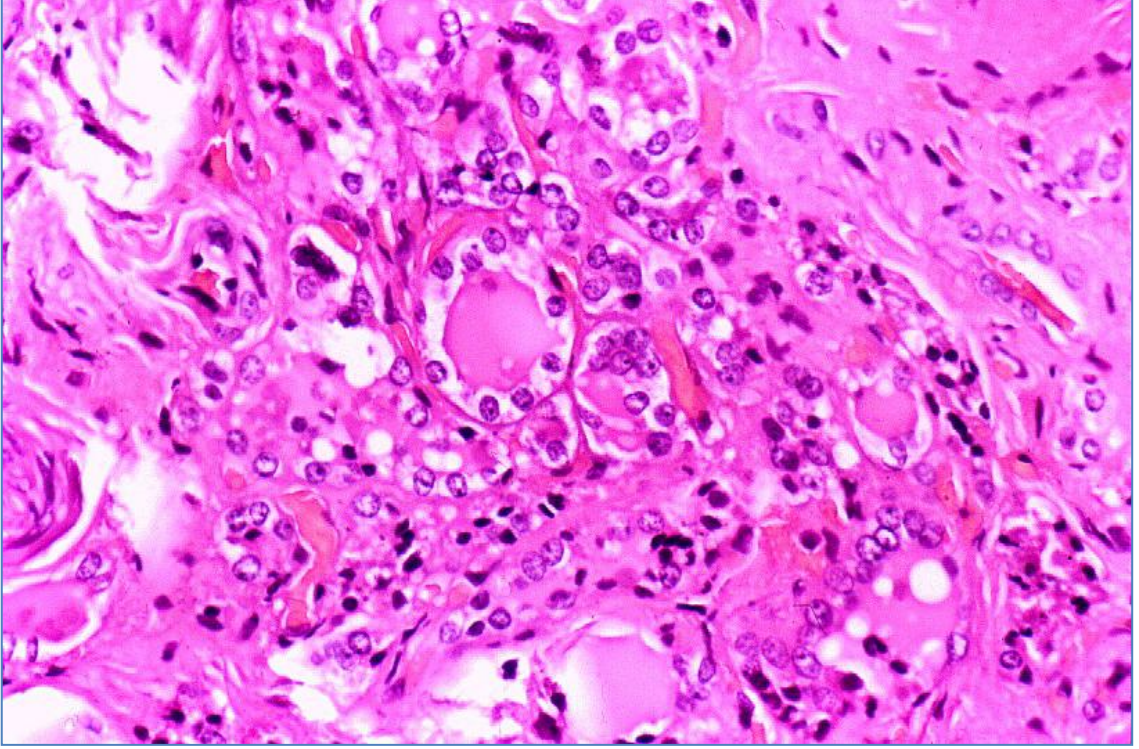
PTK hücrelerinde özgün olarak papiller yapılara sıkça rastlanılmaktadır fakat bu papiller yapılar benzer nükleer özelliklere sahip neoplastik foliküller ile karışmış haldedirler (Resim 2.3.A) (20). Eğer neoplastik foliküller tipik PTK hücrelerine benzer nükleer özelliğe sahip ve papiller yapıya göre daha baskın iseler; tümör papiller tiroid karsinomun foliküler alt tipi (PTK-F) olarak tanımlanmaktadır (20).

PTK genellikle intraglandular olarak ve yakın lenf düğümlerine yayılmaktadır (21). Sınırları belli olarak tiroid dokusunda ve yakın lenf düğümlerinde yılları bulan oldukça yavaş büyüme göstermektedirler (21). Yaşlılarda daha saldırgan olarak bölgesel kaslara ve tracheaya yayılım gösterebilmektedirler (21). Daha ileri evrelerde akciğere de yayılım gösterebilmektedirler (21).

PTK dolayısı ile ölüm genellikle boyun derin dokusuna yayılım nedeni ile bölgesel nedenlerden olmaktadır (21). Daha nadir olarak ise ölüm nedeni ileri seviye pulmoner metastaz dolayısı ile olmaktadır (21). Bazı yaşlılarda uzun süreli, yavaş büyüyen PTK hızla büyüyen ve farklılaşmamış veya anaplastik karsinoma dönüşebilmekte ve bu “geç evre anaplastik dönüşüm” nedeni ile ölümler olabilmektedir (21). Birçok PTK dokusunda Tg salgılanabilmekte ve bu da tekrar eden veya metastaz yapabilen kanserler için belirteç olarak da kullanılabilir (21).

2.2.3 Foliküler tiroid karsinom

FTK da PTK gibi histolojik olarak farklılaşmış bir karsinomdur (3). FTK kolloid oluşumunun zayıf olması nedeni ile küçük foliküllerin varlığı ile kendini göstermektedir (21). Mikroskopik analiz yapıldığında kapsüler veya vasküler yayılım varlığı haricinde FA ile FTK birbirine oldukça benzerdirler (21). Mikroskopik olarak hücreler küboid, büyük çekirdekli ve çekirdekler yoğun kolloid içeren foliküller ile çevrilidir (Resim 2.4) (21).



Resim 2.4. FTK'ya ait mikroskopik görüntü. Büyük çekirdekli hücreler göze çarpmaktadır (30).

FTK, PTK'ya nazaran daha saldırgan ilerleyici bir özellik göstermektedir (21). Yakın bölgelere yayılım göstererek lenf düğümleri veya kan damarlarına; uzak bölgelerden kemik ve akciğerlere metastaz yapabilmektedir (21).

FTK tümörlerinin çoğu radyoaktif iyot tutabilme özelliklerini koruyabilmekte, Tg sentezleyebilmekte; nadiren de olsa T₃ ve T₄ sentezleyebilmektedirler (21). Bu özelliklerinden dolayı işlevi devam eden tiroid kanseri neredeyse her zaman FTK'dır (21). Bu özellikleri ile FTK tümörleri radyoaktif iyot tedavisine daha çok yatkın bir özelliktedirler (21). FTK hücrelerinin Tg salınımları hastalığın gidişatının kontrolünde kullanılabilir (21).

FTK nedeni ile ölümler daha çok bölgesel yayılımın yanısıra kemik, akciğer veya iç organlar gibi uzak bölgelere gerçekleşen metastaz nedeni ile olmaktadır (21). PTK ve FTK'yı aynı anda içeren karışık tip karsinomlar daha çok PTK gibi seyretmektedir (21).

2.2.3.1 Hurthle hücreli (onkositik) karsinom

Hurthle hücreli karsinom (HHK) FTK'nın çok sayıda mitokondri içeren büyük tekli hücreler ile kendini gösteren bir alt tipidir (20). HHK hücreleri radyoaktif iyodu nadiren depolamaları haricince FTK hücreleri gibi davranmaktadırlar (20).

2.2.4 Medüller tiroid karsinom

MTK parafoliküler hücre kökenlidir (21). MTK, PTK ve FTK'ya nazaran daha fazla; anaplastik karsinoma göre ise daha az saldırgan bir seyir izlemektedir (21). Lenf düğümleri, yakın bölgelerdeki kaslar ve trakeaya yayılım göstermektedir (21). Lenf sistemi, damarlara yayılıp buralardan akciğer ve iç organlara metastaz yapabilmektedir (21).

MTK'ların %25-35'i ailesel geçiş özelliğine sahip ailesel medüller karsinomdur (MTK-A) ve bunların üçte biri ölümcüldür (21,31).

2.2.5 Farklaşmamış (anaplastik) karsinom

ATK küçük hücreli, dev hücreli ve iğ hücreli karsinomları içermektedir (21). Uzun süreli guatr hikayesi olan ileri yaştaki hastalarda aniden büyüme, baskı artışı, yutma zorluğu ve ses teli felci şeklinde görülmektedir (21). Array-CGH yöntemi ile yapılan çalışmalarda birçok gen bölgesinin ATK'da anormal bir yapıda olduğu görülmüştür. Bu genlerden biri de hücre döngüsü düzenleyici proteini olan siklin D1'i kodlayan CCND1 genidir (14).

Ölüm 6-36 ay içerisinde yoğun bölgesel yayılımdan kaynaklanmaktadır (21). Bu tür tümörler tedaviye oldukça dirençlidirler (21).

2.2.6 Diğer tiroid neoplazileri

Bu grupta lenfoma ve tiroide metastaz yapmış kanserler yer almaktadır (21). Hızlı büyüyen tiroid kanserleri içerisinde tedaviye cevap veren tek tür, lenfomadır (21). Genel anlamda bir lenfomanın yayılımı sonucu olabileceği gibi öncülü tiroid bezi içerisinde yer alan bir lenfoma da olabilir (21). Tiroid lenfoma genellikle uzun süreli Hashimoto tiroiditisi olan hastalardan gelişmekte ve kronik tiroiditisten ayrımının yapılması zor olabilmektedir (21). Tiroid foliküllerinin ve kan damar çeperlerinin lenfosit yayılımı ile kendini göstermekte ve bu özelliği ile kronik tiroiditisten ayrılmaktadır (21). Eğer sistemik bir yayılım yok ise radyasyon tedavisine iyi bir cevap verebilmektedir (21).

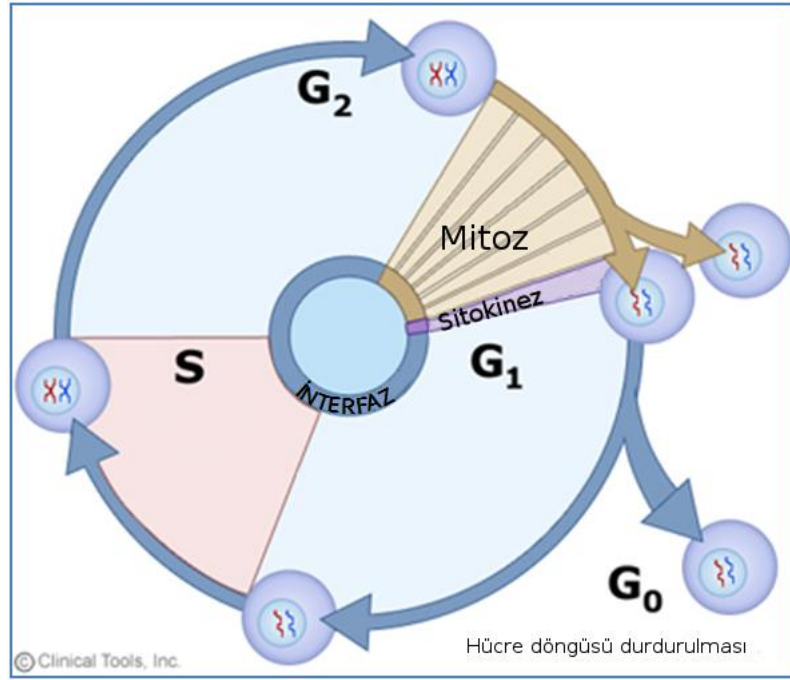
Tiroid bezine metastaz yapabilen sistemik kanserler göğüs, böbrek, bronkogenik karsinom ve malign melanomu içermektedir (21). Bu tür kanserlerde hastalığın seyri birincil tümöre bağlı olarak değişmektedir (21).

2.3 Hücre döngüsü ve kanser oluşumu

Hücrenin içeriğinin iki katına çıkarılması ve neticede bölünmesi işlemi, sırası belli bir dizi olayın sonucu olarak gerçekleşmektedir (32). Bu süreçlerin tümüne hücre döngüsü denmektedir (32). Hücre döngüsü dinamikleri organizmalar arası değişkenlik göstermekle beraber hepsinde temel hedef genetik bilginin bir sonraki nesle aktarılmasıdır (32). Bu işlemin sorunsuz gerçekleşmesini kontrol eden sisteme hücre döngüsü kontrol sistemi denmektedir (32). Bu sistem DNA eşlenmesi ve eşlenen kromozomların düzgün olarak iki yavru hücreye geçişini içermektedir. Hücre içi ve dışından gelen sinyaller ile döngü kontrol edilmektedir. Bu mekanizmanın işlevselliğindeki bir bozukluk kansere neden olabilmektedir (32).

Bütün ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü kontrol mekanizmaları benzerlik göstermektedir (32). Hücre döngüsü S ve M evresi olarak belirtilen aşamaların tekrarı şeklinde devam etmektedir (32). Her iki aşama arasında döngüsel olarak değişken bir

süre beklenmektedir (32). M evresi ile S evresi arası döneme G_1 ; S evresi ile M evresi arasındaki döneme ise G_2 denmektedir (Şekil 2.4) (32).



Şekil 2.4. Hücre döngüsünün evreleri. G_1 evresinde kromozomlar haricinde hüresel bileşenler eşlenir. S evresinde 46 kromozomun her biri eşlenir. G_2 evresinde eşlenen kromozomlar hata kontrolüne tabi tutulurlar, gerekli durumlarda onarım gerçekleştirilir (33).

Evreler arası bekleme süreleri hücre içi ve hücre dışı sinyallere göre çok fazla değişkenlik göstermekle beraber, eğer şartlar uygun değil ise genelde hücre G_0 olarak tabir edilen aşamada bekletilmektedir (32). G_0 ile G_1 arası bu bekleme aşaması aynı zamanda R (Restriction) noktası olarak da bilinmektedir (32).

Cdc proteinleri olarak bilinen proteinler bahsedilen hücre döngüsü aşamaları arası geçişleri kontrol etmektedirler (32). Bu proteinlerdeki yapısal ya da işlevsel bir bozukluğun hücre döngüsünü çok ciddi bir şekilde etkilemesi olasıdır (32).

Hücre döngüsü kontrol sisteminin temel bileşenlerinden biri kontrol noktalarıdır (32). Hücre döngüsü kontrol sisteminde cdks (cyclin dependent kinases) adı verilen protein ailesi temel bir role sahiptir (32). Hücre döngüsünün değişik aşamalarında bu proteinlerin seviyeleri artmakta veya azalmaktadır (32). Bu seviye değişiklikleri hücre

içi proteinlerin döngüsel olarak fosforilasyonlarını etkilemekte ve hücre içerisinde DNA eşlenmesi, mitoz ve sitokinez gibi temel olayların başlatılmasını tetiklemektedir (32). Cdk işlevi birçok enzim silsilesi tarafından kontrol edilmektedir (32). Bu enzimlerden en önemlisi siklin proteinleridir (32). Siklin proteinleri CDK proteinleri ile kompleks oluşturduklarında CAK (CDK-activating kinase) ailesine mensup proteinlerin etkisi ile asıl işlevselliğini kazanmaktadırlar (32). Ters yönde yani CDK-siklin kompleksinin etkisiz hale getirilmesinde ise CKI (Cdk inhibitor proteins) proteinleri iş görmektedirler (32).

Hücre bölünmesindeki temel problemlerden biri DNA eşleşmesinin tam doğrulukta, eksiksiz ve yalnızca tek bir kez yapılmasının sağlanmasıdır (32). DNA eşlenmesi kromozomlara yayılmış bir halde olan ORC (origin recognition complex) adı verilen protein kompleksleri ORC-bağlanma bölgelerine bağlanmakta ve başka düzenleyici proteinlerin bu bölgeye bağlanmasına imkân vererek DNA eşlenmesinin temelini oluşturmaktadır (32). ORC kompleksine bağlanan düzenleyici proteinlerden biri cdc6 proteindir (34). Cdc6 proteinlerinin de bağlanmasının ardından eşlenme öncesi kompleksin tamamlanması için MCM (minichromosome maintenance proteins) proteinleri de bağlanmakta ve eşlenme öncesi protein kompleksini (pre-replicative complex) oluşturmaktadır (34). Daha sonra cdc6 ve MCM proteinlerinin defosforilasyonu ile bu işlemin döngüde bir daha gerçekleşmesinin önüne geçilmektedir (32,34).

DNA sentezinin ardından iki kopya genom içeren G2 evresindeki hücre M-cdk'nın tetiklenmesi ile mitoz girer (32). Mitozdan çıkış ise M-cdk'nın işlevsiz hale getirilmesi ile gerçekleşmektedir (32).

DNA eşlenmesinin kusursuz gerçekleştirilmesinin yürütücülerinden biri de DNA hasarı kontrol noktalarıdır (32). Birçok hücre tipinde biri G₁ evresinin sonlarında doğru, diğeri ise mitoz öncesi olmak üzere en az iki DNA hasarı kontrol noktası bulunmaktadır (32). G₁ kontrol noktasında yer alan DNA hasarı kontrol noktası tespit ettiği herhangi bir DNA hasarında normalde oldukça düşük konsantrasyonda ve kararsız olan p53'ün işlevsel hale gelmesini sağlamakta ve artmış p53 protein seviyesi ile p21 proteininin de

içinde bulunduğu birkaç genin sentezi tetiklenmekte; neticede S evresine giriş engellenmektedir (32).

DNA hasarı kontrol noktalarının işlev görmemesi durumunda, her bir hücre döngüsü neticesinde genetik hasar bir sonraki nesle aktarılacak ve zamanla kansere sebebiyet verebilen mutasyonlar ile karşılaşılma ihtimali kuvvetlenecektir (32). Tespit edilen kanser vakalarının neredeyse yarısında p53 mutasyonunun görülmesi bunun en iyi ispatıdır (35).

DNA hasarı aynı zamanda apoptozu da tetikleyebilmektedir (35). Apoptoz, prokaspaz adlı öncüllerden sentezlenen kaspaz ailesine mensup proteinlerin proteolitik silsileleri başlatması ile geri dönüşümsüz olarak gerçekleştirilmektedir (35).

Normal bir hücrenin kanserli hücreye dönüşmesi ve hücre döngüsündeki bütün kontrol noktalarından geçerek bölünmesine devam etmesi hatta ölümsüzleşerek yayılım göstermesi “genetik kararsızlık” olarak tabir edilen durumla yakından ilişkilidir (32,35). Genetik kararsızlık hücrenin her an yeni bir mutasyona uğramaya açık bir halde olması anlamına gelmektedir (32,35). Genetik kararsızlık hem kanser oluşumunda hem de kanserin ilerlemesinde etkilidir (32,35). Genetik kararsızlık oranı aynı dokudan köken alan hücrelerde bile farklılık gösterebilmektedir (32,35).

Genetik kararsızlık sonucu yeni mutasyonlar kazanan hücre belli bir seviyeden sonra çoğalan hücre yaşlanması (replicative cell senescence) aşamasını da atlayarak ölümsüzlük kazanarak artık organizma için ölümcül sonuçlara sebebiyet verebilecek bir noktaya ulaşmış olmaktadır (35). Ölümsüzlük kazanmış bu tür bir klon metastaz yapması durumunda, eğer anjiyogenez de başlamışsa organizma için oldukça kritik bir aşamaya gelinmiş demektir (35).

2.4 Tiroid neoplazilerinin oluşumu ve moleküler temeli

Tiroid tümör oluşumu ile ilgili bilgiler son 10 yılda oldukça artmıştır (36). Onkogenik sinyal yolları ile ilgili elde edilen yeni bilgiler ve tespit edilen yeni genetik

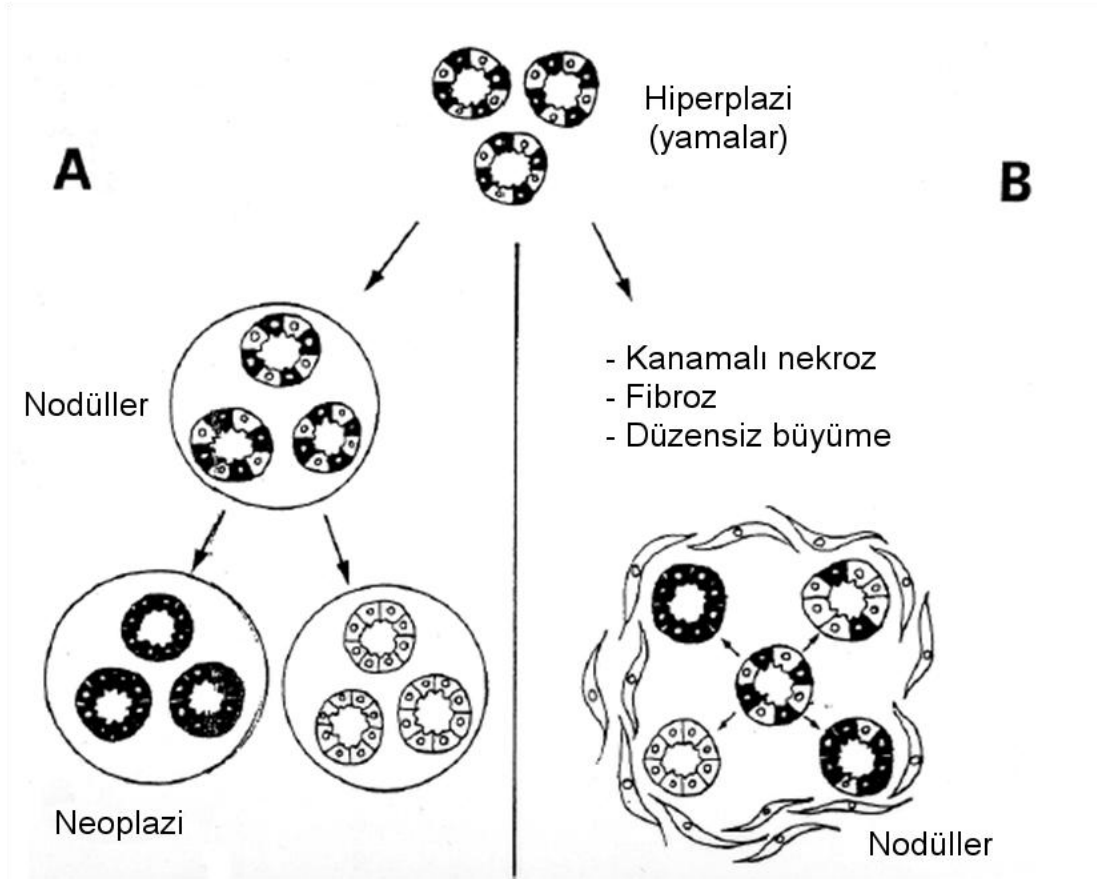
değişiklikler tümör oluşumu ve kötü huylu tümöre dönüşümün anlaşılmasında mesafe kat edilmesine imkân vermiştir (36). Fakat çalışmaların moleküler biyoloji ayağı ile hücre biyolojisi ayağındaki gelişmelerin birbirini tamamlayıcı bir şekilde ilerlemeyişi potansiyel tedavi hedeflerinin tespitini geciktirmektedir (36).

Tekli ve çoklu nodüller tiroid hiperplazisi sonrası meydana gelirken; tekli nodüller alternatif bir şekilde, normal dokudan da oluşabilmektedir (25). Yapılan araştırmalarda bir yetişkinin bütün ömrü boyunca tiroid foliküler hücrelerinin yalnızca 5 kez bölüdüğü belirlenmiştir (25). Bu tür yavaş bir seyre rağmen uygun sinyallere bağlı olarak tiroid hızlıca yayılabilmektedir (25).

İyot eksikliği doğrudan veya dolaylı olarak tiroid bezinin büyümesinde birincil başlatıcıdır (25). Bunun haricinde kompleks yapıda anyonlar ve inorganik atomlar (iyot, lityum, ClO₄⁻, SCN⁻ vb.), tiyonamid bileşikler, anilin türevleri, fenol türevleri, flavonoid türevleri (vitaksin), hepatik ilaç metabolize eden enzimlerin başlatıcıları (pestisitler, DDD ve DDT türevleri, poliklor içeren bifenil türevleri) gibi maddelerin guatr oluşumunu tetiklediği; tiyonamid bileşikler, aminotriazol, asetilaminofluoren (AAF), metilen benzenamin, oksidianilin (ODA), nitrozaminler (DPN, DHPN, BOP), nitrozoüre bileşikleri (NMU, NBU, ENU), streptozosin gibi maddelerin de en azından erkeklerde tiroid karsinomların oluşumunda bir şekilde yer aldıkları gösterilmiştir (25).

Hiperplastik dokunun nodüle dönüşmesi ile ilgili olarak iki hipotez ortaya atılmıştır (25). Birinci hipoteze göre her bir folikül hücresi farklı klon hücrelerden (poliklonal) meydana gelmiştir (37). Fakat nodül oluşumu sırasında foliküller eşzamanlı ve koordineli olarak hareket ettikleri için her bir folikül görünürde benzer heterojeniteye sahiptirler (37). Nodülde bir neoplazi meydana geldiğinde neoplastik folikül monoklonal olarak davranmakta ve sonuç olarak kanser tek bir hücreden meydana gelmektedir (Şekil 2.5A) (25,37). İkinci hipoteze göre ise foliküler hücreler farklı işlevsel özelliklere sahip hücrelerin kaynaşması sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.5B) (38). Nodül oluşumu esnasında yeni foliküllerin kaynaşması tek seferde değil kademeli olarak gerçekleşmekte ve bu şekilde köken alınan hücrenin özellikleri (iyot alımı, kolloid damlacıkları, belli uyarıcılara cevaben tiroid peroksidaz salınımı vb.)

korunmaktadır (38). Bu hipotez aynı salgı bezi içerisinde bile tespit edilebilen farklı anatomik ve işlevsel heterojeniteye (soğuk, sıcak, pseudosistik ve kolloid alanlar) mantıklı bir izah olarak görünmekle beraber, bazı araştırmacılara göre ise bu heterojen özellikler çevresel etmenlere bağlı geri dönüşümlü hücresel değişiklikler kaynaklı da olabilmektedir (25).



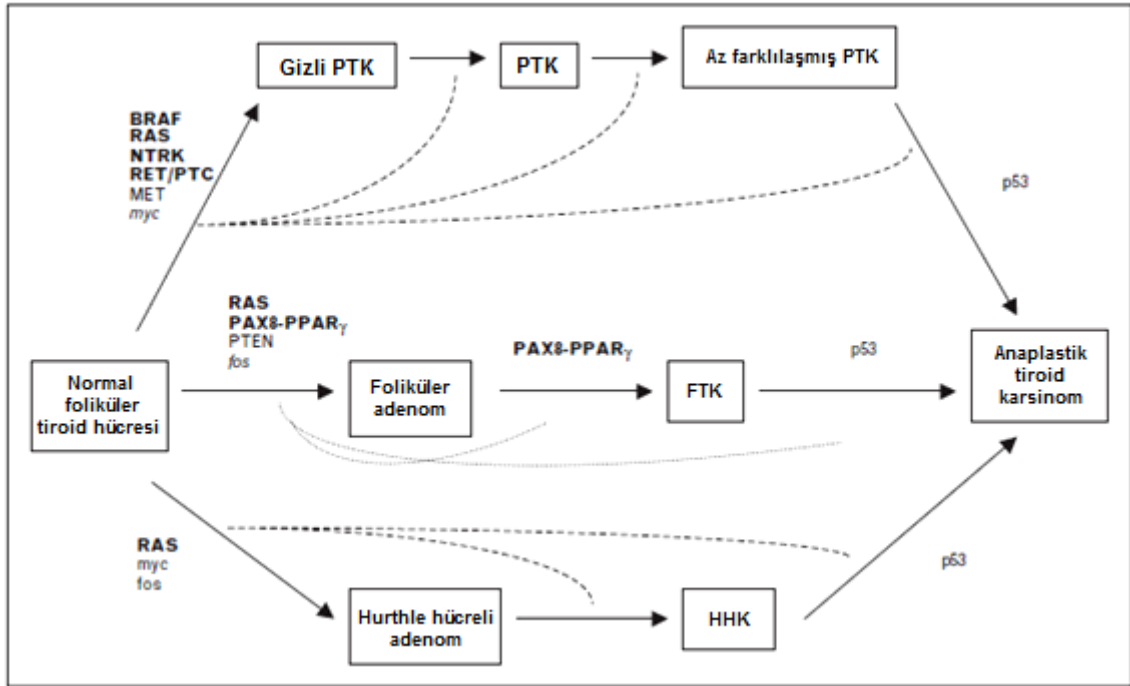
Şekil 2.5. Tiroid nodülünün klonal başlangıcı ile ilgili olarak öne sürülen hipotezler. A) Çok merkezli koordineli eşlenme. Folikül poliklonal olmasına rağmen nodül homojen bir yapı göstermektedir. B) Bir veya birkaç hücrenin kaynaşması sonucu eşlenme. Nodül fibrotik tamir, kanamalı nekroz ve yeni oluşmuş foliküllerin düzensiz büyümesi sonucu oluşmaktadır (25).

Tiroid karsinomlarda da diğer neoplazilerde olduğu gibi kontrolsüz hücre büyümesinin altında yatan neden olarak işlevsellik kazanmış onkogenler gösterilebilir (35). Birçok onkogenin ürünü protein MAPK ve c-AMP bağımlı protein kinaz (PKA) yollarında iş görmektedirler (12,25,35). Hücre zarından sitozolik ve nükleer hedeflere yönelmiş sinyaller çoğalma, farklılaşma, stres cevabı, apoptoz ve hücre döngüsü gibi süreçler ile

ilgilidir. Neticede bu sinyal ağı içerisindeki bir işlev bozukluğu neoplastik dönüşüme neden olabilmektedir (12,25,35).

Bütünü ele alındığında onkogen ve proto-onkogenleri uyaran mutasyonlar tiroid tümör oluşumunda temel bir basamaktır (25,36). Fakat kanser oluşumu için bazı diğer genlerin de sürece dahil olması gerekmektedir (25,36). Örneğin Ret veya Ras mutasyonları ile başlatılmış bir tümör ek bazı mutasyonlar ile ilerleyebilecek ve p53 mutasyonu ile de tekrardan farklılaşabilecektir (25,36). Fakat eldeki bulgulara göre nadir durumlarda aynı tümörde birden fazla farklı mutasyon görülmekte ve neticede bu da bu onkogenlerin birbirinin tamamlayıcısı değil alternatif olduğu düşüncesini akla getirmektedir (25,39).

Foliküler hücreden köken alan tiroid kanserlerdeki belli genetik değişiklikler tiroid kanser oluşumunun moleküler mekanizmaları hakkında bize bilgi vermektedir (Şekil 2.6) (3,12).



Şekil 2.6. Farklı histolojik alt tipleri ile beraber foliküler hücre kökenli kanserlerde görülen mutasyonlar (12).

Erken evre tümör oluşumu Ras, Ret, Trk, Gsp, ve TSH alıcısı proteinlerini içeren 5 farklı sinyal molekülünü kodlayan genlerdeki mutasyonlar ile ilişkili görünmektedir (3). Bu durumda genom koruyucu olarak da bilinen p53 genindeki ek mutasyonlar genomik kararlılığın iyice bozulmasına sebep olacak ve dönüşümü ATK yönüne kaydıracaktır (Şekil 2.6) (3,12).

İyi huylu adenomun karsinoma dönüşmesi için tekrardan farklılaşması dolayısı ile ek mutasyonlara sahip olması gerekmektedir; mevcut bilgilerimize göre birçok karsinomun ilk baştan itibaren bu özellikte olduğu görülmektedir (3).

FTK ve PTK'da görülen RAS ve RET mutasyonlarına genelde ATK'da rastlanılmamaktadır (3). Bu, Çernobil kazasının ardından yapılan çalışmalar ve diğer bilgilerden yola çıkılarak yukarıda bahsedilen kanser oluşum hipotezlerine alternatif olarak kanser kök hücreleri (Cancer stem-cell; CSCs) adında bir hipotez ortaya atılmıştır (3,36,40). Bu hipoteze göre CSC'ler normal tiroid hücreler yerine 3 farklı fetal tiroid hücre kalıntısından (embriyonik kök hücreler, tiroblastlar veya tirositlerden) köken almaktadır (3). Bu hipoteze göre en az farklılaşmış ve en saldırgan tip olan ATK en az bulunan ve en erken evreden köken alan tiroblasttan türeyecek ve rastlanılma sıklığı doğal olarak düşük olacaktır (3).

Ayrıca, yapılan güncel çalışmalarda belli kromozomal bölgelerin tiroid kanser gelişimi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (41,42,43). Bu bölgeler tiroid farklılaşması ile ilgili genleri içerdiği gibi DNA tamir ve gen düzenlenmesine dair genleri de içermektedir (Tablo 2.2) (41,42,43).

Tablo 2.2. Çeşitli gruplar tarafından yapılan güncel çalışmalarda elde edilen verilere göre belli gen bölgelerinin tiroid kanser oluşumu ile ilişkisi tespit edilmiştir. Tablo Kouniavsky ve Zeiger'in çalışmasından alınmıştır (41).

Kromozomal Bölge	İlgili Gen	Genin yer aldığı süreç	Kanser tipi
9q22.33	FOXE1	Tiroid farklılaşması	PTK ve FTK
14q13.3	NKX2-1		
8q24	AK023948	Kodlamaya katılmayan gen	PTK
5q33	Premir-146a	Gen düzenlenmesi	PTK
2q12-14	VDR	D vitamini alıcısı	FTK
19q13.2-13.3	XRCC1	DNA tamiri	PTK ve FTK
19q13.2-13.3	XRCC1	DNA baz çıkarma genleri	PTK ve FTK
1q41-42	ADRPT		
1p12	Bilinmiyor	Bilinmiyor	PTK, FTK ve HHK
	WDR3, SPAG1, GDAP2	Uyarı ileti sistemi	
12q24	P2X7R	Purinerjik alıcı	PTK-F

2.5 Tiroid kanser saldırganlığına yönelik belirteçler

Tiroid kanserinin davranışının tespiti, hastalığı hafif seyreden büyük çoğunluğun ihtiyacından fazla tedaviye maruz kalmaması, hastalığı ağır seyreden azınlığın ise ihtiyacı olan tedaviyi eksik seviyede almaması açısından önem arz etmektedir (14).

Bilinen saldırgan tümör davranışı olarak büyük tümör hacmi, tümörün geniş yayılım göstermesi, uzak mesafelere hacimli metastaz yapması ve tümörün tekrardan farklılaşması gibi patolojik özellikler kabul edilmektedir (14). Ancak bu özelliklerin varlığının tespit edilemediği durumlarda geniş metastaz yapmış hastalarda bile hastalığın seyri ile ilgili öngörü yapmak zorlaşmaktadır (14). Tümör davranışına etki eden genetik ve epigenetik faktörlerin bilinmesi tedavi yaklaşımında yardımcı olacaktır (14). Saldırgan tümör davranışı ile ilgili olarak yapılan çalışmalar aday gen veya sinyal yollarının tespiti ile gen ifadesi analizleri şeklinde gruplanabilir (14).

Fosfotidil inositol 3 OH kinaz (P3IK) sinyal yolağındaki epigenetik düzenlemeler ve mutasyonlara PTK'ya nazaran FTK'da daha fazla rastlanılmaktadır (14,44). Aynı şekilde bunlara az farklılaşmış ve anaplastik karsinomlarda da rastlanılmakta, tümör

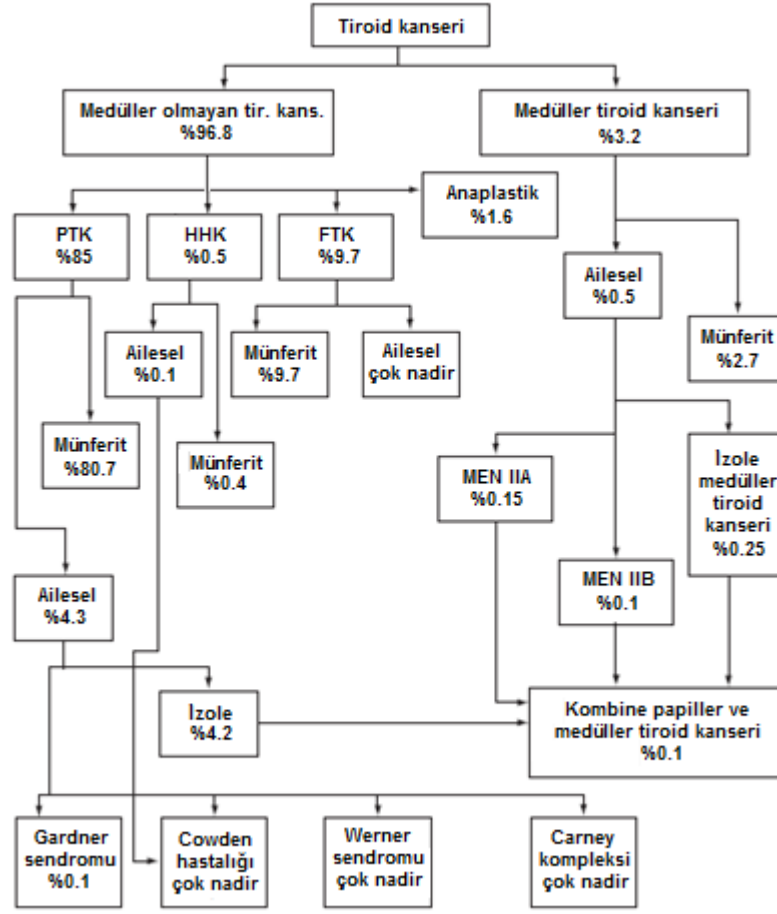
oluşumu ve gelişimi yönünden tümör saldırganlığı ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir (14,44). Tümör yayılımının yüksek olduğu anaplastik karsinomlarda p53 mutasyonlarının sıklıkları da yüksek olmaktadır (39). Ayrıca tümör mikro çevresinin tiroid kanser ilerlemesinde etkili olduğu görünmektedir (14). Birçok katı tümör modeli ile yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre stroma ve mikro çevrenin tümör ilerlemesindeki etkisi büyüktür (14).

Tiroid kanserlerinde c-KIT ve p27 gibi kanser ilerlemesinde önemli proteinlerin düzenlenmesinde miRNA'ların da etkili olduğu gösterilmiştir (14). miRNA'ların tiroid kanser ilerlemesindeki rolleri henüz belirsiz olmakla beraber diğer katı tümörlerde elde edilen bilgilerden yola çıkılarak tiroid kanser davranışı ile ilgili bilgi verebileceği düşünülmektedir (14).

2.6 Ailesel Geçiş özellikleri

PTK, diğer birçok kanser türüne göre daha fazla kalıtsal geçiş göstermektedir (42). Yüzde 5 ile 10 arası bir kısım PTK'nın ailesel geçiş ve çokgenli etkileşim gösterdiği bilinmektedir (41). Ailede 3 kişiden fazla bireyde tiroid kanseri görülüyor ise %99.9 ihtimal ile hastalığın ailesel özelliği olduğu belirtilmiştir (31). Ailesel geçiş gösteren tiroid kanserleri parafoliküler hücrelerden köken alan MTK'lar ile foliküler hücrelerden köken alan medüller olmayan (NMTK) karsinomlardır (31).

Foliküler hücre kökenli kanserlerdeki ailesel geçiş gösterme oranı %5 iken bu oran parafoliküler hücre kökenli kanserlerde %25-35 arasındadır (Şekil 2.7) (21,31).



Şekil 2.7. Farklı tiroid kanserlerinin ailesel geçişleri ve sebebiyet verdikleri diğer hastalıklar (31).

PTK ve HHK’larda özellikle genç hastalarda tedaviye cevap oldukça iyi iken ailesel geçiş gösteren hastalarda görülen tablo, hastalığın nüksmesi veya uzak bölgelere metastaz yapması gibi durumlar ile daha ağır olmaktadır (31).

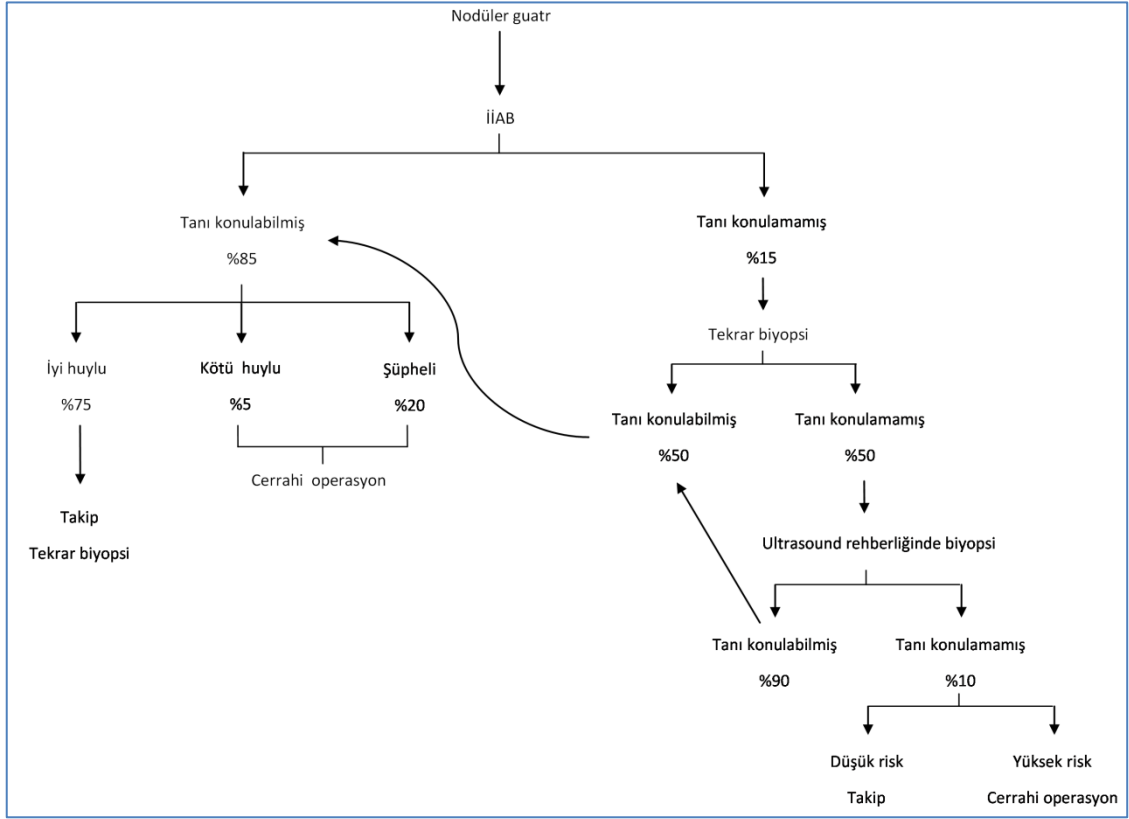
MTK-A’dan farklı olarak; medüller olmayan ailesel tiroid karsinomların (NMTK-A) bu kanserlerin somatik mutasyonlar ile gelişen türü olan NMTK’dan ayrımının yapılması bu tür kanserlerin oldukça nadir olmaları, çoğu tümörün histolojik olarak aynı olması ve çoğu ilişkili genin bilinmemesi gibi nedenlerle oldukça zordur (31). NMTK-A hastalarının çoğunda iyi huylu nodül oluşumu daha sık görülmekte ve akla bu nodüllerden tümör oluştuğu/dönüştüğü fikrini getirmektedir (31).

Ailesel olmayan tiroid kanserlerinde tespit edilen RET/PTC, TRK, RAS, C-MET gibi proteinleri kodlayan genlerinin NMTK-A'da etkili olmadığı görülmektedir (31). Kromozom 6 monozomisi veya kromozom 11'in kısa kolunun kaybı gibi kromozom bozuklukları NMTK-A'da görülmektedir (31).

2.7 İnce iğne aspirasyon biyopsisi

İİAB tiroid nodülleri ile kötü huylu tiroid neoplazilerinin ayrımında kullanılan en iyi tanısal yöntemdir (20). Yaklaşık 30 yıl öncesinden günümüze dek tanı amaçlı tiroidektomilerin sayısının azaltılmasında ve cerrahi operasyon gereken hastalara uygulanan operasyon sayısının artırılmasında oldukça etkili bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (12). İİAB papiller, medüller ve anaplastik tiroid kanserlerin ayrımında %95'in üzerinde doğruluk ile ayırım yapabilmektedir; fakat FA ile karsinom veya Hurthle hücreli adenom ile karsinom arasında ayırım İİAB ile yapılamamaktadır (12). Ayrıca, PTK-F'nin İİAB ile sitolojik olarak tespiti oldukça zordur (12).

Yapılan İİAB testlerinin sonucunda tiroid nodüllerinin yaklaşık %80'e kadarki kısmı iyi huylu, %7'ye kadarki kısmı kötü huylu ve %20'ye kadarki kısmı belirsiz olarak bulunmaktadır (10,12). Ayrıca, İİAB sonuçlarının değerlendirilmesinde %10'a kadar hata payı ile kişiden kişiye değişkenlikler de bildirilmiştir (10,12). Bu hata payı ile beraber düşünüldüğünde İİAB'den elde edilen belirsiz sonuç oranı yaklaşık %30'u bulmaktadır (Şekil 2.8) (12).



Şekil 2.8. Nodüler guatrın İİAB temelli tanısı. Takip eden süreçler sitolojik sonuçlara göre değerlendirilmektedir. Gösterilen yüzde oranları sonuçların tatmin oranlarını göstermektedir (20). Tabloya göre %5 oranında kötü huylu, %20 oranında şüpheli ve %10 oranında tanı konulamayan kısım için cerrahi operasyon önerilmektedir.

Kişiden kişiye değişen %10'luk farklılıklar dahil edilmediğinde %20'ye kadar varabilen oranlarda belirsiz sonuç vermesi İİAB'nin zayıf yönlerinin başında gelmektedir (20). İİAB'nin bazı durumlarda belirsiz sonuç vermesi hem iyi huylu hem de kötü huylu neoplazilere has sitolojik özelliklerin üst üste binmesinden kaynaklanmaktadır (12). Şüpheli İİAB sonuçları ise genellikle fokal nükleer atipi ve yeterli miktarda foliküler epitel sağlanamaması nedeni ile yeterli miktarda örnek alınmamasından kaynaklanmaktadır (12). Fokal nükleer atipi durumunda kısmen ve dağınık nükleer genişleme, nükleer boşluklar veya çekirdek içi inklüzyonlar gözlemlendiğinden PTK'dan şüphelenilmekte fakat emin olunamamaktadır (12). Hem İİAB'nin tanıda bazı sınırlamaları bulunduğuundan, hem de %10'a kadar varabilen oranlarda sitolojik analizde kişiden kişiye farklı sonuçlar elde edilebildiğinden, iyi ve kötü huylu neoplazileri birbirinden ayırt etmede ek yöntemlere ihtiyaç olduğu ortadadır (12).

2.8 Tiroid kanser tanısında genetik belirteçler

PTK'da genellikle Mitogen activated protein kinase (MAPK) sinyal yolağını harekete geçiren genetik değişimlere rastlanılmaktadır (12,25,39). Bunlar RET/PTC yeniden düzenlenmeleri ile RAS ve BRAF genlerindeki nokta mutasyonlarıdır (12,25). Bunlardan herhangi birine PTK örneklerinin %70'inden fazlasında rastlanılmakta fakat nadiren birden fazlası aynı tümörde görülmektedir (12,25). İkinci en sık görülen tiroid kanser tipi olan FTK'da ise RAS mutasyonları ve PAX8-PPAR γ ; MK'da ise RET nokta mutasyonları sıkça görülmektedir. (Tablo 2.3) (39).

Tablo 2.3. Tiroid kanserlerinde tümör tipine göre rastlanan mutasyonların sıklıkları. Tablo Fagin ve Mitsiades'in çalışmasından alınmıştır (39).

Tümör Tipi	Görülme Sıklığı
Papiller Karsinom	
BRAF	45%
RET/PTC	20%
RAS	10%
TRK	<5%
Foliküler karsinom	
RAS	45%
PAX8-PPARγ	35%
PIK3CA	<10%
PTEN	<10%
Medüller karsinom	
Ailesel tip RET	95%
münferit RET	50%
Az farklılaşmış karsinom	
RAS	35%
β-catenin (CTNNB1)	20%
TP53	20%
BRAF	15%
Anaplastik karsinom	
TP53	70%
β-catenin (CTNNB1)	65%
RAS	55%
BRAF	20%

Güncel bilgilere göre tiroid tümör ayırımında 70'in üzerinde moleküler belirteç/panel değişik gruplar tarafından denenmiş, toplamda 400 civarında gen ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (45). Bazıları yalnızca bilimsel çalışmalardan kaynaklanan bu aday belirteçlerin hiçbirisi klinik anlamda uygulamaya geçememiştir (Tablo 2.4) (45).

Tablo 2.4. Çeşitli araştırmacılar tarafından tiroid tümörlerinde moleküler ayırım yapılması amacı ile çalışılan aday belirteç/panel/yöntemler (45).

Endothelial growth factor	Telomerase
MDM2	Galektin 1 ve 3
RAβ	Fibronectin
RXRα	Lactoferrin
	PAX8/peroxisome-proliferator-activated receptor fusion
Mcm-2	Protein kinase C
S100A9	LEU 7, LEU M1
Ciclins D1,E,p27,p21	RAS
GLUT-1	Protein p53
Lamin	Protein p63
Citokeratin	Protein S-100
Muc 1	Epidermal growth factor receptor
Estrogen receptor	Caveolin
C-erb	14-3-3 σ
E-caderine	Somatostatin receptor
MET	Growth factor receptor of fibroblasts
DAP	Ca-19
Ki-67	β-Catenin
Group 1 of high mobility	Oncoprotein C-erbB
HBME-1	Oncoprotein HER-2 (C-erbB-2)
FHL1	Oncoprotein KIT
DIO1	Bcl-2
CITED1	TRK
CA12	Dipeptidyl aminopeptidase IV
FN1	PCNA
ECM1	C-myc
TMPRSS4	Gen RET/PTC
EpCAM	CD97
Ciclooxigenase-2	CD44V
Ets-1	CD34
IGF-II	CD19
Gen panelleri	CD57(LEU 7)
DNA ploidiileri	Transforming growth factor β
Mikrodizin	Epidermal growth factor
Proteomik analizler	

Somatik mutasyonlara dayalı genetik belirteçlerin yanlış sonuç verme oranları, gen ya da protein ifadesine dayalı belirteçlere göre çok daha düşüktür (12). Bunlardan BRAF en çok çalışılmış genetik belirteçtir (12).

2.8.1 BRAF

RAF proteini MAP kinaz sinyal yolağı içerisinde yer alan ve ARAF, BRAF, ve CRAF şeklinde üç alttipi bulunan bir serin-treonin kinazdır (12). BRAF kinazları büyüme ve farklılaşma sinyallerine cevaben iş görmekteirler (12). Tiroid foliküler hücrelerde daha çok BRAF bulunmaktadır (12). Bütün RAF izoformları MAP kinaz yolağında MEK'i aktive ederler ancak içlerinde BRAF daha etkilidir (10).

PTK' da en çok çalışılmış mutasyon BRAFT1799A (BRAFFV600E) mutasyonudur (12). Bu mutasyonda 1799 nolu nükleotidin A/T dönüşümü 600 nolu amino asitte valin amino asidinden glutamat amino asidine dönüşüme neden olarak (V600E) proteinin işlevselliğini etkilemektedir (10).

BRAF mutasyonu %35 ile %69 arası bir oranla PTK' da en sık rastlanan mutasyondur (10,12). Bu mutasyon PTK-K ve PTK'nın uzun hücreli (PTK-TC) alt tipine özeldir, diğer farklılaşmış tiroid kanserlerinde nadiren görülmektedir (10). PTK-K'da %51 oranında, PTK-F'de %24 oranında ve foliküler tiroid kanserlerde %1 oranında olduğu gösterilmiştir (12). BRAF mutasyonu erken evrede gerçekleşmekte ve PTK'nın patogenezinde önem arz etmektedir (10,12). BRAFT1799A mutasyonunun tanı yaşıının ileri olması, PTK-TC histolojisi, tiroid harici yayılım, lenf düğümü metastazı, hastalığın nüksetmesi ve ile tümör evresi gibi durumlarla birleştiği durumlarda klinik olarak daha kötü bir prognoz ile seyrettiğine dair bulgular bulunmaktadır (10,12).

BRAF mutasyonu olup olmadığının cerrahi operasyon öncesi bilinmesi özellikle kötü huylu tümörlerin cerrahi operasyonu açısından faydalı olacaktır çünkü sitolojik analiz sonucuna göre belirsiz olduğu düşünölen lezyonlar BRAF sınıflandırmasına göre kötü huylu çıkmaktadır (10). İİAB örneği ile yapılan BRAF mutasyon testlerinin büyük çoğunluğunun dokudan yapılan BRAF testleri ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (10). Bazı istisnalar haricinde sitolojik analiz sonucuna göre belirsiz olduğu düşünölen lezyonların %5 ile %43 arasındaki kısmı BRAF mutasyon analizi ile açıklığa kavuşturulmuştur (10).

BRAF, PTK tanısında son derece önemli bir belirteçtir (10). Cerrahi operasyon öncesi kullanılması oldukça yararlıdır, ayrıca İİAB örneklerine uygulandığında seçiciliği de yüksektir (10). Ancak büyük orandaki belirsiz foliküler lezyonun iyi ya da kötü huylu olduğunun açıklığa kavuşturulmasında kullanılamaması nedeni ile yaygın olarak kullanılmamaktadır (10).

2.8.2 RET/PTC

MAP kinaz yolağı ile ilişkili olarak tiroid kanserlerinde görülen diğer bir düzensizlik RET/PTC yeniden düzenlenmesidir (12). RET glial türevi nörotropik faktör gen ailesi reseptörlerinin sinyalci alt ünitesidir (12). Tiroid C hücrelerinde normalde ifade edilse de, foliküler hücrelerde yüksek seviyelerde ifade edilmemektedir (12). Yeniden düzenlemede RET proteinin 3' ucu ilişkili olmayan bir genin 5' ucu ile kaynaşmaktadır (12). Bugüne kadar tanımlanmış en az 15 adet RET/PTC yeniden düzenlenmesi bulunmaktadır; bunlardan en çok rastlanan ikisi RET/PTC1 ve RET/PTC3'dür (8,12,39). Oluşan RET/PTC onkogeni yapısal olarak MAP kinaz yolağını etkinleştirmektedir (8,12,39).

RET/PTC onkogeni PTK'ların yaklaşık %20'sinde görülmekte ve diğer kanserlerde genellikle görülmemektedir (10). RET/PTC1 ve RET/PTC3 onkogeni yeniden düzenlenmesi olan farelerde PTK geliştiği gösterilmiştir (10). Yeniden düzenlenme erken evrede olmakta, tipik PTK histolojisi göstermekte ve lenf düğümü metastazı için yüksek risk kaynağı olmaktadır (10).

Çernobil faciası sonrası PTK gelişen çocukların %16'sında RET/PTC1, %58'inde ise RET/PTC3 olduğu tespit edilmiştir (10). Sonradan gelişen ailesel olmayan olgularda ise PTK olan çocuklarda RET/PTC1'in %47 oranında, RET/PTC3'ün ise %18 oranında geliştiği görülmüştür (10). İkinci Dünya Savaşı sonrası atom bombası radyasyonuna maruz kalanlarda RET/PTC yeniden düzenlemelerinin maruz kalmayanlara göre oldukça fazla olduğu da bildirilmiştir (10,46). Mizuno ve ark. (46) insan tiroid dokusu transfer edilmiş farelerde 50 Gy değerindeki radyasyonun etkisi ile PTK oluşumunun 2 gün gibi kısa bir sürede gerçekleştiğini göstermişlerdir.

BRAF mutasyonlarında olduğu gibi, RET/PTC yeniden düzenlenmeleri de İİAB testine yardımcı olarak keşfedilmiştir (10). RET/PTC testinin bazı belirsiz lezyonların sınıflandırılmasında etkili olduğu gösterilmesine rağmen tanıda oldukça az etkisi olmaktadır (10).

2.8.3 PAX8-PPAR γ

PAX8-PPAR γ onkogeni PAX8 ve PPAR γ genlerinin kromozom içi translokasyonu t(2,3)(q13;p25) sonucu oluşmaktadır (10). İlk başlarda PAX8-PPAR γ onkogeninin foliküler tiroid karsinoma (FTK) özel olduğu düşünülse de sonradan foliküler adenomlarda da tespit edilmiştir (10). FTK' da %29-%56 arası, foliküler adenomlarda %4-%13 arası bir oranda görülen onkogen; PTK, ATK'da, guatr, HH adenomlarda, HHK'da ve az farklılaşmış tiroid kanserlerde görülmemektedir (10).

PAX8-PPAR γ onkogeni ile ilişkili prognostik faktörler hastalığın kadınlarda daha sık görülmesi, ileri seviye tümör farklılaşması ve düşük metastaz riski olarak bahsedilebilir (10). PAX8-PPAR γ onkogeninin mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir (10). PAX8-PPAR γ 'nın RAS mutasyonlarından farklı bir yolak üzerinden etki ettiği düşünülmektedir (10). PAX8-PPAR γ füzyon onkoproteininin yabancı tip PPAR γ proteininin işlevine engel olduğu in vitro olarak gösterilmiştir (10). Yabancı tip PPAR γ PAX8-PPAR γ yeniden düzenlenmesi olan tümörlerde daha fazla ifade edilmektedir (10). Şahin ve ark. (47) immünohistokimyasal analizde PAX8-PPAR γ yerine PPAR γ kullanılması önermiş, neticede hassasiyetin arttığı fakat seçiciliğin azaldığı görülmüştür.

2.9 İmmunohistokimyasal belirteçler

Cytokeratin 19 (CK19), human mesothelial cell 1 (HBME1), Ki-67, PCNA, galektin-3 ve siklik adenozin monofosfat cevap elemanına bağlanan protein/p300-interacting 1 (CITED1) başta olmak üzere çeşitli immunohistokimyasal belirteçler iyi ve kötü huylu tümörlerin ayırımında çeşitli gruplar tarafından denenmiş, farklı oranlarda hassasiyet ve seçicilik tespit edilmiştir (10,34,48).

2.9.1 Galektin-3

Galektinler b-galaktositlere bağlanma ve amino asit benzeşim dizileri nedeni ile hayvansal lektin ailesindedir (10). Galektinler birçok çeşit glikoprotein ve glikolipidlere bağlanma özelliğine sahiptirler (10). Bu lektinler sitoplazmada ve hücrelerarası etkileşimler nedeni ile hücre yüzeyinde ve hücreler arası boşlukta görev yaparlar (10). Bazı üyeleri apoptozu tetiklerken Galektin-3 gibi bazı üyeleri ise hücrede kötü huylu fenotipe neden olurlar (10). Galektinler, hücre bağlanması ve hücre göçü gibi davranışları düzenleyerek hücrelerin metastatik özelliklerini etkilerler (10).

Galektin-3'ün PTK'nın patogeneğinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (10). Galektin ifadesi hem dokuda hem de İİAB örneğinde gösterilmiş olduğundan tanısal bir belirteç olarak kullanım imkanı doğmuştur (10). Serum seviyelerinin kötü huylu tümör ayırımında kullanılma potansiyeli ise tartışmalıdır (10). Fakat İİAB örneğinde %75 ile %100 arası hem hassasiyet hem de seçicilik oranları bildirilmiştir (10). Bugüne kadarki yapılmış en geniş kapsamlı olan bir çalışmada Bartolazzi ve ark. (49) 465 İİAB örneğinde %78 hassasiyet ve %93 seçicilik tespit etmişlerdir. Bu çalışmada %22 oranında kanserli lezyon Galektin-3 testinde tespit edilememiştir (49).

Her ne kadar tiroid karsinomlarda tek başına kullanılabilir bir belirteç olmasa da Galektin-3'ün sitolojik bulgulara destek olarak kullanılabilme potansiyeli yüksektir (10).

2.9.2 HBME-1

Hector Battifora mesothelial cell antibody (HBME-1) aslında kötü huylu mezoteliomların boyanması için geliştirilmiş bir fare monoklonal antikordur (10). Yapılan çalışmalarda foliküler kökenli tiroid kanserlerinin, kısmen de PTK'nın iyi huylu lezyonlara kıyasla bu antikor kullanılarak daha çok boyandığı görülmüştür (10).

Daha sonra yapılan çalışmalarda antikorun İİAB örneklerindeki hücreleri de boyadığı görülmüştür (10). Van Hoeven ve ark. (50) HBME-1'in %100 hassasiyetle ve %76 seçicilikle kötü huylu tiroid lezyonlarını ayırabilmişlerdir. Daha çok sayıda örneğin kullanıldığı çalışmalarda hassasiyet %15 civarı düşmüş, seçicilik ise %60-%90 civarında tespit edilmiştir (10). Her ne kadar ümit verici olsa da HBME-1 tiroid kanserlerinin tanısında tek başına kullanılabilecek bir belirteç değildir (10). HBME-1'in panel şeklinde diğer belirteçlerle beraber kullanımına yönelik çalışmalar devam etmektedir (10).

2.9.3 hTERT ve Telomerase

DNA polimerazlar bütün bir kromozomun eşlenmesi işlemini gerçekleştiremezler (51). Kromozom üzerindeki işlevsel birimlerin tamamının eşlenmesinin güvence altına alınması amacıyla kromozomların uçlarında anlamsız TTAGGG diziliminin birçok kez tekrar ettiği telomer bölgeleri bulunmaktadır (51). Her bir DNA eşlenmesi döngüsünde kromozomların uç kısımlarında yer alan telomerler kısalmaktadır (51). Bir riboneükleoprotein olan telomerase enzimi telomerleri uzatarak DNA eşlenmesi işleminin kusursuz yapılmasında görev alır (51). Eğer telomerase işlev görmez ise kromozomlar işlevlerini yitirmeye ve yaşlanma sürecine girmektedirler (10). Telomerase eşliğinde hücre ölümsüz olmaktadır (10). Kök hücreler, lenfositler ve germline (tohum) hücreleri haricinde sağlıklı somatik hücrelerde telomerase bulunmamaktadır (10). Birçok tümörde telomerase aktivitesi ciddi oranda artış göstermektedir (10).

Tiroid dokularda yapılan telomerase işlevi çalışmalarında iyi huylu lezyonlara kıyasla kötü huylu tümörlerde birçok grup yüksek telomerase aktivitesi tespit etmişlerdir (10).

Ancak telomeraz aktivitesinin artmış olması ileri seviye kansere, PTK-TC'ye, farklılaşmamış kanserlere, tiroid dışı yayılıma, nüksetmeye, uzak mesafe metastaza ve yaşlılığa işaret etmektedir (10).

Telomeraz enziminin katalitik alt ünitesi hTERT'tir (52). Yapılan çalışmalarda telomeraz gibi hTERT aktivitesinde de artış bulunmuştur (10).

Tiroid neoplazilerinde telomeraz aktivitesi ilgili yapılan çalışmalarda bir şekilde artmış bulunan telomeraz aktivitesi aynı zamanda foliküler adenomlar ve tiroiditis gibi iyi huylu nodüllerin neredeyse tamamında da artmış olarak bulunmuştur (10). Bu sonuç hTERT ve telomerazın tanısal potansiyelini engellemektedir (10). Hem dokuda hem de İİAB örneğinde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler tartışmalıdır (10).

2.9.4 İmmüno sitokimyasal paneller

Tespit edilen belirteçlerin başka belirteçlerle beraber bir panel şeklinde kullanıldıklarında tanısal hassasiyet oranları artmaktadır (10). Örneğin, Wiseman ve ark. (53) HBME-1, Cytokeratin (CK-19), Galektin-3 ve ek 4 belirteç daha kullanarak %87.9 hassasiyet ve %94 seçicilik ile kanser tespiti yapmışlardır. Rossi ve ark. (54) çalışmalarında HBME-1 ve Galektin-3 kullanarak %95 hassasiyet ve %100 seçicilik ile bu ayrımı yapmışlardır. İİAB örneklerinde de benzer oranlar görülmektedir (54). Saggiorato ve ark. (55) İİAB örnekleri kullanarak %97 oranında hassasiyet %91 oranında seçicilik yakalamışlardır. Scognamiglio ve ark. (56) HBME-1 ve CK-19 kullanarak %83 oranında hassasiyet ve %100 seçicilik oranları elde etmişken Nga ve ark. (57) ise İİAB düşük sayıda örneğinde aynı belirteçleri kullanarak %100 hassasiyet ve %100 seçicilik oranlarını yakalayabilmişlerdir.

2.10 Tiroid kanser tanısında mikro RNA

Lee ve ark. (58) tarafından 1993 yılında keşfedilen mikro RNA'lar (miRNA) kodlamaya katılmayan 19 ile 25 baz çifti (bç) uzunluğunda kısa RNA dizileridir. miRNA'lar transkripsiyon sonrası gen ifadesini negatif yönde düzenlerler. Sanger

Enstitüsü'nün hazırladığı veritabanında (<http://www.mirbase.org>) hâlihazırda insana özgü 1356 adet farklı miRNA bulunmaktadır (59).

Lemfomalar, kolorektal karsinom, göğüs kanseri, akciğer kanseri, karaciğer kanseri ve tiroid kanserinde miRNA ifadesinin değiştiği gösterilmiştir (10). miRNA moleküllerinin metastaz, hücre yayılımı, hücre döngüsü ve apoptoz ile ilgili olduğu yönünde veriler her geçen gün artmakta; dolayısıyla kanser tanısı, prognozu ve tedavisi alanındaki araştırmaların bir kısmı bu alanda artarak devam etmektedir (10,14).

Tiroid kanserinde c-KIT ve p27 gibi kanser ilerlemesinde önemli proteinleri düzenlenmesinde miRNA'ların etkili olduğu gösterilmiştir (14). Daha önceki çalışmalarda miR-221, mir-222 ve miR-146b'nin gen ifadesinin PTK' da arttığı gösterilmiştir. Weber ve ark. (60) miR-197 ve miR-346'nın foliküler tiroid kanserlerinde foliküler adenomlara kıyasla fazla ifade edildiğini göstermişlerdir. Visone ve ark. (61) anaplastik tiroid kanserlerde miR-30d, miR125b, miR-26a ve miR-30a-5p'nin ifadesinin düştüğünü göstermişlerdir (10).

miRNA gen ifadesinin tiroid kanserlerde değiştiği bulgularından hareketle araştırmacılar İİAB örneklerinde bu bulguları test etmişlerdir (10). Chen ve ark. (62) RT-PCR yöntemi ile miR-221, miR-222 ve miR-146b'nin İİAB örneklerinde ve dokudaki gen ifadesine bakmış ve üç tür miRNA'nın da kötü huylu tümörlerde arttığını, bu artışlardan ikisinin (miR-222 ve miR-146b) istatistikî olarak anlamlı olduğunu göstermişlerdir.

Nispeten az sayıda miRNA molekülünün oldukça fazla sayıda ve çeşitli genin ifadesini etkileme potansiyeli bulunduğundan tanısal açıdan miRNA'lar yüksek potansiyele sahiptirler (10). Örneğin, kronik lenfositik lösemide belli bir miRNA izi ile hastalığın doğasının ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (17,63).

mRNA'ya kıyasla miRNA'lar daha kısa yapıda oldukları için daha korunaklı olarak formalin ile fikse edilmiş parafine gömülü dokuda bulunmaktadırlar (17). Bu anlamda miRNA'ların tanısal potansiyelleri de oldukça yüksektir (17).

2.11 Mikrodizin analizleri

Mikrodizin teknolojisinin ortaya çıkması 1990'lı yılların başlarına dayanmasına rağmen özellikle teknolojinin ilerlemesi ile beraber özellikle onbinlerce genin aynı anda ifade analizine imkan tanınması sebebi ile yaklaşık son 10 yıllık dönem içerisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (12,15). Gen ifade profili ile klinik veriler arasında ilişki kurmaya, değişik tümör tiplerinin sınıflandırılması ve tanımlanmasına, kanser oluşumunda rol alan genlerin veya gen ailelerinin tanımlanmasına imkân tanınması mikrodizin teknolojisini kanser araştırmalarında cazip kılmaktadır (12).

Papiller tiroid karsinomlar üzerine ilk mikrodizin çalışması ise 2001 yılında Huang ve ark. (64) tarafından 12000 ayrı gen ürününü tarayabilen Affymetrix U95A çipi kullanılarak yapılmıştır (15). 2001 yılından bu yana geçen süre içerisinde mikrodizin teknolojisinin gelişimine paralel olarak araştırma imkânlarının da artması ile beraber, papiller tiroid karsinomlar üzerine birçok araştırmacı mikrodizin temelli çalışma tasarlamıştır (15). Bu çalışmalar neticesinde sınıflandırma ölçütü, hasta grubu, veri analiz metoduna bağlı olarak 47 ile 627 arasında değişen sayıda genin iyi huylu nodüller ile kötü huylu tümörler arasında en farklı seviyelerde ifade edildiği bulunmuştur (12,13,65,66,67).

Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda, doku örneği kullanılarak yapılan mikrodizin analizlerinde iyi ve kötü huylu lezyonların ayrımı %87 ile %93 arasında değişen oranlarda bir hassasiyet ile gerçekleştirilebilmiştir (12,13,65,66,68). Bu çalışmalarda seçicilik oranı ise %87.1 ile %100 arasında değişmektedir (12,13,65,66,68).

Doku örneği kullanılarak yapılan mikrodizin analizlerindeki ümit verici sonuçlar İİAB örneği kullanılarak yapılan mikrodizin analizleri için geçerli değildir (12). İİAB örneğinden elde edilen RNA miktarının az olması mikrodizin analizinin bu örneklere uygulanmasını güçleştirmektedir (12). Ayrıca, mikrodizin çalışmaları yapan araştırmacıların aşmaları gereken iki temel problem daha bulunmaktadır. Birincisi, elde edilen yalancı negatif bulguların elenmesi problemidir (12). Bazı araştırmacılara göre mikrodizin analizinde %30'a kadar varabilen yanlış bulgu olabilmektedir (12). Bu

nedenle elde edilen verilerin RT-PCR ya da Western Blot gibi yöntemlerle ile doğrulanması gerekmektedir (12). İkinci problem ise biyoinformatik kıyaslamalar alanında karşılaşılan “çoklu kıyaslama problemi” (15). Onbinler ile ifade edilen sayılardaki değişkenin aynı anda nispi olarak çok sayıda örnek arasında güvenilir bir şekilde kıyaslanması temel biyoinformatik problemlerinden biridir (15).

Tiroid kanserlerin moleküler ayırımında kullanılmak üzere geliştirilen gen panelleri büyük ölçüde mikrodizin verilerinin katkıda bulunduğu bir yeniliktir. Özellikle McMillan ve Klebew grubunun çalışmaları bu alanda dikkat çekmektedir (10,69). Bu grubun çalışmaları neticesinde hücre döngüsü düzenleyici genlerden MCM5, MCM7 ve RAD9 genlerinin kötü huylu tümörleri %98.2 hassasiyet ve %65.7 seçicilikle ayırdığı gösterilmiştir (69). Bu grup 31 adet İİAB örneğinde ECM1, Tmprss4, Angpt2 ve Timp1 genleri ile %91 hassasiyet ve %95 seçicilikle ayırım gerçekleştirmiştir (70).

3 GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Grupların oluşturulması ve doku örneklerinin temini

Çalışmamızda Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne 2005-2009 yılları arasında doğrudan başvuran hastalara ait doku örnekleri ile konsültasyon sebebi ile değişik kliniklerden üniversitemiz Tıp Fakültesi Patoloji bölümüne gönderilen formalin ile fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) arşiv doku örnekleri kullanılmıştır.

Geriye yönelik olarak 5 yıllık dönemi kapsayan arşiv çalışmasında mikro karsinomlar veya birden fazla tip doku türü içeren örnekler çalışmaya dahil edilmemiştir. Buna göre elde edilen örnek sayısı 19 adet nodül içeren doku örneği ve alt tipleri ile beraber toplam 28 PTK (14 adet PTK-F ve 14 adet PTK-K) şeklindedir. Fakat deneysel çalışmalar sonucu yeterli seviyede ve kalitede mRNA elde edilemeyen 4 adet nodül ve 1 adet PTK-K örneği çalışmadan çıkarılmıştır.

Buna göre, toplam sayısı 42 olan çalışılan histopatolojik olarak tanısı kesinleşmiş doku örneklerin dağılımı 15 olguda iyi huylu nodüler tiroid dokusu örneği, 14 adet papiller tiroid karsinomun foliküler alt tipi ve 13 olguda papiller tiroid karsinomun klasik alt tipi şeklindedir.

Bu tez çalışması, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu'nun 19/02/2009 tarihli toplantısında alınan 02-2009/44 nolu kararına göre etik açıdan uygun bulunmuştur.

Doku örneklerinin alındığı olguların yaş ortalaması 45 (± 16) olup; bunlardan 34 tanesi kadın, 8 tanesi ise erkek olgulara aittir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Doku örneklerinin elde edildiği bireylere ait yaş, cinsiyet ve doku tiplerini belirten tablo.

Nodül			PTK-F			PTK-K		
Birey No	Yaş	Cinsiyet	Birey No	Yaş	Cinsiyet	Birey No	Yaş	Cinsiyet
1	56	K	21	21	K	41	80	K
2	16	K	22	28	K	43	53	E
4	42	K	23	45	K	44	77	K
5	52	K	24	50	K	45	36	E
6	52	K	25	73	K	46	38	K
8	45	K	26	47	K	47	44	K
9	55	K	27	61	K	48	33	E
11	33	K	28	52	K	49	63	E
12	35	K	29	46	K	50	35	K
13	32	K	30	24	K	51	51	E
14	68	K	31	29	K	52	40	K
15	49	K	32	27	K	53	81	K
16	49	E	33	28	K	54	34	K
18	46	E	34	23	K			
19	41	E						

Herbir arşiv örneğinden 5 µm.lik kesitler alındıktan sonra bunlar steril bir lam üzerine alınmış ve RNA bütünlüğünün bozulmaması için mRNA eldesine kadar geçen süre içerisinde -20°C’de saklanmıştır. İyi huylu nodül örneklerinde kesit alma işleminden sonra herhangi bir işlem uygulanmamakla beraber tümör örnekleri lam üzerine alındıktan sonra tümör içermeyen bölgeler veya eritrosit oranı yüksek bölgeler bisturi ile ayrılarak farklı tip dokuların birbiri ile karışmasının önüne geçilmiştir.

3.2. Kullanılan çözeltiler

10X TBE (108 g Tris, 55 g borik asit, 8,3g EDTA), gümüş nitrat çözeltisi (2 g gümüş nitrat, 2,5 ml %37’lik formaldehit, 2 litre saf su), sodyum karbonat çözeltisi (60 g sodyum karbonat, 420 ml 10 mg/ml sodyum tiyosülfat, 2 lt saf su), jel bağlama çözeltisi (3 µL gamma-metakriloksipropil-trimetoksi silane, 5 µL asetik asit, 1000 µL %96’lık

etil alkol), jel yükleme tamponu (0,025 g bromfenol mavisi, 0,025 g ksilen siyanol, 10 ml saf su).

3.3. Örneklerden RNA eldesi

Kesiti daha önce alınıp arşivlenen doku örneklerinden RNA eldesi için Roche firmasının FFPE dokulara özel 04 823 125 001 katalog numaralı “High Pure FFPE RNA Micro Kit” isimli kitin 2008 Aralık sürümü kullanılmıştır.

Daha önce steril lam üzerine alınan doku kesitleri ksilen içeren şalelere alınarak 70°C’de 30 dak. boyunca dokunun parafinden arındırılması için bekletilmiştir. Ardından ksilen dökülerek şaleye mutlak etanol eklenmiş ve 10 dk. süre ile beklenip aynı işlem tekrar edilmiştir.

İkinci alkol banyosundan sonra her bir lam üzerindeki parafinden arındırılmış doku kesiti steril bir bistüri ile kazınarak 1.5 ml.lik tepkime tüpüne alınmış ve 10 dk. boyunca ağzı açık bir şekilde kurumaya bırakılmıştır.

Herbir tüpteki örneğe 60 µl doku parçalama çözeltisi (tissue lysis buffer) ve 10µl %20’lik SDS eklenmiştir. Bu karışım üçer kez 4 sn. vortekslendikten sonra; kısa bir santrifüjle çöktürme (spin-down) yapılmış ve üzerlerine 30 µl daha önce hazırlanan Proteinaz K alışma çözeltisi (proteinase K working solution) eklendi. Karışım tekrardan üçer kez 4’er saniye vortekslendikten ve kısa bir santrifüjle çöktürmenin ardından 55°C’de 3 saat boyunca bekletilmiştir.

Bu srenin ardından 200 µl bağlama çözeltisi (binding buffer) ve 200 µl mutlak etanol eklenerek üçer kez 4’er sn. vorteks yapılmıştır. Toplama tüpünün üzerine konan filtreli tüpe (high pure filtre tube) tp içeriği filtreli pipetaj ile eklenmiş ve 30 sn. boyunca 8000 g.’de santrifüj yapılmıştır. Daha sonra filtrenin kuruması için en yüksek hızda 1 dak. boyunca santrifüj yapılmıştır.

DNA içeriğinin uzaklaştırılması için hazırlanan DNAaz çözeltisinden örnek başına 30 µl eklenerek (3 µl DNAaz inkübasyon tamponu + 27 µl DNAaz) 15 dak. boyunca inkübasyon için beklenmiştir.

İnkübasyonun ardından 300 µl 1. yıkama çözeltisi (wash buffer) üstteki filtreye eklenmiş ve 15 s. 8000 g.'de santrifüj işleminin ardından altta biriken sıvı dökülmüştür. Bu işlemin aynısı 2. yıkama çözeltisi için de tekrar edilmiştir. Son olarak 2. yıkama çözeltisinden 200 µl eklenmiş ve işlem son kez tekrar edilmiştir.

Yeni bir toplama tüpünün üzerine alınan filtrelili tüp 2 dak. boyunca en yüksek hızda santrifüj yapılmıştır. Filtrelili tüp tekrardan yeni bir tepkime tüpü üzerine alınmış ve 20 µl çözücü tampon (elution buffer) eklenmiştir. Bir dakika beklendikten sonra 8000 g.'de 1 dak. boyunca santrifüj yapıldıktan sonra altta biriken sıvı bir kez daha üst kısma eklenmiş ve son işlem bir kez daha tekrar edilmiştir.

Artık RNA içeren tepkime tüpleri hiç bekletilmeden -80°C derin dondurucuya alınmış, ölçüm yapılınca kadar da burada bekletilmiştir.

3.4. RNA konsantrasyonlarının hesaplanması

RNA eldesinin ardından örnekler spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve RNA kalitesi ve elde edilen miktarlar tespit edilmiştir. Ölçüm sonucu elde edilen veriler cDNA sentezinde başlangıç mRNA oranının tespitinde kullanılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. RNA ölçüm değerleri.

Birey No	Konsantrasyon (ng/ul)	A260	A280	260/280	260/230
1	251.86	6.297	3.221	1.95	0.71
2	101.39	2.535	1.29	1.97	1.14
4	16.94	0.424	0.351	1.21	0.07
5	89.39	2.235	1.152	1.94	0.36
6	34.56	0.864	0.457	1.89	1.4
8	12.36	0.309	0.197	1.57	0.21
9	50.91	1.273	0.649	1.96	1.42
11	62.39	1.56	0.849	1.84	0.63
12	65.13	1.628	1.071	1.52	0.67
13	39.51	0.988	0.828	1.19	0.33
14	81.38	2.035	1.192	1.71	1.36
15	35.86	0.896	0.554	1.62	0.21
16	31.52	0.788	0.424	1.86	0.44
18	28.13	0.703	0.357	1.97	0.67
19	91.09	2.277	1.209	1.88	0.68
21	77.31	1.933	1.027	1.88	0.42
22	41.63	1.041	0.78	1.33	0.31
23	30.75	0.769	0.702	1.09	0.09
24	100.83	2.521	1.618	1.56	1.04
25	29.66	0.741	0.476	1.56	0.39
26	115.68	2.892	1.939	1.49	1.01
27	128.06	3.201	2.326	1.38	0.67
28	41.81	1.045	0.597	1.75	0.81
29	211.87	5.297	4.006	1.32	0.4
30	247.58	6.19	2.709	2.28	0.69
31	112.03	2.801	1.611	1.74	1.35
32	17.98	0.45	0.25	1.8	0.18
33	32.21	0.805	0.437	1.84	0.22
34	19.1	0.477	0.316	1.51	0.28
41	19.09	0.477	0.378	1.26	0.05
43	174.7	4.368	2.769	1.58	0.75
44	13.65	0.341	0.149	2.28	0.28
45	127.38	3.184	1.974	1.61	1.03
46	176.98	4.425	2.337	1.89	1.02
47	60.58	1.515	0.808	1.88	0.57
48	93.9	2.348	1.183	1.98	1.07
49	23.97	0.599	0.304	1.97	0.6
50	30.69	0.767	0.396	1.94	0.7
51	77.94	1.948	1.412	1.38	0.57
52	137.9	3.447	1.736	1.99	0.63
53	97.62	2.441	1.279	1.91	0.44
54	156.13	3.903	1.998	1.95	0.53

Ölçüm sonuçlarına göre 18 adet örnek 0-50 ng/µl aralığında, 4 adet örnek 50-70 ng/µl aralığında, 7 adet örnek 70-100 ng/µl aralığında, 10 adet örnek 100-200 ng/µl aralığında ve 3 adet örnek ise 200 ng/µl'nin üzeri bir konsantrasyonda idi.

3.5. RNA örneklerinden tek sarmal cDNA yapılması

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA eldesinde Roche firmasının 11483188001 katalog numaralı “1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)” isimli kitinin Mayıs 2009 sürümü ile TAKARA firmasının RR019 katalog numaralı “TaKaRa RNA PCR Kit (AMV)” isimli kitinin 3.0 sürümünde yer alan kimyasallardan faydalanıldı. Kullanılan her iki kitin içeriğinden de faydalanılarak enzim ve kimyasallar üretici firmaların önerdiğinden farklı oranlarda kullanılmıştır. Bu yolla üretici firmaların her bir kit için önerdiği kullanım sayısının yaklaşık 3 katına çıkmış ve malzmeden tasarruf edilmiştir. Her iki kitin içeriğinin benzer olmasına karşın enzim ve kimyasal derişimleri farklı idi. Derişimleri birbirine eşitlemek için ayarlamalar yapılmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Takara ve Roche marka kitler kullanılarak cDNA eldesinde kullanılan kimyasal oranları.

20 µl toplam hacim için kullanılan miktarlar (µl)		
Kit üreticisi firma	Roche	Takara
RNAaz içermeyen distile su	Değişken *	Değişken *
Mg (25mM)	4	4
10X RT Buffer	2	2
dNTP (10mM)	2	2
RNAaz inhibitörü	0.4	0.5
AMV RT enzimi **	0.2	1
Oligo dT primer ***	1	1
RNA	Tablo 3.4'e göre eklenmiştir.	Tablo 3.4'e göre eklenmiştir.

* Bütün karışım içeriği eklendikten sonra toplam hacim 20µl'ye tamamlanmıştır

** Roche kitinde yer alan RT enzimi en az 25 u/µl, Takara kitinde ise en az 5 u/µl konsantrasyondadır.

*** Roche kiti içerisinde yer alan oligodT primer 40 katı sulandırılarak, Takara kitindeki primer konsantrasyonu olan 2.5pmol/µl konsantrasyona erişildikten sonra kullanılmıştır.

Tepkimeye girecek olan RNA miktarının standart olmasını sağlamak amacı ile bütün örnekler Tablo 3.4’de gösterildiği şekli ile hazırlanmıştır. Burada deneysel olarak karşılaşılan problem bütün örnekler için tepkime derişiminin hassas bir şekilde ayarlamasının sağlanması idi. Ancak FFPE dokudan elde edildikleri ve 5 yıl içerisinde yayılmış olarak farklı zaman dilimlerine ait oldukları için örneklerden elde edilen RNA konsantrasyonları 12.36 ng/μl ile 251.86 ng/μl arasında değişen miktarlarda idi. Bu ayarlamalar esnasında elde edilen RNA’dan cDNA yapılması esnasında 3.5 μl ile 9 μl arasında değişen oranlarda ana karışıma eklenmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. cDNA eldesi için kullanılan ana karışıma eklenen RNA miktarları.

Ölçüm sonucu elde edilen RNA konsantrasyonu	0-50 ng/μl	50-70 ng/μl	70-100 ng/μl	100-200 ng/μl	200 ng/μl ve üstü
cDNA eldesi için kullanılan karışıma eklenen miktar	9 μl	7 μl	6 μl	4 μl	3,5 μl

Karışımları hazırlanan örnekler PCR cihazında tabloda gösterildiği şekli ile RT-PCR tepkimesine sokulmuştur (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. RT-PCR tepkime koşulları

Sıcaklık	Süre
44°C	30 dak
95°C	5 dak
5°C	5 dak

Elde edilen tek sarmal cDNA örnekleri dondurma çözme işleminin tek sarmal DNA üzerine bozucu etkisinin önüne geçilmesi amacı ile tüplere 1.25 μl miktarında dağıtılmış ve bu şekilde -20 °C’de saklanmıştır.

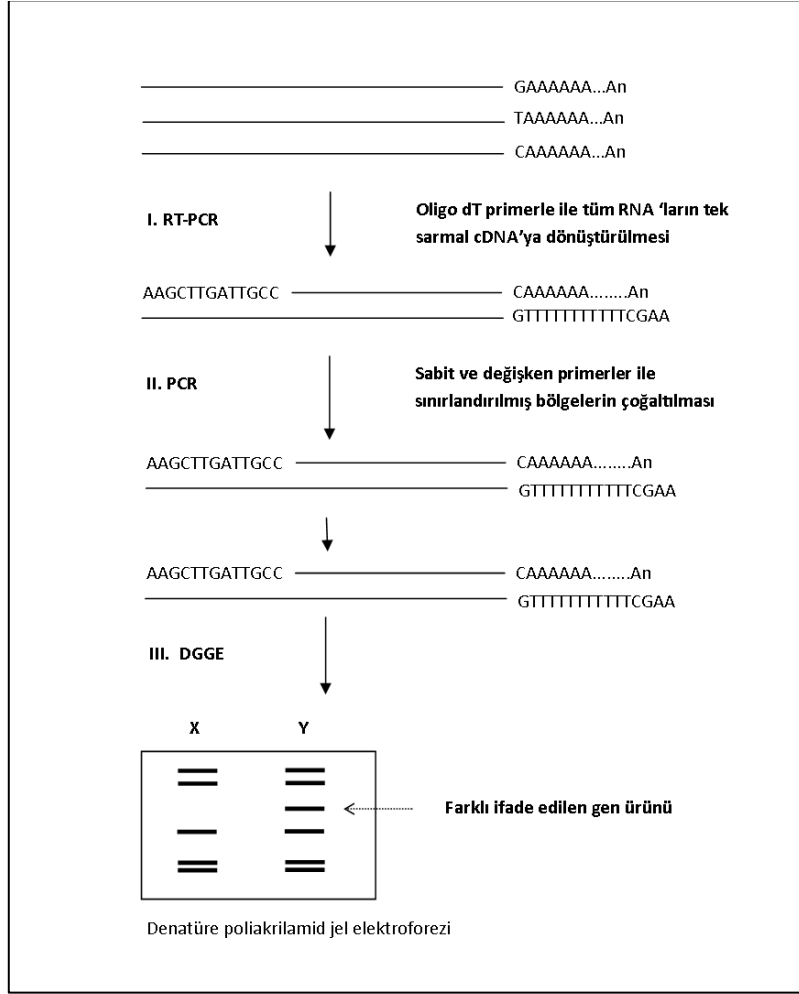
3.6. Differential Display-PCR yöntemi

Differential Display-PCR (DD-PCR) yöntemi nispeten eski ve uygulanması çok kolay olmayan bir yöntem olmasına rağmen; bilinmeyen dizilimler ile çalışılmasına imkân

tanınması nedeniyle avantaj sağlamaktadır. RAS, v-REL, ERBB onkogen hedef genleri gibi birçok gen DD-PCR yöntemi ile keşfedilmiştir (71).

DD-PCR ilk olarak Liang ve Pardee tarafından herhangi bir doku veya hücredeki mRNA'lardan türetilmiş tek sarmal cDNA'ların çoğaltılması ve kıyaslamalı olarak taranmasını içeren bir metot olarak 1992 yılında ortaya konmuştur (72). Uygulanmaya başladığı ilk günden bu yana çok zaman geçmiş olmasına rağmen, bazı ufak değişikliklerle beraber işlevselliğini halen muhafaza etmektedir (73). Çip teknolojilerinden farklı olarak bu yöntemle çalışılan bölgelerin ihtiyaç duyulduğunda tekrar çoğaltılabilme, klonlanma ve dizin analizi yapılabilme imkânı vardır (73).

Metot, iki farklı tür (5' ucu değişken ve 3' ucu sabit) sentetik oligonükleotit dizileri (primer) kullanılarak bu oligonükleotitler ile uyumlu cDNA dizilimlerinin seçimli olarak çoğaltılmasına imkan vermektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. DD- PCR yönteminin tek bazla bağlanan tipinin şematik gösterimi (74). Çalışmamızda yalnızca orjinal yöntemde kullanılan primer dizilimlerine uyulmuştur. RT-PCR tepkimesinde oligo dT primer kullanılmış; bağlanma sıcaklık ve süreleri tamamen değiştirilmiştir.

DD-PCR yönteminde kullanılan oligonükleotitler çalışma tasarımına göre değişkenlik göstermektedir. Yöntemin ortaya atıldığı ilk yıllarda 3' ucuna bağlanan sabit primerlerden iki bazı değişken primerler kullanılırken zamanla tek baz ile bağlanan primerler tercih edilmeye başlanmıştır (74). İki baz değişken primer kullanıldığında primer sayısı 12 iken tek baz değişken primer kullanıldığında bu sayının 3'e düşmektedir. Çalışmamızda tek baz değişkenli primer setleri tercih edilmiştir (74).

Liang ve ark.'nın kullandığı (75) primer setlerinden seçilen primerlerden 5' ucu primeri kısmi olarak değişken bir diziyi, 3' primeri ise çoklu A dizisine bağlı 1 adet farklı nükleotiti içermektedir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Bu çalışmada kullanılan primer dizimleri. 5' ve 3' primerler ortak "AAGCTT" dizisini içermektedirler. 3' primerlerde yalnızca 3' ucundaki nükleotit değişkenlik göstermektedir.

Primer tipi	Primer Adı	Primer dizilimi
3' (sabit) primer	polyG	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3'
3' (sabit) primer	polyC	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3'
3' (sabit) primer	polyA	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3'
5' (değişken) primer	Arb1	5'-AAGCTTCGACTGT-3'
5' (değişken) primer	Arb2	5'-AAGCTTGCACCAT-3'
5' (değişken) primer	Arb3	5'-AAGCTTAGAGGCA-3'
5' (değişken) primer	Arb4	5'-AAGCTTTCATATG-3'
5' (değişken) primer	Arb5	5'-AAGCTTGATTGCC-3'

Çalışmamızda 5 adet kısmi değişken primer; 3 adet de sabit primer kullanılmıştır. Bu primerlerden sabit ve değişken primer gruplarının kendi içlerinde kombinasyonları ile 15 ayrı primer seti elde edilmiş ve gen ifadesi değişimleri için bu primer setleri kullanılmıştır (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Primer kombinasyonlarının eldesi. Üst satır ve soldaki sütunların birbiri ile kombinasyonları sonucu 15 set primer elde edilmiştir.

Primerler →	Arb1	Arb2	Arb3	Arb4	Arb5
↓					
polyG	Arb1-polyG	Arb2-polyG	Arb3-polyG	Arb4-polyG	Arb5-polyG
polyC	Arb1-polyC	Arb2-polyC	Arb3-polyC	Arb4-polyC	Arb5-polyC
polyA	Arb1-polyA	Arb2-polyA	Arb3-polyA	Arb4-polyA	Arb5-polyA

Kullanılan 5' ve 3' ucu primerlerinde ortak olan "AAGCTT" dizilimi haricinde 5' primerlerinde 7 nükleotitlik kısım değişkendir. Matematiksel olarak bakıldığında 7 adet değişken nükleotit ile 16384 adet farklı primer elde edilmesi mümkündür. Fakat pratik kullanımda bu kadar farklı primer çeşidine gerek yoktur. G-C ya da A-T sayısının en fazla 5, en az 2 olduğu kombinasyon sayısı 11408 iken bu sayının çok daha azı ile transkriptomu taramak teorik olarak mümkündür çünkü DD-PCR primerleri dizilime tam olarak oturmadan da çoğaltma yapabilmektedirler (Tablo 3.8) (75).

Tablo 3.8. Liang ve ark. (75) yaptıkları çalışmalarda DD-PCR primerlerinin dizilimi tam olarak karşılansalar da çoğaltma yapabildiklerini göstermişlerdir. Toplam 13 nükleotit uzunluğundaki primer dizisi kullanılarak 5 nükleotide kadar farkla bile çoğaltma yapılabilmesi mümkündür.

Klonlanan cDNA	Değişken primer dizilimi *	Dizilimi karşılamayan nükleotit sayısı (bç)
SP100	AAgCTtGCACCAT	2
Mob-1	AAgcttCGACTGT	4
Pai-2	aagCttGCACCAT	5
Mob-5	AagctTGATTGCC	4
Osteopontin	aagctTAGAGGCA	5
Mob-40	aagcTTTCATATG	4
TK	aagCTTGATTGCC	3
Dizilimi karşılamayan nükleotit sayıları	4574430000000	4

* Dizilimi karşılanmayan nükleotitler küçük harfle gösterilmiştir.

Yapılan hesaplarda 80 adet primer kullanılarak transkriptomun neredeyse tamamının taranması teorik olarak mümkündür (Tablo 3.9) (75).

Tablo 3.9. Değişken primer sayısına bağlı olarak transkriptomun ne kadarının kapsanabileceğine yönelik istatistiksel hesaplama. Teorik olarak 80 adet değişken primer ile transkriptomun %96'sındaki gen ifade farklılığının gösterilebileceği hesaplanmıştır (75).

Değişken primer sayısı	Tepkime sayısı	Tespit edilebilme olasılığı ($P=1-(0.96)^n$)
20	60	%56
30	90	%71
40	120	%80
80	240	%96

3.6.1 İkinci sarmal cDNA eldesi

Daha önce mRNA'lardan RT-PCR ile tek sarmal cDNA'ya dönüşümü sağlanan ve tüplere dağıtılan örnekler belirtildiği şekli ile ikinci sarmal oluşturulması ve bu örneklerin çoğaltılması için toplam hacim 12.5 µl olacak şekilde PCR tepkimesine sokulmuşlardır (Tablo 3.10).

Tablo 3.10. Toplam hacmi 12.5 µl olacak şekilde PCR bileşenlerine ait iyileştirilmiş derişimler.

Kimyasal	Miktar (µl)
Su	4.41
10X Buffer	1.25
MgCl ₂ (25mM)	1.33
dNTP (2mM)	1.13
5' primer (10mM)	1.5
3' primer (10mM)	1.5
Taq DNA polimeraz (5u/µl)	0.13
cDNA	1.25

En uygun tepkime sıcaklığının tespiti için yapılan gradient PCR neticesinde en uygun bağlanma sıcaklığının 36°C olduğu görülmüştür (Tablo 3.11).

Tablo 3.11. İkinci sarmal cDNA eldesine ait PCR tepkime koşulları.

Tepkime sıcaklığı	Tepkime Süresi	Tekrar sayısı	Tepkime tipi
94°C	2 dak	1 kez	İlk denatürasyon
94°C	30 sn		Denatürasyon
36°C	2 d. 15 s.	39 Döngü	Bağlanma
72°C	30 s.		Uzama
72°C	5 d.	∞	Son uzama

3.6.2 Örneklerin poliakrilamid jelde yürütülmesi

3.6.2.1 Camların hazırlanması

U şekilli ve dikdörtgen şekilli her iki cam da ilk önce %70'lik ardından da %96'lık etil alkol ile iyice temizlendikten sonra jelin yapışması istenen düz cama 2000 µL jel bağlama çözeltisi (3 µL gamma-metakriloksipropil-trimetoksi silane, 5 µL asetik asit, 1000 µL %96'lık etil alkol) hav bırakmayan peçete ile dikkatlice yayılmıştır. U şekilli cama yüzeyin kayganlaştırılması için 500 µL sigmacote hav bırakmayan peçete ile yayılmıştır. Yanlara aralık çubukları, üste ve alta da ters olarak birer köpek dişli tarak yerleştirildikten sonra camlar birbiri üzerine kapatılıp mandalla birbirine tutturulmuştur.

3.6.2.2 Poliakrilamid jelin hazırlanması

Denatüre jel karışımı 250 ml'lik beher içerisine %7'lik derişimde akrilamid:bisakrilamid oranı 27:1 olacak şekilde %45'lik stok çözeltisi kullanılarak hazırlanmış ve iyice çözünmesi sağlanmıştır (Tablo 3.12) (76).

Tablo 3.12. Stok akrilamid çözeltisi hazırlanışı.

Kimyasal	Eklenen miktar
Akrilamid	434 g
N,N'-metilenbisakrilamid	16 g
Su	600 ml

Örneklerin jelde yürütülmesi için kullanılan akrilamid jel karışımı bu stok çözeltisi kullanılarak son hacmi %7 olacak şekilde hazırlanmıştır (Tablo 3.13).

Tablo 3.13. Yüzde 7 konsantrasyonda akrilamid jel için eklenen kimyasal oranları.

Kimyasal	Eklenen miktar
Stok akrilamid (%45)	15.51 ml
10X TBE Tamponu	10 ml
Üre	42 g
Su	100 ml'ye tamamlandı

Manyetik karıştırıcı üzerine alınan karışımın iyice çözünmesi sağlandıktan sonra taze hazırlanmış 450 µl %10 APS ve 45 µl TEMED eklenmiştir. Yaklaşık 10 saniye süre ile beklendikten sonra karışım beher yardımıyla yavaşça ve hava kabarcığı bırakmamaya özen göstererek iki cam arasına dökülmüş ve köpek balığı dişli tarak ters olarak jelin üst kısmına yerleştirilmiştir. Jelin donması için en az 45 dakika beklenmiştir.

3.6.2.3 Örneklerin hazırlanması

0,2 ml lik tüplere 5 µl'si PCR ürünü ve 5 µl si jel yükleme tamponu (0,025 g bromfenol mavisi, 0,025 g ksilen siyanol, 10 ml saf su) olmak üzere 10 µl toplam hacimde hazırlanan örnekler 95°C'de 5 dakika denatürasyonun hemen ardından buz üzerine alınmıştır.

3.6.2.4 Örneklerin jele yüklenmesi ve elektroforez işlemi

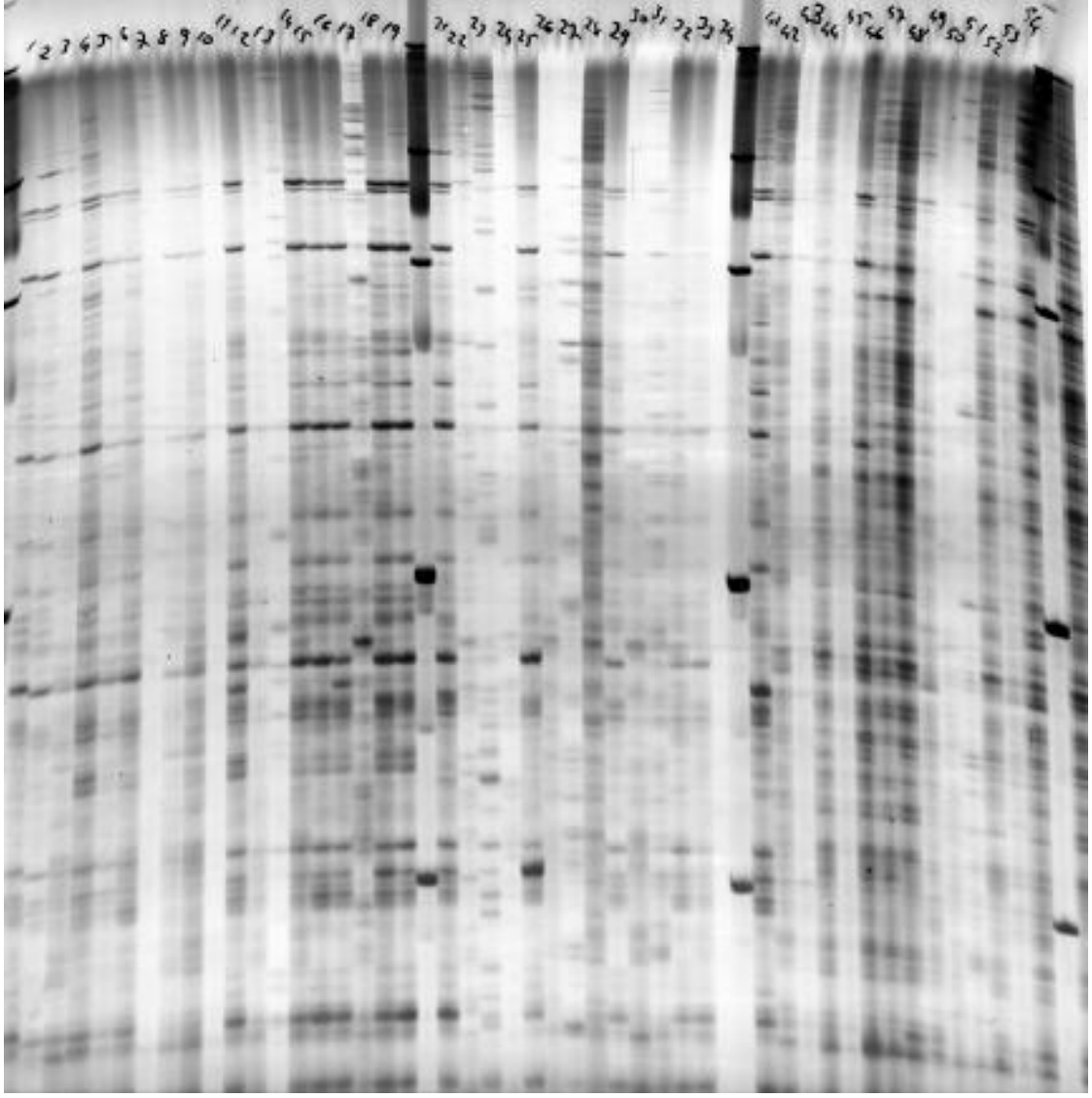
Örneklerin denatüre edilmesinden 30 dak. kadar önce 70 W'da ön yürütme yapılmıştır. Ön yürütmenin ardından denatüre edilen ve buz üzerine alınan örnekler her bir grup doku örneği bir arada bulunacak şekilde ve aralarına moleküler belirleyici (Sigma, 36–943 bç, katalog no: D6683) konarak jele 5µl hacimde yüklenmiş ve 43 W'de 3 saat boyunca hazırlanan üreli poliakrilamid jelde tek sarmal olarak yürütülmüşlerdir.

3.6.2.5 Örneklerin gümüş boyama ile görüntülenmesi

Yürütmenin ardından tanktan alınan camlar birbirinden ayrılmıştır. Üzerinde jel olan düz cam, çalkalayıcı üzerinde %10'luk 2 litre asetik asit içinde 10 dakika bekletildi. Ardından, 10 dakika 2 litre saf su içinde bekletilmiştir. Gümüş nitrat çözeltisi içerisinde 45 dakika bekletildikten sonra soğuk sodyum karbonat çözeltisi içine alınmıştır. Bantların görünmesiyle zemin kararmadan hemen önce tekrar %10'luk asetik asit çözeltisine alınarak bantların sabitlenmesi sağlanmıştır. Beş dakika bekletildikten sonra tekrar saf suya alınarak ortamdan fazla asetik asitin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bunun ardından cam kurumaya bırakılmıştır. Kurumanın ardından, jelin görüntüsü tarayıcı kullanılarak 600 dpi çözünürlükte bilgisayara aktarılmıştır.

3.7. Farklı ifade edilen genlerin tespiti

Farklı ifade edilen genlerin tespiti ilk aşamada göz ile yapılmıştır (Resim 3.1-3.2). Nodüle kıyasla PTK-F ve PTK-K gruplarından farklı gen ifadesi gösteren bölgeler seçilmiş, bu aday bölgeler birbiri ile karışmaması için kullanılan primerler baz alınarak sistematik bir isimlendirmeye tabi tutulmuşlardır.

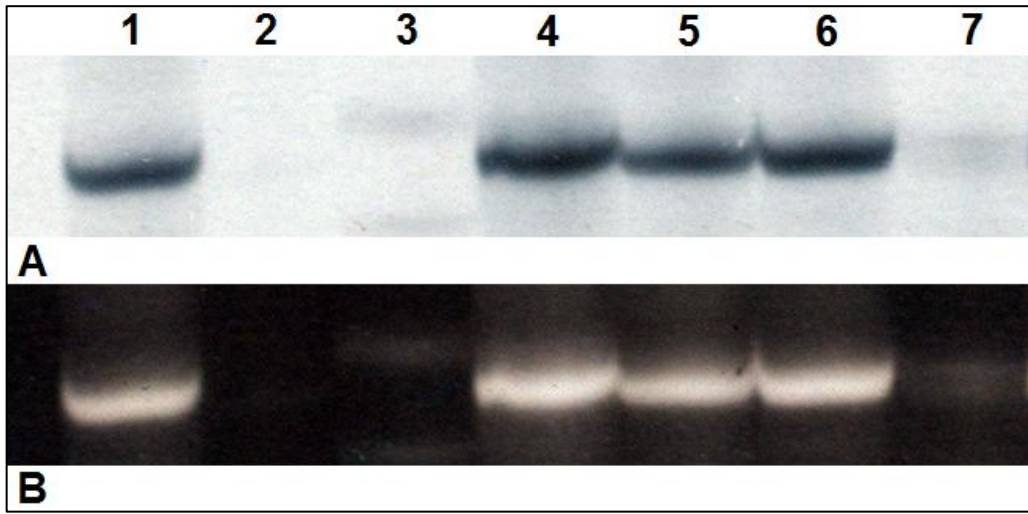


Resim 3.1. DD-PCR jel görüntüsü. Gümüş boyama yöntemi ile elde edilen jel görüntüsünün tarayıcı ile bilgisayara aktarıldığında elde edilen hali görülmektedir.

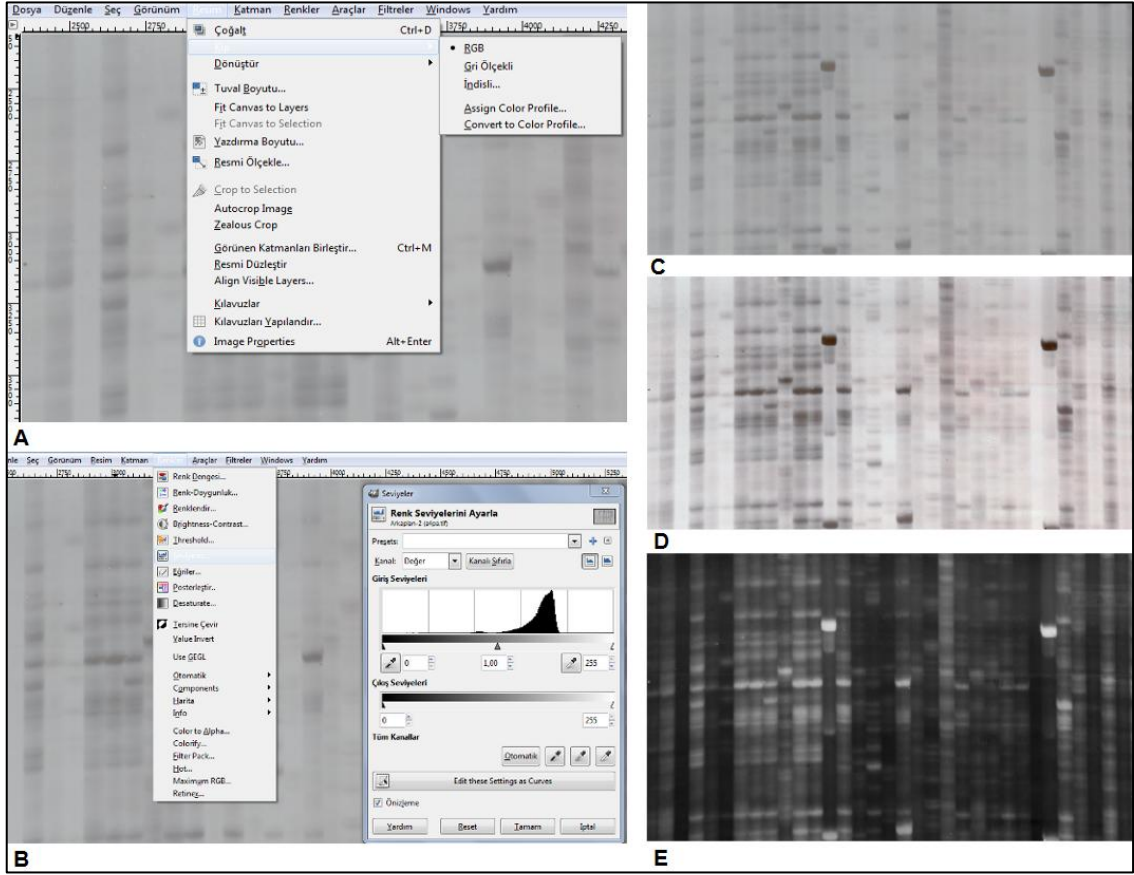
Dijital ortama aktarılmış jel görüntüleri üzerinden densitometrik analiz yapabilme özelliğine sahip ticari programlar var olduğu halde; aynı işlemi ücretsiz programlar aracılığı ile de gerçekleştirmek mümkündür (77). Aslında Western Blot jelleri için daha çok uygulanmakta olan bir yöntem bu çalışmaya uyarlanmıştır. Aday bölgelerin densitometrik analizleri dijital ortama aktarılan jel görüntüleri üzerinden ImageJ (v1.42q, NIH) programı yardımı ile yapılmış, neticede her bir örneğin gen ifadesi kıyaslanabilir sayısal değerlere dönüştürülmüştür (Resim 3.2-3.4).

3.7.1 Densitometrik ölçüm yolu ile gen ifade analizi

ImageJ programı ile jel görüntülerinin ölçüm işlemi yapılmadan önce çeşitli standart işlemler bütün görüntüler için uygulanmıştır. Tarayıcıdan minimum 600 dpi çözünürlükte, kayıpsız olarak veri saklama özelliğinden dolayı .tiff dosya uzantısı ile bilgisayara aktarılan görüntüler GIMP (v.2.6.8; Spencer Kimball, Peter Mattis ve GIMP Geliştirme Takımı) programı kullanılarak ilk önce RGB moddan gri ölçekli moda dönüştürülmüş, ardından renk seviyeleri ayarlanmış ve en son olarak renkler dijital ortamda tersine çevrilmiştir (Resim 3.2).



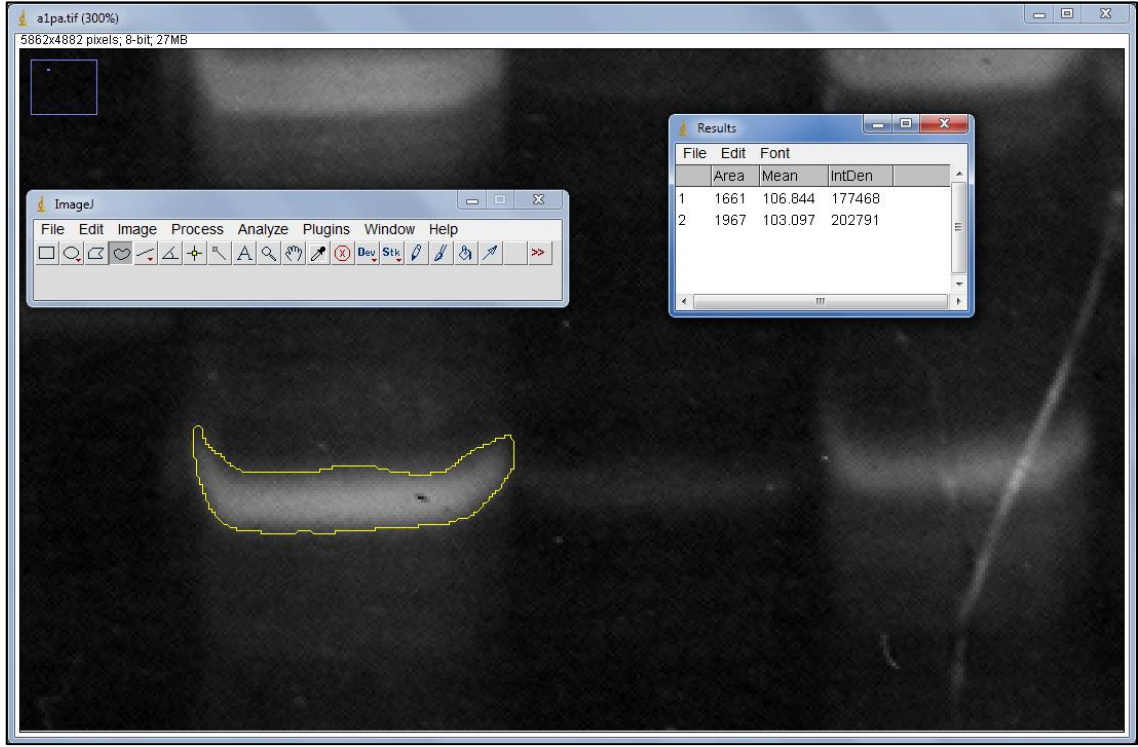
Resim 3.2. Gen ifade farklılığının jel görüntüsüne yansımaları A) Resmin tarayıcıdan bilgisayara ilk aktarıldığı hali. B) Resmin renklerinin ters çevrilmiş ve renk seviyelerinin iyileştirilmiş hali. Göz ile kontrolde 1, 4, 5, 6 nolu örneklerde yüksek gen ifadesi olduğu; 7 nolu örnekte oldukça düşük gen ifadesi olduğu; 2 ve 3 nolu örneklerde ise genin ifade edilmediği görülmektedir.



Resim 3.3. Gimp resim işleme programı yardımı ile görüntülerin densitometrik analize hazır hale getirilmesi. A) RGB moddan gri ölçekli moda geçiş. B) Renk seviyelerinin ayarlanması C) Hiçbir işlem görmemiş orjinal resim. D) Renk seviyeleri ayarlanmış resim. E) Renk seviyelerinin ayarlanmasının ardından renklerin tersine çevrilmiş hali.

GIMP programı ile gerekli renk ayarlamaları yapıldıktan sonra ImageJ programı ile görüntüler tek tek açılarak daha önceden belirlenen aday bölgelerde Area, Mean ve Integrated Density (ID) değerleri ölçülmüştür. Ölçülen değerlerden “area” değişkeni jel görüntüsünde ölçülen alan büyüklüğüne, “mean” değişkeni 0-255 arası değişkenlik gösteren ortanca gri değerine ve ID değeri ise bu iki değişkenin sayısal değerlerinin çarpımına karşılık gelmektedir. Anlamlı şekilde değerlendirme yapılabilmesi için her iki değişkendeki farklılıkları da kapsadığı için çalışmamızda ID değeri esas alınmıştır.

ImageJ programı yardımı ile bu tür ölçümlerin yapılması için kullanılan eğri çizim yöntemi ve doğrudan alan ölçüm yöntemi olmak üzere iki yöntem farklı yöntem mevcuttur (77). Bu çalışmada doğrudan alan ölçüm yöntemi kullanılmıştır (Resim 3.4).



Resim 3.4. ImageJ programı kullanılarak doğrudan alan ölçüm yöntemi ile Area, Mean ve ID değerlerinin sayısal olarak elde edilmesi. Gimp programı ile analize hazır hale getirilen jel resimleri ImageJ programı ile açılarak aday bölgelere ait bantlar “Freehand selection” kullanılarak seçilmiş ve ölçülmüştür.

Elde edilen ölçüm değerleri ImageJ programının “results” penceresinden alınmış ve her bir örnek için Excel tabloları oluşturulmuştur. Bu tablolar istatistikî hesaplamalarda kullanılmıştır.

3.8. İstatistikî hesaplamalar

Kantitatif analiz sonucunda elde edilen integrated density (ID) değerleri üzerinden GraphPad InStat (version 3.05, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanılarak Student-Newman-Keuls testi yapılmıştır.

Nodüle karşılık PTK-F, nodüle karşılık PTK-K ve PTK-F'ye karşılık PTK-K kıyaslamaları yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.9. DNA dizin analizi

PCR ile çoğaltılan örnekler çoklu A dizisi içerdikleri için dizilenmesi zor olan bölgelerdir. Bu bölgelerin dizin analizi öncesi yapılan PCR işlemi değişkenleri her bir örnek için değiştirilerek en iyi sonuçlar elde edilmeye çalışılmıştır (Tablo 3.14-3.15).

Tablo 3.14. DNA dizin analizi için örneklerin hazırlanması aşamasında kullanılan karışım oranları.

Kimyasal Madde	Miktar (µl)
Distile su	Değişken *
Sequencing tampon (5X)	2
Big Dye	1
Primer (5' veya 3')(2pM)	2
PCR ürünü	Değişken **
Toplam hacim	10

* Toplam hacim 10 µl olacak şekilde PCR ürünün miktarına bağlı olarak değişmektedir.

** 0.25 ile 1 µl arasında değişen miktarlarda kullanılmıştır.

Tablo 3.15. DNA dizin analizi öncesi yapılan PCR döngü koşulları. Hedef dizilerin çok fazla değişkenlik göstermeleri ve çoklu A dizisi içermeleri nedeni ile farklı bağlanma sıcaklıkları denenmiştir.

Uygulanan Sıcaklık (°C)	Tekrar sayısı	Süre
96°C	1 kez	1 dakika
96°C		10 saniye
Değişken *	25 döngü	5 saniye
60°C		4 dakika
4°C		∞

* Örneğin DNA dizin analizine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Beşin katları şeklinde 45-60°C arası sıcaklıklar denenmiştir.

Dizin analizi için yapılan PCR işleminin ardından örnekler ABI 3130 dizin analiz cihazına yüklenerek sonuçlar. AB1 dosya uzantısı şeklinde elde edilmiştir.

3.10. BLAST işlemi

Dizin analizi neticesinde elde edilen .AB1 dosyaları Trev v.1.9 programı (1999-2002, Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology) kullanılarak dizin analiz sonuçları .txt dosyası olarak kaydedilmiş ve bunlar üzerinden BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) analizi yapılmıştır (78). Analizler BLAST 2.2.23 sürümü, blastn algoritması ve refseq_rna veritabanı kullanılarak yapılmıştır (78).

Çoklu A dizilimine bağlı olarak dizin analizinde bazı bölgelerde kayma olduğu için dizilimlerin birbirinden ayrılmasını sağlamak amacı ile blastn algoritma değişkenleri tabloda belirtildiği şekli ile değiştirilmiştir (Tablo 3.16).

Tablo 3.16. BLAST işlemi için kullanılan blastn algoritma değişkenleri.

En fazla hedef dizilim sayısı	100, 250
Expect treshold	10000, 1000, 100
Word size	7, 11, 15
Match/Mismatch Scores	2,-3
Gap Costs	Existence:5 Extension: 2
Species-specific repeats	Human
Database	refseq_rna

İstatistik sonucun anlamlı olup olmadığına bakılmaksızın bütün aday bölgeler için BLAST analizi uygulanmıştır.

3.11. Bulunan genler arası etkileşimler

BLAST işlemi sonucu ilişkili olduğu görülen genlerin birbirleri ile ilişkisini araştırmak amacı ile de FuncBase (<http://func.med.harvard.edu>) veritabanı taranmış; ortak moleküler işlev, ortak hücrenel bileşen ve paylaşılan biyolojik süreç kategorilerinde muhtemel ilişkiler araştırılmıştır.

4 BULGULAR

4.1 Aday bölgelerin ölçüm yolu ile sınılanması ve istatistikî bulgular

Onbeş adet primer seti kullanılarak yapılan DD-PCR analizi neticesinde elde edilen jel görüntüleri üzerinden görsel olarak yapılan ilk incelemede 44 adet aday bölgenin nodüllere ve birbirine kıyasla farklı seviyede gen ifadesine sahip olduğu görülmüştür (Tablo 4.1). Bu bölgeler birbiri ile karışmaması için primer isimlendirmeleri esas alınarak sistematik bir şekilde numaralandırılmıştır.

Tablo 4.1. Kullanılan primerler esas alınarak aday bölgelerin isimlendirilmesi. Göz ile yapılan ilk tespitte göre 33 ayrı bölgede gen ifadesinde düşüş, 11 ayrı bölgede ise gen ifadesinde artış tespit edilmiştir.

Primer bölgesi	Aday bölge adları	Gen ifadesinde artış olan bölge sayısı	Gen ifadesinde azalma olan bölge sayısı
<i>Arb1-polyA</i>	111, 112, 113, 114, 115	0	5
<i>Arb2-polyA</i>	-	0	0
<i>Arb3-polyA</i>	131	0	1
<i>Arb4-polyA</i>	141, 142, 143, 144, 145, 146	6	0
<i>Arb5-polyA</i>	151	0	1
<i>Arb1-polyC</i>	161, 162, 163, 164, 165, 166	5	1
<i>Arb2-polyC</i>	-	0	0
<i>Arb3-polyC</i>	181, 182, 183, 184, 185	4	1
<i>Arb4-polyC</i>	-	0	0
<i>Arb5-polyC</i>	-	0	0
<i>Arb1-polyG</i>	211, 212, 213, 214, 215	4	1
<i>Arb1-polyG</i>	221, 222, 223, 224, 225, 226	6	0
<i>Arb3-polyG</i>	231, 232, 233	2	1
<i>Arb4-polyG</i>	241, 242, 243, 244, 245	5	0
<i>Arb5-polyG</i>	251	1	0
Toplam sayılar		33	11

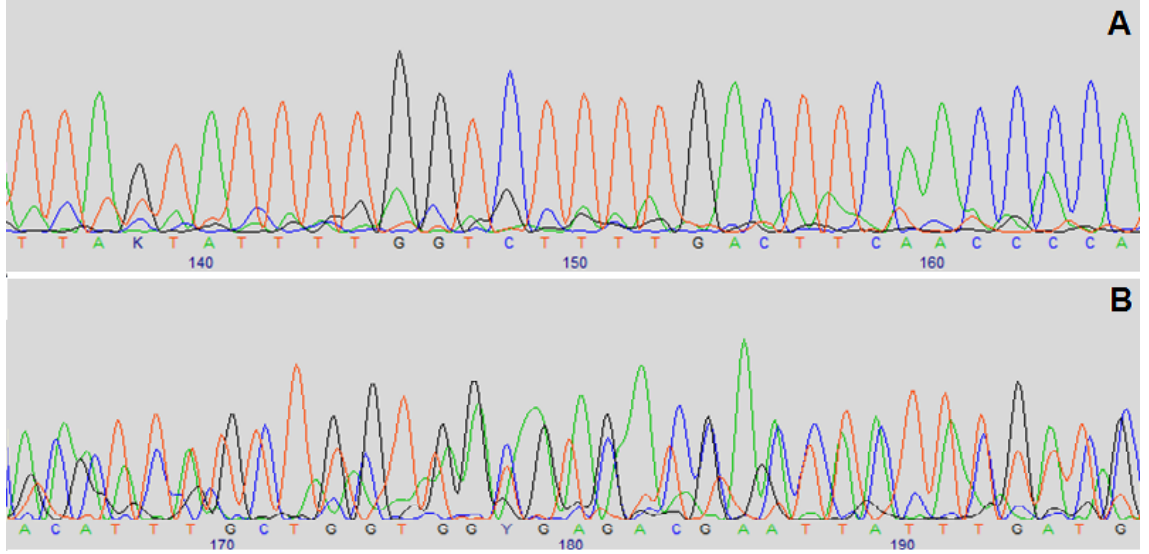
Numaralandırmanın ardından ImageJ programı kullanılarak aday bölgelerin her biri için kantitatif ölçüm yapılmıştır. Kantitatif analiz sonucunda elde edilen integrated density (ID) değerlerinin istatistikî analizi neticesinde gen ifadesinin artmış ya da azalmış olduğu düşünülen 44 bölgeden 32 adedindeki farklılık anlamlı, 12 adedinde ise anlamsız olduğu bulunmuştur (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Gruplar bazında aday bölgelerin elde edilen p değerleri. P değerinin 0.05'ten büyük olduğu bölgeler boş bırakılmıştır. 44 bölge içerisinde 12 bölgede gruplar arasında hiçbir fark bulunamazken 32 adedinde 3 grubun kendi aralarında değişen oranlarda farklılık bulunmuştur.

Aday bölge no	Nodüle kıyasla PTK-K	Nodüle kıyasla PTK-F	PTK-F'ye kıyasla PTK-K
111	<0.001	>0.05	<0.01
112		>0.3509	
113	<0.001	<0.01	>0.05
114	<0.001	>0.05	<0.001
115	<0.001	>0.05	<0.05
131	<0.05	>0.05	<0.01
141	>0.05	<0.05	>0.05
142	<0.001	<0.05	>0.05
143	<0.001	<0.01	>0.05
144		>0.08	
145	<0.05	<0.05	>0.05
146		>0.3047	
151	<0.05	>0.05	<0.05
161	>0.05	<0.05	>0.05
162	<0.001	<0.01	>0.05
163	>0.05	<0.05	>0.05
164	<0.001	<0.001	>0.05
165	<0.05	<0.01	>0.05
166	<0.05	>0.05	<0.05
181	>0.05	<0.05	>0.05
182		>0.4305	
183		>0.0605	
184		>0.6174	
185	>0.05	<0.05	<0.01
211	<0.001	<0.001	>0.05
212	<0.01	<0.001	<0.05
213	<0.001	<0.001	>0.05
214	<0.01	<0.001	>0.05
215	>0.05	>0.05	<0.05
221	<0.01	<0.01	>0.05
222	>0.05	<0.05	>0.05
223		>0.0567	
224		>0.1609	
225	>0.05	<0.05	<0.05
226	>0.05	<0.01	>0.05
231	>0.05	<0.05	>0.05
232	<0.001	>0.05	<0.001
233		>0.3733	
241		>0.7131	
242	<0.05	<0.05	>0.05
243	<0.001	<0.001	>0.05
244		>0.0869	
245		>0.3551	
251	>0.05	<0.05	>0.05

4.2 DNA dizin ve BLAST analizleri

Aday bölgelerden tamamının dizi analizleri de yapılmıştır. Fakat PCR ile çoğaltılan bölgeler çoklu A dizisi içerdiği ve bağlanan primerde kaymaya (stuttering sequence) neden olabildiği için bu bölgelerin tamamının dizin analizi sonucu istenen seviyede elde edilememiştir (Resim 4.1).



Resim 4.1. DNA dizin analizi sonuçları. A) Primer bağlanma bölgesinde kayma olmayan örneklerden birine ait dizin analiz sonucu. B) Primer bağlanma bölgesinde gerçekleşen kayma sonucu elde edilen dizin analiz sonucu. Pikler üst üste bindiği için dizin analizi yapılamamıştır.

Çalışılan 44 adet bölgeden (21 adedi anlamlı gruptan, 3 adedi istatistikî olarak anlamsız gruptan olmak üzere) 24 adedinin yapılan BLAST analizi sonucu ilgili olduğu geni tespit edilebilmiştir (Tablo 4.3)(Resim 4.2).

Tablo 4.3. Çalışılan bölgelerin BLAST analizi sonucu elde edilen ilişkili genlerin “Gene id” ve isimleri. Bulunan E değerleri dizilimin benzerliğine dair bilgi vermektedir. 141 nolu bölge ile 245 nolu bölgenin aynı gen ürünü olduğu görülmüştür.

Aday bölge no	NCBI Gene id	Genin ismi	BLAST analizi sonucu elde edilen E Değeri
141	989	<i>SEPT7</i>	9.00E-100
142	374786	<i>EFCAB5</i>	0.3
143	56950	<i>SMYD2</i>	7.00E-26
161	10776	<i>ARPP19</i>	3.00E-23
163	84988	<i>PPP1R16A</i>	7.00E-30
164	678	<i>ZFP36L2</i>	3.00E-09
165	4666	<i>NACA</i>	3.00E-23
166	8624	<i>PSMG1</i>	54
181	6129	<i>RPL7</i>	1.00E-58
211	4718	<i>NDUFC2</i>	4.00E-14
212	4354	<i>MPP1</i>	1.00E-53
214	23016	<i>EXOSC7</i>	1.3
221	6138	<i>RPL15</i>	2.00E-51
222	604	<i>BCL6</i>	3.00E-04
225	284440	<i>LOC284440</i>	4.00E-07
226	1603	<i>DAD1</i>	2.00E-29
231	4172	<i>MCM3</i>	6.00E-22
232	10940	<i>POPI</i>	25
241	6342	<i>SCP2</i>	6.00E-43
242	56947	<i>MFF</i>	3.00E-27
243	85379	<i>KIAA1671</i>	6.00E-30
244	400322	<i>HERC2P2 non- coding gene</i>	1.00E-10
245	989	<i>SEPT7</i>	5.00E-46
251	3550	<i>IK</i>	2.00E-95

```

>ref|NM_002948.2| UEG Homo sapiens ribosomal protein L15 (RPL15), mRNA
Length=2018

GENE ID: 6138 RPL15 | ribosomal protein L15 [Homo sapiens]
(Over 10 PubMed links)

Score = 203 bits (224), Expect = 2e-51
Identities = 129/146 (88%), Gaps = 1/146 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 76 TGAGYTAATTRC-TGCCCGYTCKGAACCAAYTTTCCCCTATCTTCYCTAGGGGTTTCMA 134
||| ||||| ||| || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1776 TGACTTAATTTAAATGCTCGTTCTGAACCAATTTTCTCCTATCTTCTCTAGGGGTTTCMA 1835

Query 135 AAGACTCAGTYAAWTGATTTCCAGGAARTACTCATAGCAAGTTCATAAAAAGTTCTKGAGA 194
||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1836 AAGACTCAGTTAATTGATTTCCAGGAAGTACTCATAGCAAGTTCATAAAAAGTTCTTGAGA 1895

Query 195 CCTAAATTTCTTCACAAAAAAGAAA 220
||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 1896 CCTAAATTTCTTCACAAAAAAGAAA 1921

```

Resim 4.2. RPL15 gen ürününe ait BLAST görüntüsü. E değeri 2e-51 olarak bulunmuştur.

4.3 Ölçüm değerlerinin grafiksel gösterimi

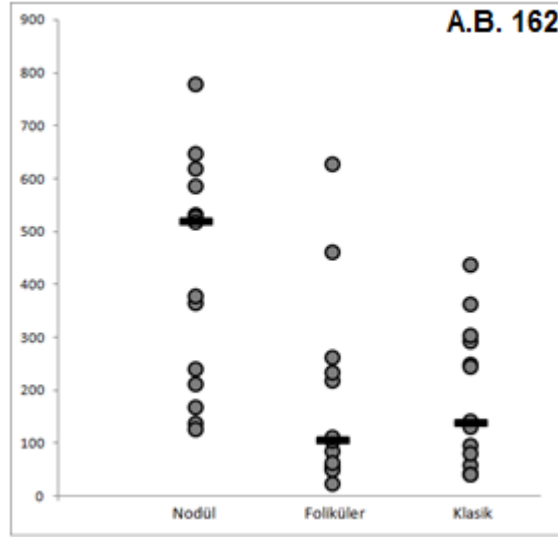
Çalışmamızda nodül gen ifadesine karşılık kanser grubu ile bir kıyaslama yapıldığından elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi gruplanabilir (Tablo 4.4);

- 1- Kanser grubuna (PTK) kıyasla nodülde gen ifadesi artışı (veya kanser grubunda düşüş)
- 2- Nodüle kıyasla kanser grubunda gen ifadesi artışı (veya nodülde düşüş)
- 3- PTK alt tiplerinden sadece birisine özel durumlar:
 - a. Sadece PTK-F’de değişim (gen ifadesinde artma veya azalma)
 - b. Sadece PTK-K’da değişim (gen ifadesinde artma veya azalma)
 - c. Nodüle nazaran aynı fakat alt tipler arası gen ifadesinde farklılık

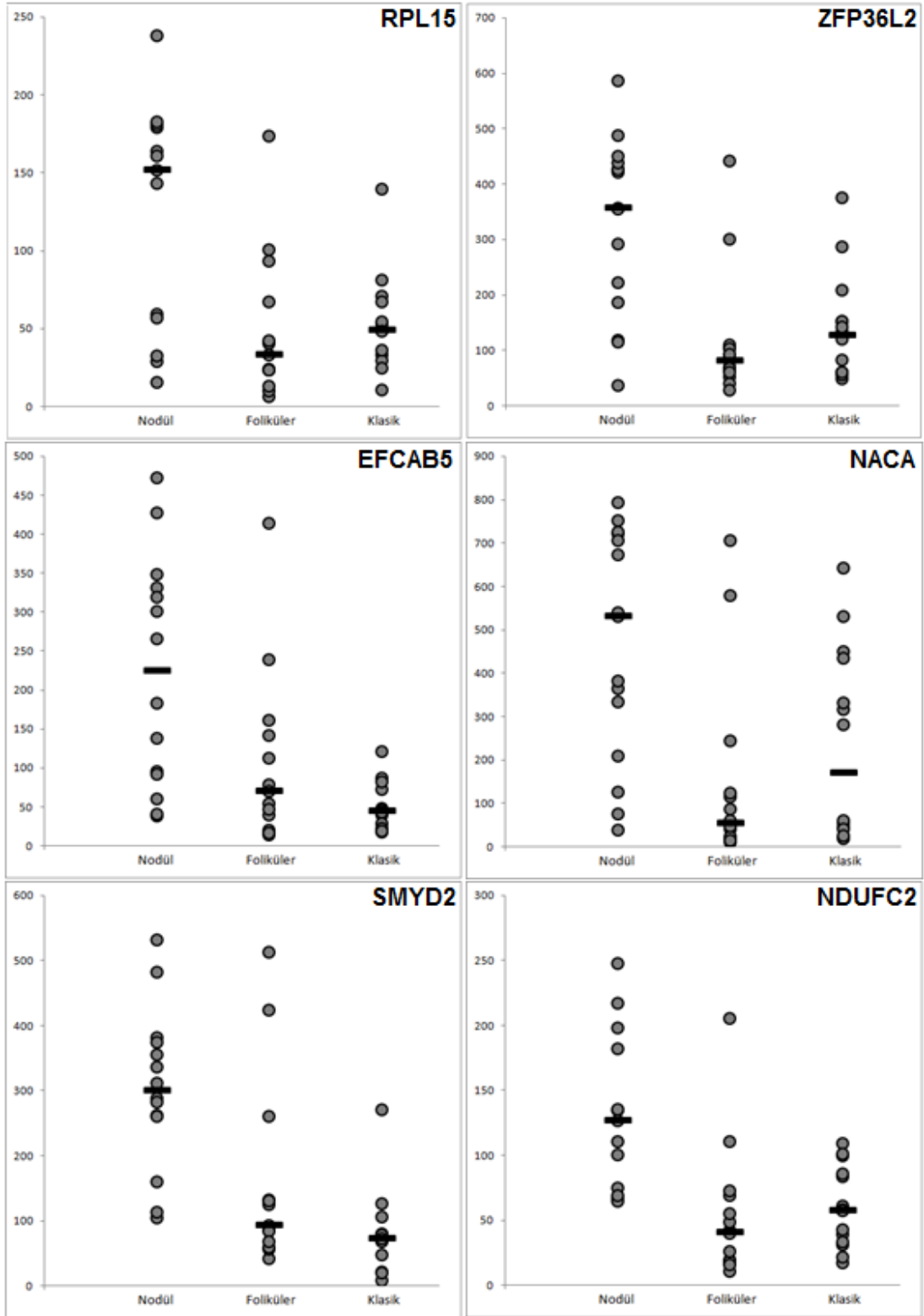
Tablo 4.4. Gruplar arası kıyaslama yapıldığında PTK’nın hem alt tiplerinde hem de alt tiplerin kendi aralarında gen ifadesi farklılığı görülmüştür. Bunun istisnası olarak; yalnızca PTK-F gen ifadesinin tek başına arttığı durumla karşılaşılmamıştır.

Gen ifadesinde gözlenen değişimin dokuya özgü sonucu	Gözlenen değişim sayısı	Gen veya aday bölge isimleri
Nodülde gen ifadesi artışı (veya kanser grubunda düşüş)	13	EFCAB5, SMYD2, ZFP36L2, NACA, NDUFC2, MPP1, EXOSC7, RPL15, MFF, KIAA1671 ve 3 adet isimsiz (145, 162, 213 nolu bölgeler)
Kanser grubunda gen ifadesi artışı (veya nodülde düşüş)	1	1 adet isimsiz (113 nolu bölge)
Sadece PTK-F’de artma	0	
Sadece PTK-K’da artma	6	PMSG1, POP1 ve 4 adet isimsiz (111, 114, 115 ve 151 nolu bölgeler)
Sadece PTK-F’de azalma	10	ARPP19, PPP1R16A, RPL7, BCL6, LOC284440, DAD1, MCM3, IK, SEPT7 ve 1 adet isimsiz (185 nolu bölge)
Sadece PTK-K’da azalma	1	1 adet isimsiz (131 nolu bölge)
Nodüle nazaran aynı fakat alt tipler arası gen ifadesinde farklılık	1	1 adet isimsiz (215 nolu bölge)
Toplam	32	

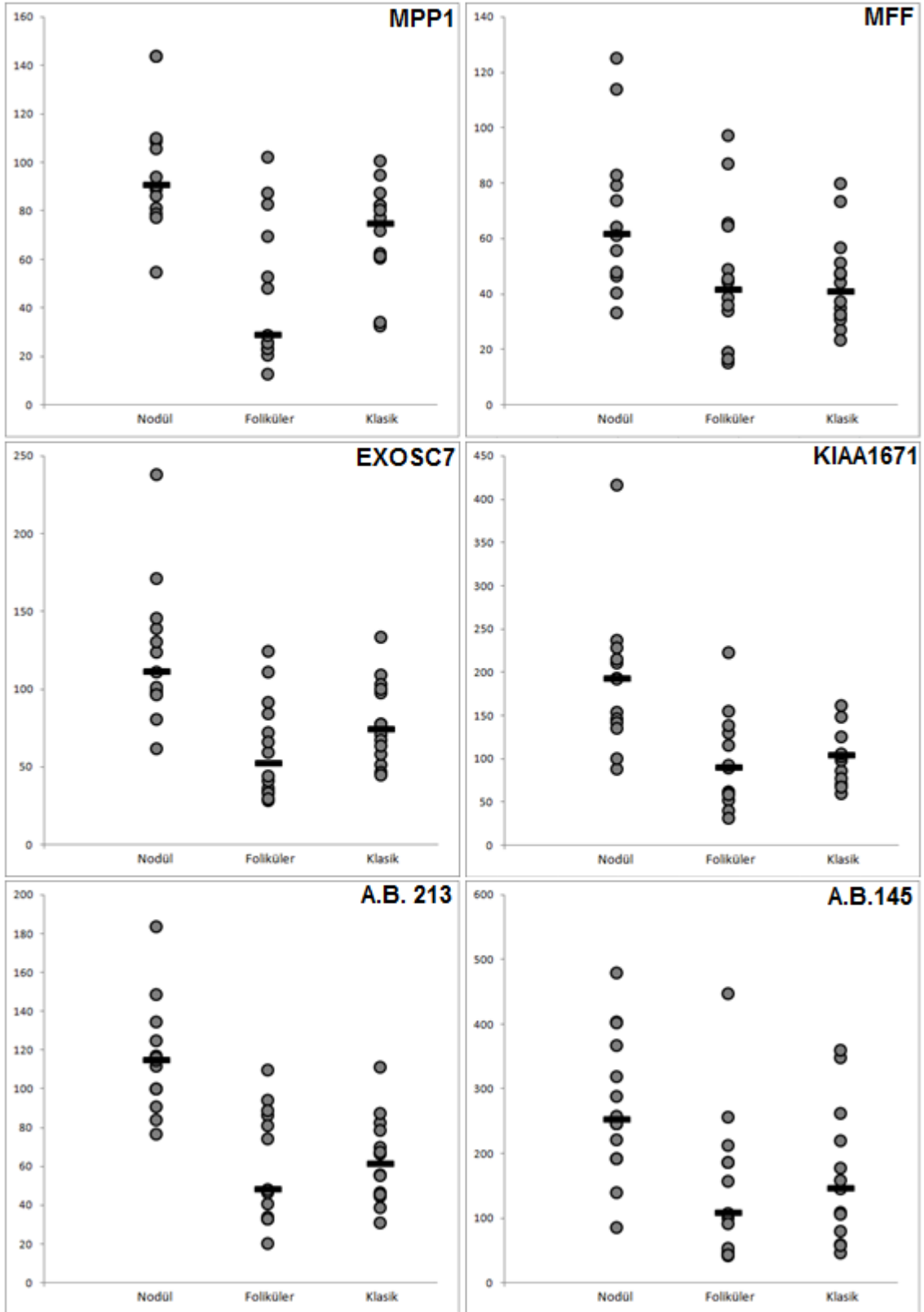
Elde edilen ölçüm sonuçları gruplar bazında grafiksel olarak da gösterilmiştir. Nodülde gen ifadesi artışı (veya kanser grubunda düşüş) görülen 13 adet bölgeye ait grafikler görselliğin bozulmaması için 3 kısımda; sadece PTK-F’de azalma grafikleri ise 2 kısımda gösterilmiştir. (Şekil 4.1-4.9).



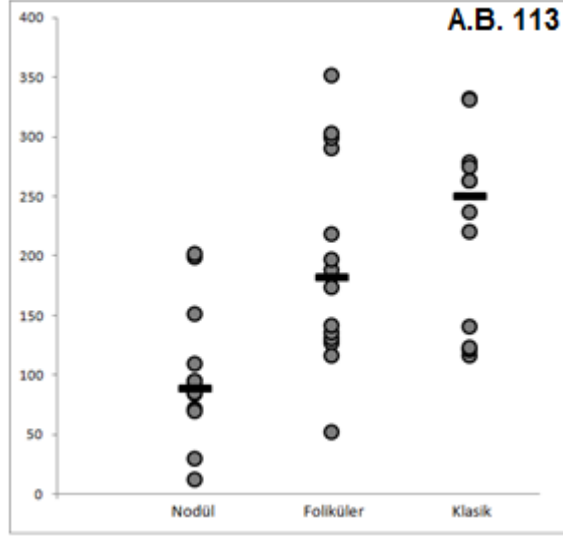
Şekil 4.1. Nodülde gen ifadesi artışı ya da kanser grubunda gen ifadesinde azalma bulunan 13 bölgeden 1 adedinin (162 nolu aday bölge) grafiği. Diğer bölgelere ait grafikler takip eden şekillerde verilmiştir.



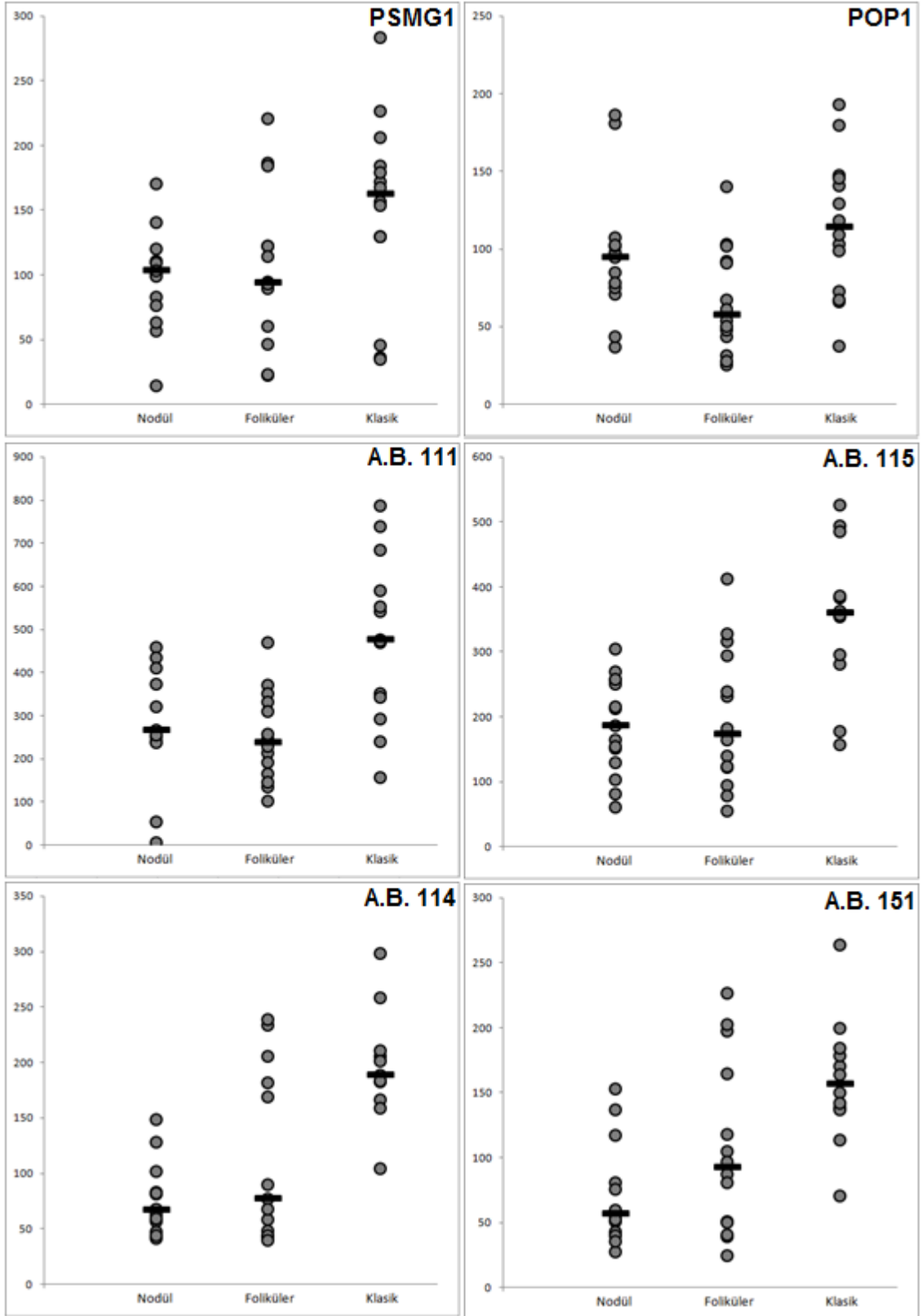
Şekil 4.2. Nodülde gen ifadesi artışı ya da kanser grubunda gen ifadesinde azalma bulunan 13 bölgeden 6 adedinin (RPL15, ZFP36L2, EFCAB5, NACA, SMYD2 ve NDUFC2) grafikleri. Diğer bölgelere ait grafikler takip eden şekillerde verilmiştir.



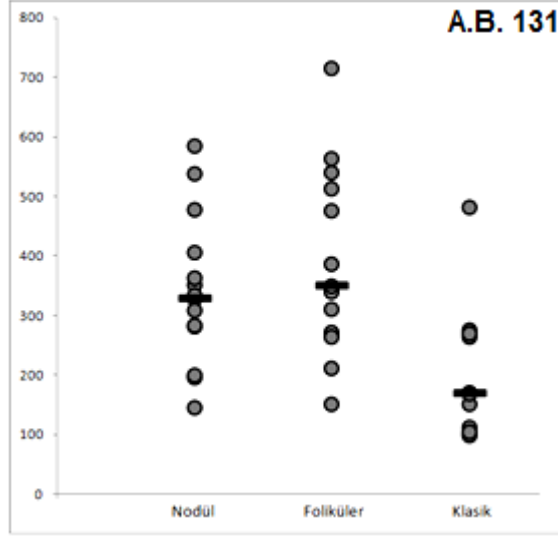
Şekil 4.3. Nodülde gen ifadesi artışı ya da kanser grubunda gen ifadesinde azalma bulunan 14 bölgeden 6 adedinin (MPP1, MFF, EXOSC7, KIAA1671, 213 ve 145 nolu aday bölgeler) grafikleri.



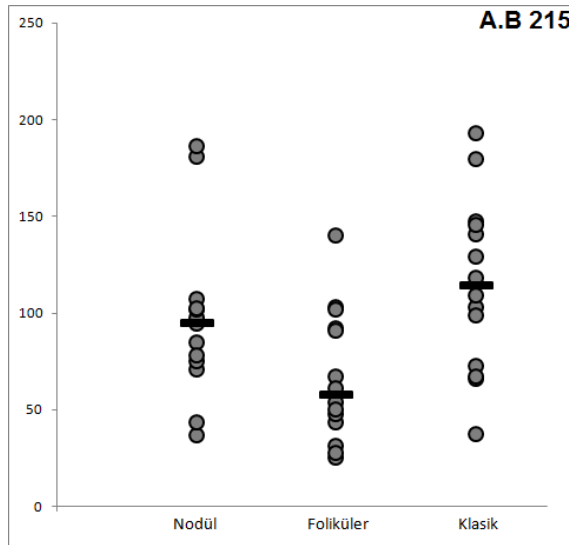
Şekil 4.4. Kanser grubunda artış (veya nodülde düşüş) görülen tek bölge olan 113 nolu aday bölgeye ait grafik. PTK-F ve PTK-K'daki nodüle kıyasla gerçekleşen artış net bir şekilde görülmektedir.



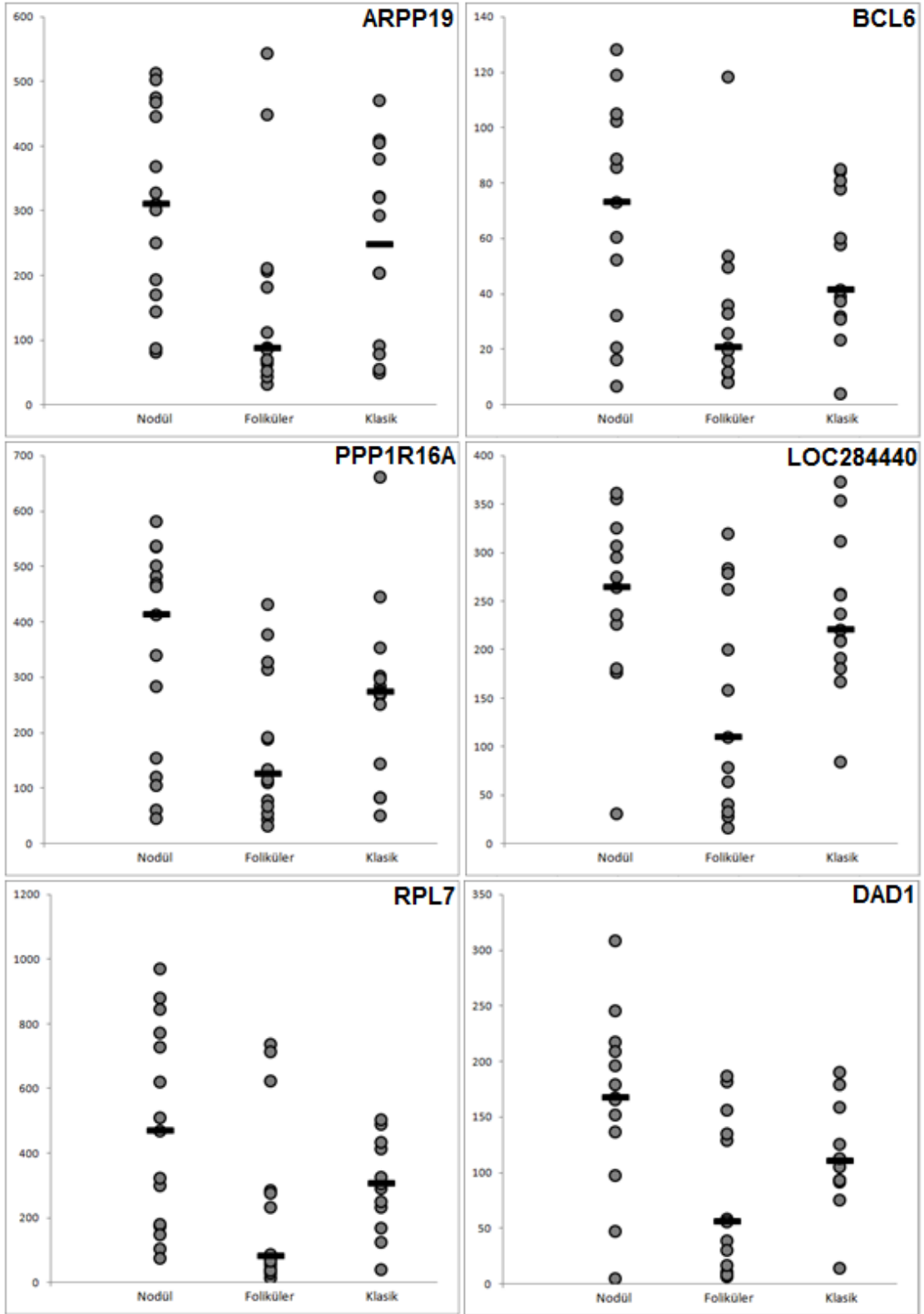
Şekil 4.5. PTK-K'da gen ifadesi artışı görülen 6 bölgeden 6'sının (PSMG1, POP1, 115, 111, 151 ve 114 nolu aday bölgeler) grafikleri.



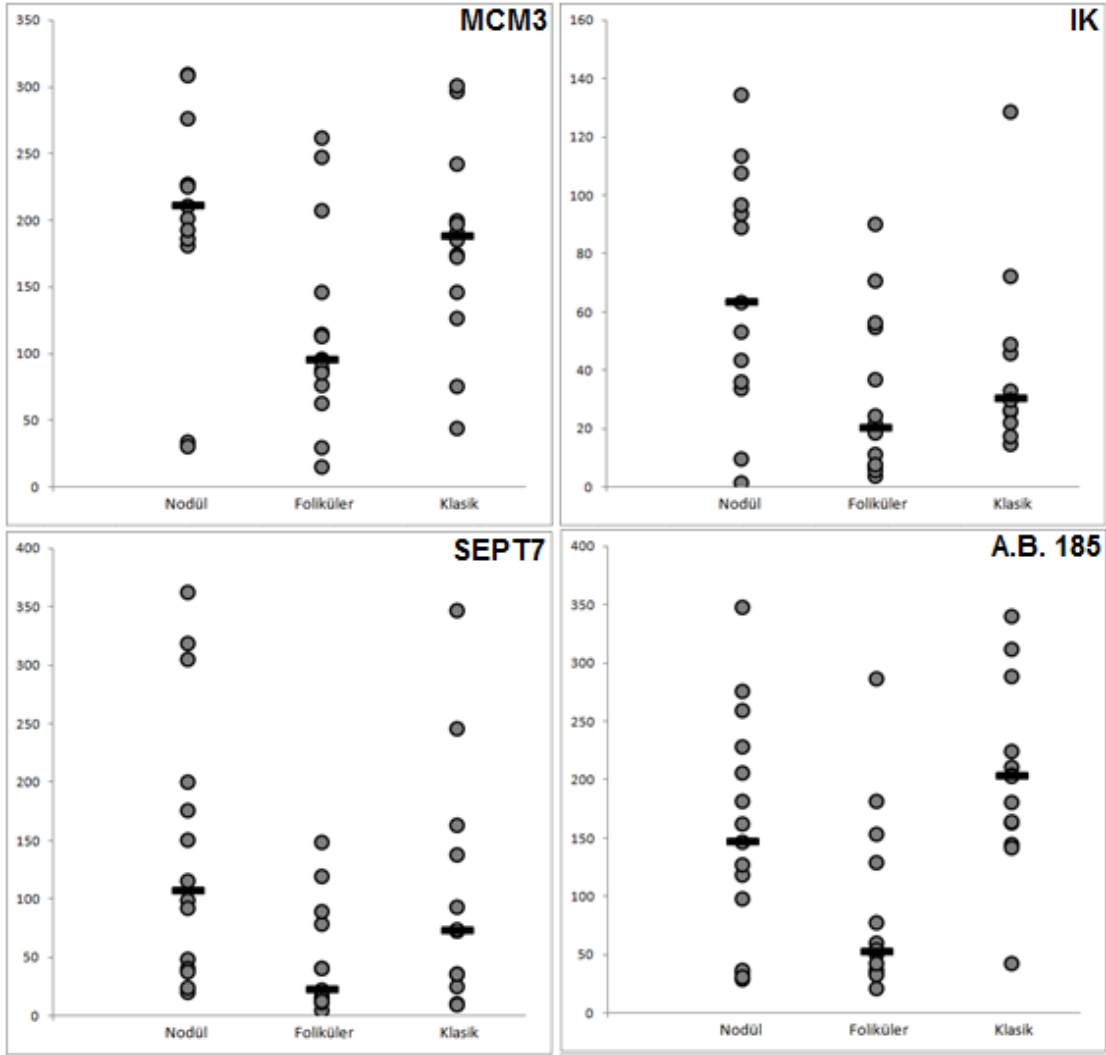
Şekil 4.6. Yalnızca PTK-K'da azalma görülen 131 nolu aday bölgeye ait ölçüm grafiği. Diğer iki grup için tespit edilen ortanca değerleri yaklaşık aynıdır.



Şekil 4.7. Nodüle kıyasen aynı fakat alt tipler arası gen ifade farklılığı gösteren 215 nolu aday bölgeye ait grafik. İstatistiki hesaplara göre yalnızca PTK-F ile PTK-K arasında fark bulunmuştur.



Şekil 4.8.Yalnızca PTK-F’de azalma ya da diğer iki grupta artma görülen 10 bölgeden 6 adedinin (ARPP19, BCL6, PPP1R16A, LOC284440, RPL7, DAD1) ölçüm grafikleri. Kalan 4 bölgeye ait grafikler takip eden şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Yalnızca PTK-F’de azalma ya da diğer iki grupta artma görülen 10 bölgeden 4 adedinin (MCM3, IK, SEPT7, ve 185 nolu aday bölge) ölçüm grafikleri.

4.4 Gen ifadelerindeki ölçüm değerleri kullanılarak moleküler ayırım yapılması

Bu çalışma sonucunda 21 adet genin ifadesindeki değişimler kullanılarak kanserli doku ile iyi huylu nodülün; PTK-K içeren doku ile nodül veya PTK-F dokularının birbirinden ayrılacağı görülmüştür (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. İlgili olduğu bulunan genlerin ifadesinde gözlenen değişimin gruplara yansımaları gösteren tablo. 9 adet gendeki (SEPT7, ARPP19, PPP1R16A, RPL7, BCL6, LOC284440, DAD1, MCM3 ve IK) ifade değişiminden yola çıkılarak PTK-F'yi, 2 adet gendeki (PSMG1 ve POP1) ifade değişiminden yola çıkılarak PTK-K'yı ve 10 adet gendeki (EFCAB5, SMYD2, ZFP36L2, NACA, NDUFC2, MPP1, EXOSC7, RPL15, MFF ve KIAA1671) ifade değişiminden yola çıkılarak nodül/kanserli doku ayrımı yapılabilmektedir.

Gen adı	Kanser grubuna kıyasla (PTK) nodülde gen ifadesi artışı (veya kanser grubunda düşüş)	Nodüle kıyasla kanser grubunda gen ifadesi artışı (veya nodülde düşüş)	Tek bir alt tipe özel değişim	Sadece PTK-F'de değişim (artma [↑]- azalma [↓])	Sadece PTK-K'da değişim (artma [↑]- azalma [↓])	Moleküler ayrım yolu ile ayrılabilen doku tipi
SEPT7			✓	↓	→	PTK-F
EFCAB5	✓			↓	↓	Nodül/Kanser
SMYD2	✓			↓	↓	Nodül/Kanser
ARPP19			✓	↓	→	PTK-F
PPP1R16A			✓	↓	→	PTK-F
ZFP36L2	✓			↓	↓	Nodül/Kanser
NACA	✓			↓	↓	Nodül/Kanser
PSMG1			✓	→	↑	PTK-K
RPL7			✓	↓	→	PTK-F
NDUFC2	✓			↓	↓	Nodül/Kanser
MPP1	✓			↓	↓	Nodül/Kanser
EXOSC7	✓			↓	↓	Nodül/Kanser
RPL15	✓			↓	↓	Nodül/Kanser
BCL6			✓	↓	→	PTK-F
LOC284440			✓	↓	→	PTK-F
DAD1			✓	↓	→	PTK-F
MCM3			✓	↓	→	PTK-F
POP1			✓	→	↑	PTK-K
SCP2	×			→	→	-
MFF	✓			↓	↓	Nodül/Kanser
KIAA1671	✓			↓	↓	Nodül/Kanser
HERC2P2	×			→	→	-
IK			✓	↓	→	PTK-F

Ayrıca DNA diziliminin tespit edilemediği 11 adet bölgedeki değişimlerden faydalanılarak da çok daha ayrıntılı olarak dokular arası moleküler ayırım yapılabileceği görölmüşür (Tablo 4.4).

4.5 İlişkili bulunan genlere ait bilgiler

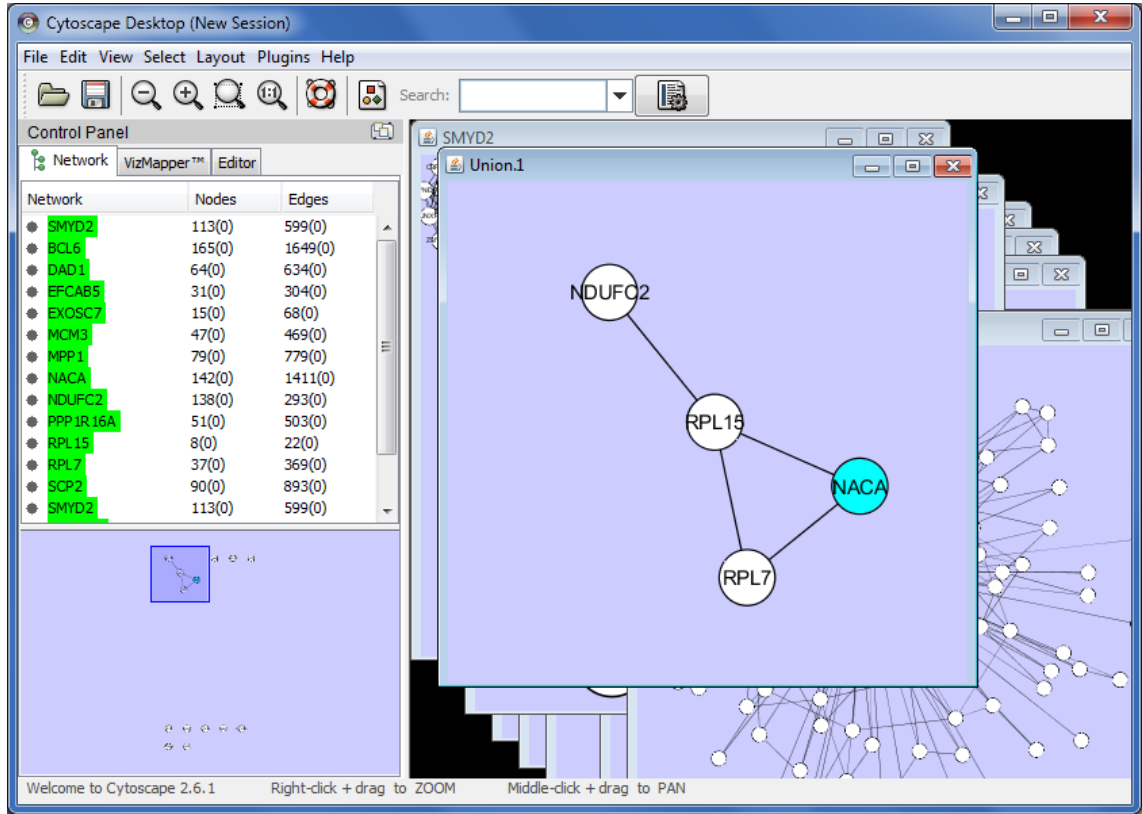
Bu çalışma sonucu gen ifadesinde değişim tespit edilen genlerin bazılarının kromozomal yerleşimlerinin başka çalışmalarda PTK için belirlenen hassas bölgelere oldukça yakın olduğu görölmüşür (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. İlişkili olduğu tespit edilen genlerin kromozomal yerleşim bilgileri ve alternatif isimlendirmeleri. Tabloya bilgi vermesi için istatistiki olarak anlamlı sonuç vermeyen SCP2 ve HERC2P2 genleri de dahil edilmiştir.

NCBI Gene id	Genin ismi	Genin resmi olarak tam ismi	Alternatif isimleri	Kromozomal yerleşim
4718	NDUFC2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa	B14.5b; NADHDH2	11q14.1
4666	NACA	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit	HSD48; NACA1; MGC117224	12q23-q24.1
1603	DAD1	defender against cell death 1	OST2	14q11-q12
400322	HERC2P2	hect domain and RLD 2 pseudogene 2	MN7; D15F37S3	15q11.2
10776	ARPP19	cAMP-regulated phosphoprotein, 19kDa	ENSAL; ARPP16; ARPP-16; ARPP-19; FLJ41622	15q21.2
374786	EFCAB5	EF-hand calcium binding domain 5	FLJ46247; DKFZp434G2420; DKFZp686I0638	17q11.2
284440	LOC284440	hypothetical LOC284440	FLJ12356; MGC39821	19p13.11
6342	SCP2	sterol carrier protein 2	NLTP; SCPX; NSL-TP; DKFZp686C12188; DKFZp686D11188	1p32
56950	SMYD2	SET and MYND domain containing 2	KMT3C; HSKM-B; ZMYND14; MGC119305	1q32.3-q41
8624	PSMG1	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 1	PAC1; DSCR2; C21LRP; LRPC21	21q22.3
85379	KIAA1671	KIAA1671	-	22q11.23
678	ZFP36L2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	BRF2; ERF2; ERF-2; TIS11D; RNF162C	2p22.3-p21
56947	MF1	mitochondrial fission factor	GL004; C2orf33; MGC110913; DKFZp666J168	2q36.3
23016	EXOSC7	exosome component 7	p8; EAP1; RRP42; Rrp42p; hRrp42p; FLJ26543; KIAA0116	3p21.31
6138	RPL15	ribosomal protein L15	EC45; RPL10; RPLY10; RPYL10; FLJ26304; MGC88603	3p24.2
604	BCL6	B-cell CLL/Lymphoma 6	BCL5; LAZ3; BCL6A; ZNF51; ZBTB27	3q27
3550	IK	IK cytokine, down-regulator of HLA II	RED; CSA2; MGC59741	5q31.3
4172	MCM3	minichromosome maintenance complex component 3	HCC5; P1.h; RLFB; MGC1157; P1-MCM3	6p12
989	SEPT7	septin 7	CDC3; CDC10; SEPT7A; Nbla02942	7p14.3-p14.1
6129	RPL7	ribosomal protein L7	humL7-1; MGC117326	8q21.11
10940	POP1	processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP subunit (<i>S. cerevisiae</i>)	KIAA0061; MGC17365	8q22.1
84988	PPP1R16A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16A	MYPT3; MGC14333	8q24.3
4354	MPP1	membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	MRG1; PEMP; AAG12; EMP55; DXS552E	Xq28

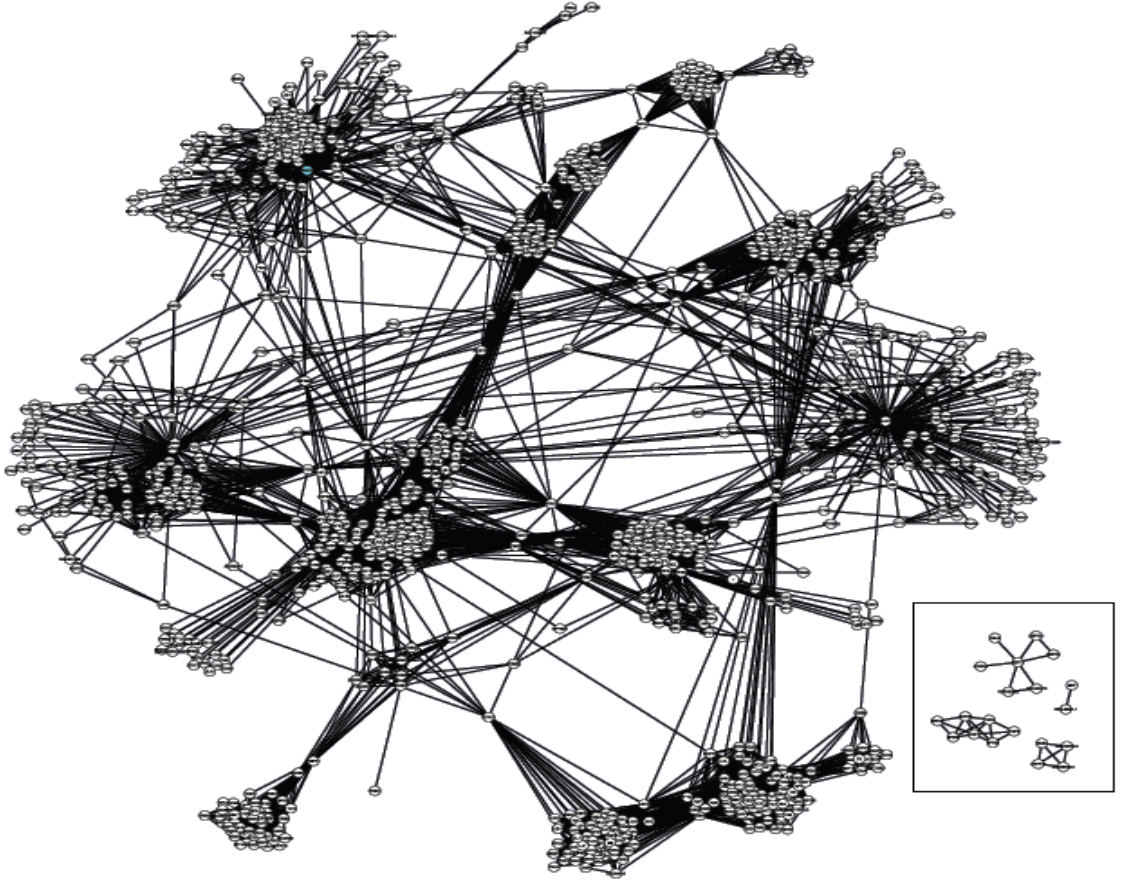
4.6 Protein fonksiyonu veritabanında protein etkileşimlerinin karşılaştırılması

FuncBase (<http://func.med.harvard.edu>) protein etkileşim veritabanında yapılan araştırma sonucu bulunan NDUFC2, RPL15, RPL7 ve NACA genlerinin birbiri ile moleküler işlev yönünden ilişkili olduğu görülmüştür (Resim 4.3). Elde edilen verilerin biraz daha geniş kapsamlı olarak ele alınması ile de daha geniş bir moleküler işlev ağına ulaşılmıştır.

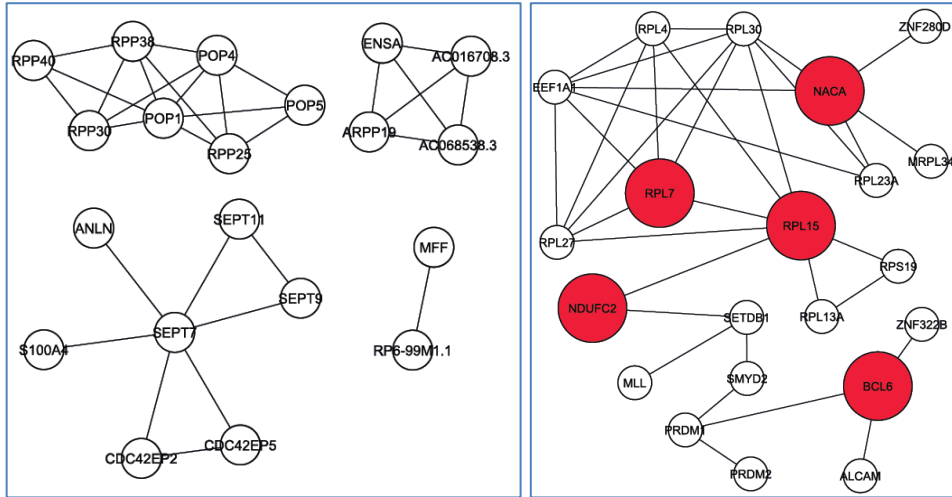


Resim 4.3. FuncBase veritabanında verilerin görselleşmesi için kullanılan Cytoscape (79) arayüzü ile yapılan analiz sonucunda RPL15'in NDUFC2, RPL7 ve NACA ile moleküler işlev yönünden etkileşim içinde olduğu görülmüştür.

Dört adet genin (SEPT7, POP1, ARPP19 ve MFF genleri) diğer genler ile işlevsel bir bağının olmadığı fakat 14 adet genin (BCL6, SMYD2, MPP1, MCM3, EXOSC7, EFCAB5, DAD1, PPP1R16A, ZFP36L2, SCP2, NDUFC2, RPL15, RPL7 ve NACA genleri) doğrudan ve dolaylı olarak bir etkileşim ağı içerisinde yer aldıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.10- 4.11).



Şekil 4.10. İlişkili olduğu görülen 14 adet genin Cytoscape arayüzü ile elde edilmiş karmaşık ilişki ağını gösteren görüntüsü. Dikdörtgen içerisinde etkileşim ağına girmeyen SEPT7, POP1, ARPP19 ve MFF genleri görülmektedir.



Şekil 4.11. Etkileşim ağına girmeyen SEPT7, POP1, ARPP19 ve MFF genlerinin Cytoscape'den elde edilen görüntülerinin ayrıntılı olarak gösterimi (Solda). RPL7, RPL15, BCL6, NDUFC2 ve NACA genlerinin genişletilmiş moleküler işlev ağları (Sağda).

5 TARTIŞMA

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgulara göre en fazla 32 adet genin ifadesindeki değişim oranları kullanılarak tiroid nodülü ile PTK; tiroid nodülü ile PTK-K veya PTK-F arasında moleküler seviyede ayırım gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca, çalışma başında hedeflenenden daha ileri olarak nodül grubunu hesaba katmadan PTK alt tipleri PTK-F ve PTK-K arasında dahi ayırım yapılabileceği görülmüştür.

Tespit edilen 32 adet gen bölgesinden 13 adedinde kanser grubuna (PTK, PTK-F ve PTK-K) kıyasla nodül grubunda gen ifadesinde artış görülmüştür (Tablo 4.4). Bu genler EFCAB5, SMYD2, ZFP36L2, NACA, NDUFC2, MPP1, EXOSC7, RPL15, MFF, KIAA1671 ve 3 adet isimsiz bölge şeklindedir. Ayrıca 1 adet isimsiz gen bölgesinde nodül grubuna kıyasla kanser grubunda gen ifadesinde artış tespit edilmiştir.

PTK-F grubunda nodüle kıyasla gen ifadesinde değişimin gözlemlendiği 10 adet gen bölgesi tespit edilmiştir. PTK-F'ye özel bu değişimin tamamı gen ifadesinde azalma şeklindedir (Tablo 4.4). Bunlar ARPP19, PPP1R16A, RPL7, BCL6, LOC284440, DAD1, MCM3, IK, SEPT7 genleri ve 1 adet isimsiz gen bölgesidir.

PTK'nın çalışılan diğer alt tipi PTK-K grubunda ise nodüle kıyasla gen ifadesinde hem artış hem de azalma tespit edilmiştir. Gen ifadesinde artış gözlemlenen 6 adet bölge PMSG1, POP1 genlerini ve 4 adet isimsiz gen bölgesini kapsamaktadır (Tablo 4.4). Ek olarak, 1 adet isimsiz bölgede ise gen ifadesinde azalma tespit edilmiştir.

Çalışmanın başında dokuların yalnızca karsinom içerip içermemesine dayalı bir moleküler ayırım hedeflenmekte idi. Elde edilen veriler bunun daha da fazlasını; karsinom içeren dokuların kendi aralarında da ayırımının yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Tespit edilen 1 adet isimsiz bölgedeki gen ifadesi değişimleri bize çalışılan iki karsinom alt tipini moleküler seviyede ayırabilme imkânı sağlamaktadır.

DD-PCR yöntemi ile bu zamana kadar birçok yeni gen keşfedilebilmiş olmasına karşın yöntem belli oranda yanlış sonuç verebilme ihtimali nedeni ile eleştirilebilmektedir (18,80). Sonuçların tekrar edilebilirliğini test etmek amacı ile bu çalışmada bazı deneyler yinelenmiştir. Yinelenen deneylerde öncekinden farklı sonuç elde edildiği bir durumla karşılaşılmamıştır.

MCM proteinleri hücre döngüsünde S evresine geçişte rol alan ve DNA'ya bağlanabilme özelliğine sahip proteinlerdir (34,81). Göğüs kanseri, yumuşak doku sarkomaları, non-Hodgkin's lenfoma gibi diğer bazı kanser tiplerinin yayılımında belirteç olarak kullanılan Ki-67'nin tiroid kanserlerine uygulanabilirliği tartışmalı olduğu için alternatif belirteç çalışmalarında MCM proteinlerinin, özellikle de MCM3'ün PTK tanısında kullanımına yönelik araştırmalar son zamanlarda öne çıkmaktadır (34,69,81). MCM proteinlerini kodlayan genlerin ifadelerinin yayılım gösteren hücrelerde yüksek olduğu, yalnızca farklılaşan veya bekleme evresindeki hücrelerde düştüğü daha önce gösterilmiştir (82). Aynı durum MCM3 için de geçerlidir (83). Lee ve ark. (81) bulgularına göre, 60 PTK örneğinde sağlıklı tiroid dokusuna kıyasla MCM3 ifadesinde artış tespit edilmiş fakat PTK'nın alt tiplerinden hangilerinin çalışmaya dahil edildiği bildirilmemiştir. Sağlıklı tiroid dokusunun ne şekilde kansere dönüştüğü; ilk önce adenom sonra karsinom oluştuğu mu, yoksa karsinomun baştan beri mi karsinom olduğu konusu tartışmalıdır (25,36,37,38). Bu çalışmada yalnızca PTK-F grubunda MCM3 gen ifadesinde diğer gruplara nazaran düşme tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Bu bulgu ile ilgili olarak üzerinde durulmayı gerektiren 2 önemli nokta bulunmaktadır. Birincisi, PTK-F dokusundaki MCM3 gen ifadesinin düşük olması bu dokudaki hücrelerinin değişim/dönüşüm aşamasını tamamlamadığı ve diğer alt tip olan PTK-K ile değişim/dönüşüm mekanizmaları yönünden farklı olabileceği düşüncesini akla getirmektedir. İkinci olarak, Lee ve ark. bulgularına göre MCM3 proteini normal dokuya nazaran PTK dokularında artmaktadır (81). Bizim bulgularımıza göre ise aynı artış nodülde de gerçekleşmektedir. Hem karsinom hem de tiroid nodül dokusunda aynı anda gözlenen gen ifadesi artışı, hedeflenen moleküler ayırımın güvenilirliğini azaltmaktadır. Sonuç olarak, PTK ve sağlıklı tiroid dokularında MCM3 gen ifadesi

değişimlerinin kıyaslanması ile elde edilecek verilerin tam güvenilir olmadığı; PTK-F'de bu genin ifadesinin artması beklenirken azaldığı bu çalışma ile ortaya çıkmıştır.

MCM3 geni ile beraber ARPP19, PPP2R16A, RPL7, BCL6, LOC284440, DAD1, IK, SEPT7 ve 1 adet isimli gen bölgelerinin ifadelerinde sadece PTK-F'ye özel değişim tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Bu bulgulara göre, PTK-F dokusu çalışılan diğer karsinom dokularından farklı bir gen ifade profiline sahip görünmektedirler. PTK-K ve PTK-F dokuları yapısal olarak karşılaştırıldığında, foliküler alanların daha baskın olması haricinde PTK-F'nin diğerinden bir farkı yoktur (20). Bu kadarlık bir farklılığın gen ifadesine bu kadar çok etki etmesinin, çok daha ayrıntılı araştırmalar yapılarak izah edilmesi gereken bir konu olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucu gen ifadesinde değişim tespit edilen genlerin bazılarının kromozomal yerleşimlerinin başka çalışmalarda PTK için belirlenen hassas bölgelere oldukça yakın olduğu görülmüştür. He ve ark.'nın (42) 2009 yılında yaptıkları çalışmalarında 8q24, 6q27, 12q21 ve 14q11 bölgelerini PTK için hassas bölge olarak tespit etmişlerdir. Bu bölgelerden 8q24 bölgesinin özellikle 142.70-154.53 cM aralığı en yüksek pik elde edilen bölgedir (42). Bizim çalışmamızda PPP1R16A gen ifadesinin PTK-F'de düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.8). PPP1R16A geni serin/treonin fosfatase-1 proteininin alt ünitelerinden birini kodlamaktadır (84). PPP1R16A geni kromozomal olarak 8q24 bölgesinde yaklaşık 145.75 cM civarında yani He ve ark.'nın PTK için hassas olarak tespit ettikleri bölgede yer almaktadır. Bu bölgede yer alan ve PTK ile ilişkilendirilen bir başka gen de DCSTAMP (TM7SF4) genidir. Bu genin PTK'da normalden fazla ifade edildiği başka bir çalışmada gösterilmiştir (18). Bizim ve diğer araştırmacıların (18,42) bulgularına göre 8q24 bölgesi PTK açısından öne çıkmaktadır. PPP1R16A genindeki ifade değişimi gen bölgesinde olabilecek mutasyonlardan veya bu bölge ile ilgili transkripsiyon düzeneğinden herhangi birinde olabilecek mutasyon sonucu olabilir. PPP1R16A geninin PTK ile ilişkisi ilk kez bu çalışmada ortaya konmuştur. Bu durumun daha ileriki çalışmalarla açıklığa kavuşturulması gerekir.

PTK ile ilişkilendirilen diğer bir hassas bölge 12q23 bölgesidir (41). Bu bölgede yer alan P2X7 genindeki 1513A>C gen çokyapılılığı ile PTK-F ve PTK-K arasında

istatistikî olarak anlamlı bir ilişki önceden bulunmuştur (43). Bizim çalışmamızda NACA geninin ifadesinin sadece nodül grubunda kanser grubuna kıyasla düştüğü (veya kanser grubuna kıyasla nodül grubunda arttığı) bulunmuştur (Şekil 4.2). NACA geni yeni sentezlenen proteinlerin hedeflenmesine rol almaktadır (85). Gen çokyapılılığı PTK ile ilişkilendirilmiş P2X7 geni 12q24'te; NACA geni ise 12q23-q24.1'te bulunmaktadır (86,87). Dolayısı ile NACA geninin ifadesindeki değişimin de bu genin kromozomal yerleşimi ile ilişkili olabileceği akla gelmektedir. Ayrıca protein hedeflenmesi ve kanser arasındaki ilişki nedeni ile de bu gen öne çıkmaktadır. NACA geninin PTK ile ilişkisi de ilk kez bu çalışmada ortaya konmuştur.

Bu tez çalışmasında elde edilen diğer ilginç bir bulgu DAD1 geni ile ilgilidir. DAD1 geni anti apoptotik DAD1 enzimini kodlamaktadır (88). Bu enzimin yokluğu hücreyi apoptoza götürmektedir (88). Bizim bulgularımıza göre DAD1 gen ifadesi nodülde ve PTK-K'da yüksek, yalnızca PTK-F'de düşük olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Bu da PTK-F'deki apoptoza yönelimin diğer dokulara nazaran daha fazla olduğunu akla getirmektedir. PTK için hassas bölge olarak bildirilen bölgelerden bir diğeri de 14q11 bölgesidir (42). DAD1 geni ise 14q11-q12'de yer almaktadır (88). Dolayısıyla, bu genin ifade farklılığının genin kromozomal yerleşimi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Bu anti apoptotik enzimin PTK-F'ye özgün gösterdiği düşüşün daha iyi değerlendirilmesi gerektiği anlaşılmaktadır. İnce bağırsak tümörleri ile ilgili olarak 2008 yılında yapılan bir çalışmada DAD1 geninin tümör oluşumu ile ilgili olabileceği öne sürülmüş; ayrıca özellikle 14q bölgesinde DAD1 geninin LCR (locus control region) bölgesinde en az 0.27 Mb.'lık bir ekleme olduğu gösterilmiştir (89). Diğer birçok bulgu gibi PTK ve DAD1 geni ilişkisi de ilk kez bu çalışmada ortaya konmuştur.

NDUFC2 geni NADH dehidrogenaz (ubiquinone)-1 enziminin alt ünitelerinden birini kodlamaktadır (90). Kolon adenomları ile MSI (microsatellite instability) ilişkisine yönelik bir araştırmada NDUFC2 geninin adenomdan karsinoma dönüşümünde etkisi olabilecek 3 aday genden biri olabileceği öne sürülmüştür (91). Bu çalışmada ise NDUFC2 gen ifadesi kanser grubunda düşük bulunmuştur (Şekil 4.2). Tespit edilen bu düşmenin NADH dehidrogenaz-1 enziminin diğer alt ünitelerinden birini kodlayan bir genin BRAF'ın yer aldığı bölgede bulunması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

BRAF mutasyonlarına PTK'da oldukça sık rastlanılmaktadır (12). Bu kadar sık mutasyon görülen bu genin sağ ve sol komşu genlerinden biri NDUFB2 genidir (92). NDUFB2 geni NADH dehidrogenaz-1 enziminin alt ünitelerinden birini kodlamaktadır (90). NDUF2C2 geninde tespit edilen farklı gen ifadesi NDUFB2 geninde meydana gelen bir genetik değişiklik sonucu, dolaylı bir etki sonucu oluşmuş olabilir. Bu tür dolaylı bir etki gerçekten çok da uzak değildir; zira yapılan başka bir çalışmada NADH dehidrogenaz-1 enziminin alt ünitelerinden NDUFS4'ü kodlayan genin ifade değişimi kullanılarak PTK-F'nin PTK'dan ayrılacağı gösterilmiştir (93). NDUF2C2 geni ve PTK ilişkisi de ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

ZFP36L2 (TIS11D) p53 proteininin etkisine bağlı olarak gen ifadesi artan bir erken uyarı genidir (94). Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre ZFP36L2 gen ifadesi kanser grubunda düşmüş olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde Finley ve ark.'nın (65,68) yaptıkları mikrodizin temelli iki ayrı çalışmada ZFP36L2 gen ifadesinin PTK'da 2.2 kat düştüğü; nodülde ise 2.5 kat arttığını tespit etmişlerdir. Bizim ve Finley ve ark.'nın bulguları beraber olarak değerlendirildiğinde; karsinom içeren dokularda genetik kararsızlığın daha fazla olması nedeni ile p53'e bağlı işlev mekanizmalarında sorun olduğu; nodül içeren dokuda ise nispeten daha az genetik kararsızlığa bağlı olarak p53'e bağlı mekanizmaların daha iyi işlediği akla gelmektedir. Onkogen ve proto-onkogenleri uyaran mutasyonlar tiroid tümör oluşumunda temel bir basamaktır (25,36). Fakat kanser oluşumu için bazı diğer genlerin de bu sürece dâhil olması gerekmektedir (25,36). Örneğin RET veya Ras mutasyonları ile başlatılmış bir tümör ancak bazı ek mutasyonlar ile ilerleyebilecek ve ancak p53 mutasyonu ile tekrardan farklılaşabilecektir. Fakat elde edilen bulgulara göre, nadir durumlarda aynı tümörde birden fazla farklı mutasyon görülmekte ve neticede bu onkogenlerin birbirinin tamamlayıcısı değil alternatif olduğu düşüncesini akla getirmektedir (25,39). ZFP36L2 geni ile ilgili elde edilen tutarlı bulgular bu geni kuvvetli bir aday belirteç olarak kılmaktadır.

Meta analiz çalışmaları, benzer birçok alanda olduğu gibi tiroid kanser araştırmalarında da her geçen gün daha çok önem kazanmaktadır (17). Bu çalışmada elde edilen verilerin teyit edilmesi ve birbiri ile ilişkilerinin tespit edilmesinde Cytoscape arayüz yazılımını kullanan FuncBase veritabanından faydalanılmıştır. Yapılan bu analiz neticesinde

özellikle RPL15 geninin NACA ve RPL7 geni ile doğrudan; NDUFC2 geni ile ise RPL3 ve RPL23 genleri üzerinden etkileşim içerisinde olduğu tespit edilmiştir. RPL7 ve RPL15 proteinleri ribozomal kompleksin 60S alt ünitesi içerisinde yer almaktadırlar (95,96). Ribozomal kompleks içerisinde toplamda 80 farklı protein yer almaktadır (97). Bizim elde ettiğimiz bulgulara göre RPL15 ve NACA gen ifadeleri kanser grubunda düşük; RPL7 gen ifadesi ise yalnızca PTK-F’de düşük olarak bulunmuştur (Şekil 4.8). RPL7’de PTK-F’ye özel değişimin bir benzeri başka araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir. Chevillard ve ark. (93) yaptıkları çalışmada RPL7A’nın PTK-F’yi diğer dokulardan ayırabildiğini göstermişlerdir. Bizim ve diğer araştırmacıların elde ettikleri bulguları NACA, RPL15 ve RPL7 genlerinin aynı sistem içinde yer aldıkları ve yakın ilişki içinde olduklarını göstermektedir. Zira Sertel ve ark.’nın (98) Artesunate adlı antikanser ilacı ile yaptıkları çalışmada da bu ilaçtan etkilenen genler arasında hem RPL7 hem de NACA genini göstermişlerdir. Sertel ve ark.’nın bulguları, Cytoscape analizi ve bizim bulgularımız birbirini desteklemektedir. Bunun haricinde, aynen ZFP36L2 geni gibi NACA ve RPL15 genleri de güçlü PTK aday belirteçleri arasında görünmektedirler.

SET bölgesi içeren proteinler lizin metiltransferaz yani lizin amino asitlerinin metillenmesinde iş görmektedirler (99). Bu işlem genellikle histon proteinlerini kapsamaktadır, ancak p53 gibi histon olmayan istisnai proteinlerde de lizin metiltransferaz enzimleri iş görmektedirler (100). Metillenme işlemi transkripsiyonun ya harekete geçmesini ya da baskılanmasına sebebiyet vermektedir, bu özellikleri ile SET bölgesi içeren proteinler kanser ve gelişimsel süreçlerin birinci derece yürütücüleridir (100,101). SMYD2 geni de lizin metiltransferaz enzimlerinden biridir (99,100). Bu genin p53 proteinindeki Lys370 bölgesini metillediği, dolayısı ile p53 ifadesini baskıladı ve düşük konsantrasyondaki SMYD2 ifadesi ile p53 üzerinden gerçekleşen apoptoz arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (100). Bizim bulgularımız da bu yöndedir, zira bizdeki kanser içeren dokuların tümünde SMYD2 ifadesinin nodüle göre düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.2). Özofögal kanserlerde yapılan bir çalışmada SMYD2’nin hücre yayılımı ile ilişkili olduğu ve SMYD2 ifadesi yüksek hastaların klinik tablolarının daha ağır olduğu gösterilmiştir (102). SMYD2 geni de ZFP36L2 geni

gibi p53 ile ilişkilidir. Yapılan cytoscape analizinde SMYD2 ile p53 ilişkisinin AKAP11 proteini üzerinden; ZFP36L2 ile p53 ilişkisinin ise HIPK1 proteini üzerinden olduğu yani her birinin farklı bir mekanizma yolu ile p53 ile etkileştiği görülmüştür. Bu iki genin p53 ile etkileşim mekanizmalarının ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir.

NACA, ZFP36L2, RPL15, NDUFC2, SMYD2 genleri haricinde EFCAB5, KIAA1671, MPP1, EXOSC7 ve MFF genlerinin ifade değişimleri de kullanılarak PTK içeren ve içermeyen dokular birbirinden ayrılabilir. Bunlardan EFCAB5 geni ile ilgili çok fazla bilginiz olmamakla beraber bu genin FTK ile ilişkisi daha önce gösterilmiştir (103). Çalışmamız PTK ile sınırlı olduğu için devam eden çalışmalarda tüm tiroid kanser tiplerini kapsayan belirteçlerin geliştirilmesinde bu genden de faydalanılabileceği anlaşılmaktadır. Hakkında çok az bilginizin olduğu diğer bir gen de KIAA1671 genidir. Bu gen göğüs kanseri aday belirteçleri arasında gösterilmektedir (104). MPP1 geninin NF2 tümör baskılayıcı proteini (Merlin) ile beraber tümör baskılayıcı yollar içerisinde yer aldığı öne sürülmüştür (105). MPP1 geninin PTK ile ilişkisinin ayrıca ortaya konması gerekmektedir. EXOSC7 geninin skuamoz hücreli servikal kanserler ile ilişkisi daha önce ortaya konmuştur (106). Bizim çalışmamızda da PTK ile ilişkili olduğu ortaya çıkan bu gen ile ilgili olarak daha ayrıntılı çalışmalar gerekmektedir.

Mitokondriyal fizyon ve füzyon arasındaki denge hücrel ve mitokondriyal işlevlerin yerine getirilmesi yönünden hayati önem arz etmektedir (107). Apoptozun erken evrelerinde hücrede mitokondriyal fizyon olduğu yönünde bilgiler her geçen gün artmaktadır (107). MFF proteini mitokondriyal zarın dış kısmına bağlı bir proteindir ve bu proteinin mitokondriyal fizyon başlatıcılarından olduğu yönünde bulgular mevcuttur (108). Bizim çalışmamızda kanser grubunda MFF gen ifadesinin düştüğü bulunmuştur. Bu da, beklenen mitokondriyal fizyonun gerçekleşmesi gerektiği halde gerçekleşmediği dolayısı ile hücrenin apoptoza gitmemiş olabileceğini akla getirmektedir.

Bu çalışmada PSMG1 ve POP1 gen ifadelerinin PTK-K'ya özel bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. P53'ün PSMG1 (PAC1) geninin özendirici (promotor) bölgesindeki palindromik bölgeye bağlanarak bu genin ifadesini kontrol ettiği; PSMG1 ifadesi

düşüğünde p53'e bağlı apoptozun azaldığı, arttığında ise p53'e bağlı apoptozun arttığı daha önce gösterilmiştir (109). Özellikle ARPP19, PPP1R16A, RPL7, BCL6, LOC284440, DAD1, MCM3, IK ve SEPT7 gibi genlerdeki ifade değişiminin PTK-F'ye özel olduğu bulgusundan yola çıkarak PTK-F ve PTK-K'nın farklı gen ifade profillerine sahip oldukları daha önce ifade edilmişti. PSMG1 örneğinde de benzer bir durum olduğu düşünülmektedir. Buradan hareketle PTK-K'da apoptoza yönelimin daha çok PSMG1 geni ile ilişkili olarak; PTK-F'de ise DAD1 geni ile ilişkili olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. PTK-K'nın PTK-F'ye göre daha farklı bir klinik tablo çizmesi apoptoz mekanizmasının farklı işlemesi ile ilişkili olabilir. POP1 geni ile ilgili olarak ise çok fazla bilginiz olmamakla beraber bu gen prostat kanseri belirteçleri arasında daha önce gösterilmiştir (110).

PPP1R16A, RPL7, DAD1 ve MCM3 haricinde SEPT7, IK, BCL6, LOC284440 ve ARPP19 genlerinin de ifadelerinde PTK-F'ye özel bir düşme tespit edilmiştir (Şekil 4.8, 4.9). SEPT7 geni de MCM3 geni gibi hücre döngüsü ile doğrudan ilişkili bir genidir (111). Bu genin hücre bölünmesi sırasında kromozomların düzgün dağılmasında rol aldığı düşünülmektedir (111). Bu genin ifadesinin düşmesi ya da artmasının hücre bölünme hızı ile doğru orantılı olduğu görülmektedir. PTK-F'de MCM3 ve SEPT7 gibi hücre döngüsüne yönelik genlerin ifadelerinin düşmesi, daha önce bahsedilen hücrenin farklılaşması dolayısı ile olduğu önermesini destekler mahiyettedir. IK geni de işlevi çok fazla bilinmeyen genler arasındadır. Bu genin transkripsiyonda rol alan düzenleyici bir gen olduğu düşünülmektedir (112). PTK-F'ye özel değişim gözlenen diğer bir gen olan BCL6 geni başka araştırmacılar tarafından ATK ile de ilişkilendirilmiştir (113,114). BCL6 gen ifade seviyesi grafiğine bakıldığında PTK-F'de de kısmen düşüş olduğu görülmektedir (Şekil 4.8). Diğer araştırmacıların tespit ettiği ATK ve BCL6 ilişkisi ile beraber değerlendirildiğinde, EFCAB5 geni gibi bu genin de tiroid karsinomlara özel gen panelleri içerisinde yer alması olasıdır. Çalıştığımız genler içerisinde en az bilgi sahibi olunan gen LOC284440 genidir. Dolayısıyla bu gen ile ilgili yorum yapılamamıştır. ARPP19 gen ürününün PKA (protein kinaz A) tarafından fosforile edildiği gösterilmiştir (115). Fakat bu genin PTK'da ne tür bir etkisi olabileceği bilinmemektedir.

Moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında karşılaşılan engellerden biri de histolojik sınıflandırma kıstaslarının moleküler yapı ile uyum göstermeyişidir. Özellikle foliküler kökenli tümörlerin sınıflandırılmasında kişiden kişiye değişkenlik daha fazla olmaktadır (17). Bu anlamda WHO sınıflandırma kıstaslarının güncellenmesi, moleküler mekanizmaların özellikle de miRNA'ların etkilerinin göz önünde bulundurulmasının faydalı olacağı düşünülmektedir (17).

Mikrodizin teknolojisi tiroid kanser biyolojisinin anlaşılmasında oldukça önemli sonuçlar vermiştir, ancak “çoklu kıyaslama problemi” mikrodizin teknolojisinin önündeki en büyük engellerden biridir (15). Nispeten az sayıda miRNA molekülünün oldukça fazla sayıda ve türde genin ifadesini etkileyebilmeleri nedeni ile, tanısal açıdan miRNA'lar yüksek potansiyele sahiptirler. mRNA'ya kıyasla miRNA'lar çok daha kısa yapıda oldukları için FFPE dokuda daha korunaklı olarak bulunma ve kendilerini muhafaza etme özellikleri ile de ayrıca önem arz etmektedirler (17). Potansiyellerinin fark edilmesine bağlı olarak, tiroid kanser araştırmalarında miRNA temelli çalışma sayısı her geçen gün artmaktadır.

PTK'nın moleküler ayrımında karşılaşılan temel problemlerden biri de elde edilen sonucun İİAB örneğinde teyit edilememesidir (12). Çok az sayıda çalışmada elde edilen bulgular İİAB örneğinde de test edilebilmiştir (12). Translasyon öncesi gen ifadesindeki artış veya azalmanın sadece %40'ı protein ifadesine yansıdığı öne sürülmüştür (17,116). Bu nedenle elde edilen gen ifadesine dayalı bilginin protein tarafına yansımalarının da bir şekilde teyit edilmesi önem arz etmektedir.

İyi huylu olduğu görünen yayılım göstermeyen bir nodülün cerrahi operasyon ile alınması tümörün doğal seyirinin önüne geçilmesi olduğundan, eğer alınmasa idi ileride bu neoplazinin saldırgan bir tümöre dönüşüp dönüşmeyeceğini bugün itibarı ile bilmemekteyiz (17). Elde edilen bulgularımıza göre PTK-F ve PTK-K arasında moleküler kimlik yönünden farklılıklar bulunmaktadır. Bunların ne anlama geldiği veya değişim/dönüşüm yönünden bir ilişkilerinin olup olmadığı da bilinmemektedir. Yine elde edilen verilere göre belli kromozomal bölgeler öne çıkmaktadır. Fakat bu bölgelerin tiroid karsinomlara özel bir haritası henüz çıkarılmamış olduğu gibi neden

bazı bölgelerin öne çıktığı da bilinmemektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler değerlendirildiğinde; uyarı-ileti sistemi, hücre döngüsü ve epigenetik faktörlerin PTK'da etkili olduğu görünmektedir.

6 KAYNAKLAR

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008 Mar-Apr;58(2):71-96.
2. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, 2004-2006 Yılları Türkiye Kanser İnsidansı, <http://www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON.pdf>, Erişim tarihi: 10 Mayıs 2010
3. García-Jiménez C, Santisteban P. TSH signalling and cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Jul;51(5):654-71.
4. Montero-Conde C, Martín-Campos JM, Lerma E, Gimenez G, Martínez-Guitarte JL, Combalía N, Montaner D, Matías-Guiu X, Dopazo J, de Leiva A, Robledo M, Mauricio D. Molecular profiling related to poor prognosis in thyroid carcinoma. Combining gene expression data and biological information. *Oncogene.* 2008 Mar 6;27(11):1554-61.
5. Reis EM, Ojopi EP, Alberto FL, Rahal P, Tsukumo F, Mancini UM, Guimarães GS, Thompson GM, Camacho C, Miracca E, Carvalho AL, Machado AA, Paquola AC, Cerutti JM, da Silva AM, Pereira GG, Valentini SR, Nagai MA, Kowalski LP, Verjovski-Almeida S, Tajara EH, Dias-Neto E, Bengtson MH, Canevari RA, Carazzolle MF, Colin C, Costa FF, Costa MC, Estécio MR, Esteves LI, Federico MH, Guimarães PE, Hackel C, Kimura ET, Leoni SG, Maciel RM, Maistro S, Mangone FR, Massirer KB, Matsuo SE, Nobrega FG, Nóbrega MP, Nunes DN, Nunes F, Pandolfi JR, Pardini MI, Pasini FS, Peres T, Rainho CA, dos Reis PP, Rodrigues-Lisoni FC, Rogatto SR, dos Santos A, dos Santos PC, Sogayar MC, Zanelli CF; Head and Neck Annotation Consortium. Large-scale transcriptome analyses reveal new genetic marker candidates of head, neck, and thyroid cancer. *Cancer Res.* 2005 Mar 1;65(5):1693-9.
6. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA.* 2006 May 10;295(18):2164-7.
7. Koloğlu S. Ed. *Endokrinoloji Temel ve Klinik*, 1. Baskı, İstanbul: Medical Network; 1996.
8. Fagin JA, Mitsiades N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008 Dec;22(6):955-69.
9. Greco A, Borrello MG, Miranda C, Degl'Innocenti D, Pierotti MA. Molecular pathology of differentiated thyroid cancer. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2009 Oct;53(5):440-53.
10. Kato MA, Fahey TJ 3rd. Molecular markers in thyroid cancer diagnostics. *Surg Clin North Am.* 2009 Oct;89(5):1139-55.

11. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, 2007, Robbins Basic Pathology. Robbins Temel Patoloji, 8. baskı, Ed. Çevikbaş U, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2008: 765-771.
12. Shibru D, Chung KW, Kebebew E. Recent developments in the clinical application of thyroid cancer biomarkers. *Curr Opin Oncol.* 2008 Jan;20(1):13-8.
13. Barden CB, Shister KW, Zhu B, Guiter G, Greenblatt DY, Zeiger MA, Fahey TJ 3rd. Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling. *Clin Cancer Res.* 2003 May;9(5):1792-800.
14. Ringel MD. Molecular markers of aggressiveness of thyroid cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009 Oct;16(5):361-6.
15. Eszlinger M, Krohn K, Kukulska A, Jarzab B, Paschke R. Perspectives and limitations of microarray-based gene expression profiling of thyroid tumors. *Endocr Rev.* 2007 May;28(3):322-38.
16. Handkiewicz-Junak D, Czarniecka A, Jarzab B. Molecular prognostic markers in papillary and follicular thyroid cancer: Current status and future directions. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Jun 30;322(1-2):8-28.
17. Eszlinger M, Krohn K, Hauptmann S, Dralle H, Giordano TJ, Paschke R. Perspectives for improved and more accurate classification of thyroid epithelial tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Sep;93(9):3286-94.
18. Lee KY, Huang SM, Li S, Kim JM. Identification of differentially expressed genes in papillary thyroid cancers. *Yonsei Med J.* 2009 Feb 28;50(1):60-7.
19. Eszlinger M, Wiench M, Jarzab B, Krohn K, Beck M, Läuter J, Gubała E, Fajarewicz K, Swierniak A, Paschke R. Meta- and reanalysis of gene expression profiles of hot and cold thyroid nodules and papillary thyroid carcinoma for gene groups. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 May;91(5):1934-42.
20. Jean D. Wilson, Daniel W. Foster. Eds. Williams Textbook of Endocrinology, 8th Ed, Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p. 390-515.
21. Greenspan FS, Strewler GJ. Eds. Basic&Clinical Endocrinology, 5th Ed, Stamford: Prentice-Hall Int; 1997. p. 192-259.
22. <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/thyroid>, Erişim tarihi: 10 Mayıs 2010
23. Nussey S, Whitehead SA. eds. Endocrinology: an integrated approach :BIOS Scientific Publishers Ltd;2001.
24. <http://www.histol.chuvashia.com/images/endocrine/thyroid-01-l.jpg>, Erişim tarihi: 13 Mayıs 2010
25. Salabè GB. Pathogenesis of thyroid nodules: histological classification? *Biomed Pharmacother.* 2001 Feb;55(1):39-53.
26. <http://library.med.utah.edu/WebPath/ENDOHTML/ENDO024.html>, Erişim tarihi: 11 Mayıs 2010
27. Sheu SY, Grabellus F, Schwertheim S, Worm K, Broecker-Preuss M, Schmid KW. Differential miRNA expression profiles in variants of papillary thyroid carcinoma

- and encapsulated follicular thyroid tumours. *Br J Cancer*. 2010 Jan 19;102(2):376-82.
28. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4c/Psammoma.jpg>, Erişim tarihi: 10 Mayıs 2010
 29. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/9f/Thyroid_papillary_carcinoma_histopatholgy_%281%29.jpg/796px-Thyroid_papillary_carcinoma_histopatholgy_%281%29.jpg, Erişim tarihi: 31 Mayıs 2010
 30. <http://img.medscape.com/pi/emed/ckb/endocrinology/116364-138560-127491-1699224.jpg>, Erişim tarihi: 10 Mayıs 2010
 31. Alsanea O, Clark OH. Familial thyroid cancer. *Curr Opin Oncol*. 2001 Jan;13(1):44-51.
 32. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Eds. *Molecular Biology of The Cell*, 4th Ed, New York: Garland Science; 2002. p 983-1026.
 33. <http://www.treatgene.com/wp-content/uploads/2009/10/cellcycle3.jpg>, Erişim tarihi: 10 Mayıs 2010
 34. Giaginis C, Vgenopoulou S, Vielh P, Theocharis S. MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol Histopathol*. 2010 Mar;25(3):351-70.
 35. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Eds. *Molecular Biology of The Cell*, 4th Ed, New York: Garland Science; 2002. p 1313-1361.
 36. Zhang P, Zuo H, Ozaki T, Nakagomi N, Kakudo K. Cancer stem cell hypothesis in thyroid cancer. *Pathol Int*. 2006 Sep;56(9):485-9.
 37. Thomas GA, Williams D, Williams ED. Clonal origin of thyroid tumours. In: Wynford-Thomas D, Williams ED, Eds. *Williams ED Wynford-Thomas D. Thyroid tumours*. Edinburg : Churchill Livingstone, 1989, s. 38-56.
 38. Peter HJ, Gerber H, Studer H, Smeds S. Pathogenesis of heterogeneity in human multinodular goiter. A study on growth and function of thyroid tissue transplanted onto nude mice. *J Clin Invest*. 1985 Nov;76(5):1992-2002.
 39. Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol*. 2008 May;21 Suppl 2:S37-43.
 40. Takano T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: a hypothesis for better understanding of gene expression profile and genomic alternation in thyroid carcinoma. *Endocr J*. 2004 Dec;51(6):509-15.
 41. Kouniavsky G, Zeiger MA. Thyroid tumorigenesis and molecular markers in thyroid cancer. *Curr Opin Oncol*. 2010 Jan;22(1):23-9.
 42. He H, Nagy R, Liyanarachchi S, Jiao H, Li W, Suster S, Kere J, de la Chapelle A. A susceptibility locus for papillary thyroid carcinoma on chromosome 8q24. *Cancer Res*. 2009 Jan 15;69(2):625-31.

43. Dardano A, Falzoni S, Caraccio N, Polini A, Tognini S, Solini A, Berti P, Di Virgilio F, Monzani F. 1513A>C polymorphism in the P2X7 receptor gene in patients with papillary thyroid cancer: correlation with histological variants and clinical parameters. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Feb;94(2):695-8.
44. García-Rostán G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ, Herrero A, Fusco A, Cameselle-Teijeiro J, Santoro M. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res.* 2005 Nov 15;65(22):10199-207.
45. Gómez Saez JM. Diagnostic usefulness of tumor markers in the thyroid cytological samples extracted by fine-needle aspiration biopsy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2010 Mar 1;10(1):47-56.
46. Mizuno T, Kyoizumi S, Suzuki T, Iwamoto KS, Seyama T. Continued expression of a tissue specific activated oncogene in the early steps of radiation-induced human thyroid carcinogenesis. *Oncogene.* 1997 Sep 18;15(12):1455-60.
47. Sahin M, Allard BL, Yates M, Powell JG, Wang XL, Hay ID, Zhao Y, Goellner JR, Sebo TJ, Grebe SK, Eberhardt NL, McIver B. PPARgamma staining as a surrogate for PAX8/PPARgamma fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Jan;90(1):463-8.
48. Arora N, Scognamiglio T, Lubitz CC, Moo TA, Kato MA, Zhu B, Zarnegar R, Chen YT, Fahey TJ 3rd. Identification of borderline thyroid tumors by gene expression array analysis. *Cancer.* 2009 Dec 1;115(23):5421-31.
49. Bartolazzi A, Orlandi F, Saggiorato E, Volante M, Arecco F, Rossetto R, Palestini N, Ghigo E, Papotti M, Bussolati G, Martegani MP, Pantellini F, Carpi A, Giovagnoli MR, Monti S, Toscano V, Sciacchitano S, Pennelli GM, Mian C, Pelizzo MR, Rugge M, Troncone G, Palombini L, Chiappetta G, Botti G, Vecchione A, Bellocco R; Italian Thyroid Cancer Study Group (ITCSG). Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study. *Lancet Oncol.* 2008 Jun;9(6):543-9.
50. van Hoesven KH, Kovatich AJ. Immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen, BCL2, and Ki-67 in vulvar tissues. *Int J Gynecol Pathol.* 1996 Jan;15(1):10-6.
51. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.* 1985 Dec;43(2 Pt 1):405-13.
52. Kirkpatrick KL, Mokbel K. The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2001 Dec;27(8):754-60.
53. Wiseman SM, Melck A, Masoudi H, Ghaidi F, Goldstein L, Gown A, Jones SJ, Griffith OL. Molecular phenotyping of thyroid tumors identifies a marker panel for differentiated thyroid cancer diagnosis. *Ann Surg Oncol.* 2008 Oct;15(10):2811-26.
54. Rossi ED, Raffaelli M, Mule' A, Miraglia A, Lombardi CP, Vecchio FM, Fadda G. Simultaneous immunohistochemical expression of HBME-1 and galectin-3

- differentiates papillary carcinomas from hyperfunctioning lesions of the thyroid. *Histopathology*. 2006 Jun;48(7):795-800.
55. Saggiorato E, De Pompa R, Volante M, Cappia S, Arecco F, Dei Tos AP, Orlandi F, Papotti M. Characterization of thyroid 'follicular neoplasms' in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Jun;12(2):305-17.
 56. Scognamiglio T, Hyjek E, Kao J, Chen YT. Diagnostic usefulness of HBME1, galectin-3, CK19, and CITED1 and evaluation of their expression in encapsulated lesions with questionable features of papillary thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2006 Nov;126(5):700-8.
 57. Nga ME, Lim GS, Soh CH, Kumarasinghe MP. HBME-1 and CK19 are highly discriminatory in the cytological diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Diagn Cytopathol*. 2008 Aug;36(8):550-6.
 58. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
 59. <http://www.mirbase.org/cgi-bin/query.pl?terms=Human>, Erişim tarihi: 16 Nisan 2010
 60. Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Sep;91(9):3584-91.
 61. Visone R, Pallante P, Vecchione A, Cirombella R, Ferracin M, Ferraro A, Volinia S, Coluzzi S, Leone V, Borbone E, Liu CG, Petrocca F, Troncone G, Calin GA, Scarpa A, Colato C, Tallini G, Santoro M, Croce CM, Fusco A. Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene*. 2007 Nov 29;26(54):7590-5.
 62. Chen YT, Kitabayashi N, Zhou XK, Fahey TJ 3rd, Scognamiglio T. MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2008 Sep;21(9):1139-46.
 63. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Oct 27;353(17):1793-801. Erratum in: *N Engl J Med*. 2006 Aug 3;355(5):533.
 64. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi V, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, de la Chapelle A. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 18;98(26):15044-9.
 65. Finley DJ, Zhu B, Barden CB, Fahey TJ 3rd. Discrimination of benign and malignant thyroid nodules by molecular profiling. *Ann Surg*. 2004 Sep;240(3):425-36; discussion 436-7.

66. Mazzanti C, Zeiger MA, Costouros NG, Umbricht C, Westra WH, Smith D, Somervell H, Bevilacqua G, Alexander HR, Libutti SK. Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors. *Cancer Res.* 2004 Apr 15;64(8):2898-903. Erratum in: *Cancer Res.* 2004 Jul 15;64(14):5028.
67. Weber F, Shen L, Aldred MA, Morrison CD, Frilling A, Saji M, Schuppert F, Broelsch CE, Ringel MD, Eng C. Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on a three-gene combination. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 May;90(5):2512-21.
68. Finley DJ, Arora N, Zhu B, Gallagher L, Fahey TJ 3rd. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7):3214-23.
69. Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A. Diagnostic and prognostic value of cell-cycle regulatory genes in malignant thyroid neoplasms. *World J Surg.* 2006 May;30(5):767-74.
70. Kebebew E, Peng M, Reiff E, McMillan A. Diagnostic and extent of disease multigene assay for malignant thyroid neoplasms. *Cancer.* 2006 Jun 15;106(12):2592-7.
71. Liang P, Pardee AB. Analysing differential gene expression in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 Nov;3(11):869-76.
72. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 1992 Aug 14;257(5072):967-71.
73. Chang KC, Komm B, Arnold NB, Korc M. The application of differential display as a gene profiling tool. *Methods Mol Biol.* 2007;383:31-40.
74. Liang P, Pardee AB. Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol.* 1998 Dec;10(3):261-7.
75. Liang P. Factors ensuring successful use of differential display. *Methods.* 1998 Dec;16(4):361-4.
76. Sambrook J, Russel D. Eds. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3rd Ed, CSHL Press, 2001. p.12.74-75.
77. <http://lukemiller.org/journal/2007/08/quantifying-western-blots-without.html>, Erişim tarihi: 15 Nisan 2010
78. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997 Sep 1;25(17):3389-402.
79. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003 Nov;13(11):2498-504.
80. Liang P, Pardee AB. Recent advances in differential display. *Curr Opin Immunol.* 1995 Apr;7(2):274-80.

81. Lee YS, Ha SA, Kim HJ, Shin SM, Kim HK, Kim S, Kang CS, Lee KY, Hong OK, Lee SH, Kwon HS, Cha BY, Kim JW. Minichromosome maintenance protein 3 is a candidate proliferation marker in papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2010 Feb;88(1):138-42.
82. Madine MA, Swietlik M, Pelizon C, Romanowski P, Mills AD, Laskey RA. The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. *J Struct Biol*. 2000 Apr;129(2-3):198-210.
83. Musahl C, Holthoff HP, Lesch R, Knippers R. Stability of the replicative Mcm3 protein in proliferating and differentiating human cells. *Exp Cell Res*. 1998 May 25;241(1):260-4.
84. Sueyoshi T, Moore R, Sugatani J, Matsumura Y, Negishi M. PPP1R16A, the membrane subunit of protein phosphatase 1beta, signals nuclear translocation of the nuclear receptor constitutive active/androstane receptor. *Mol Pharmacol*. 2008 Apr;73(4):1113-21.
85. Lauring B, Sakai H, Kreibich G, Wiedmann M. Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5411-5. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Aug 15;92(17):8088.
86. Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA, Antonarakis SE. Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels*. 1998;5(6):347-54.
87. Yotov WV, St-Arnaud R. Mapping of the human gene for the alpha-NAC/1.9.2 (NACA/1.9.2) transcriptional coactivator to Chromosome 12q23-24.1. *Mamm Genome*. 1996 Feb;7(2):163-4.
88. Yulug IG, See CG, Fisher EM, Ylug IG. The DAD1 protein, whose defect causes apoptotic cell death, maps to human chromosome 14. *Genomics*. 1995 Mar 20;26(2):433-5. Erratum in: *Genomics* 1995 Jul 1;28(1):129.
89. Kulke MH, Freed E, Chiang DY, Philips J, Zahrieh D, Glickman JN, Shivdasani RA. High-resolution analysis of genetic alterations in small bowel carcinoid tumors reveals areas of recurrent amplification and loss. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008 Jul;47(7):591-603.
90. Loeffen JL, Triepels RH, van den Heuvel LP, Schuelke M, Buskens CA, Smeets RJ, Trijbels JM, Smeitink JA. cDNA of eight nuclear encoded subunits of NADH:ubiquinone oxidoreductase: human complex I cDNA characterization completed. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Dec 18;253(2):415-22.
91. Woerner SM, Kloor M, Mueller A, Rueschoff J, Friedrichs N, Buettner R, Buzello M, Kienle P, Knaebel HP, Kunstmann E, Pagenstecher C, Schackert HK, Möslein G, Vogelsang H, von Knebel Doeberitz M, Gebert JF; German HNPCC Consortium. Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas. *Oncogene*. 2005 Apr 7;24(15):2525-35.
92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4708>, Erişim tarihi: 15 Mayıs 2010

93. Chevillard S, Ugolin N, Vielh P, Ory K, Levalois C, Elliott D, Clayman GL, El-Naggar AK. Gene expression profiling of differentiated thyroid neoplasms: diagnostic and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2004 Oct 1;10(19):6586-97.
94. Jackson RS 2nd, Cho YJ, Liang P. TIS11D is a candidate pro-apoptotic p53 target gene. *Cell Cycle.* 2006 Dec;5(24):2889-93.
95. Lin A, Chan YL, McNally J, Peleg D, Meyuhas O, Wool IG. The primary structure of rat ribosomal protein L7. The presence near the amino terminus of L7 of five tandem repeats of a sequence of 12 amino acids. *J Biol Chem.* 1987 Sep 15;262(26):12665-71.
96. Thompson MD, Jacks CM, Lenvik TR, Gantt JS. Characterization of rps17, rp19 and rpl15: three nucleus-encoded plastid ribosomal protein genes. *Plant Mol Biol.* 1992 Mar;18(5):931-44.
97. Wool IG. The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annu Rev Biochem.* 1979;48:719-54.
98. Sertel S, Eichhorn T, Sieber S, Sauer A, Weiss J, Plinkert PK, Efferth T. Factors determining sensitivity or resistance of tumor cell lines towards artesunate. *Chem Biol Interact.* 2010 Apr 15;185(1):42-52.
99. Yeates TO. Structures of SET domain proteins: protein lysine methyltransferases make their mark. *Cell.* 2002 Oct 4;111(1):5-7.
100. Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, Kubicek S, Opravil S, Jenuwein T, Berger SL. Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature.* 2006 Nov 30;444(7119):629-32.
101. Brown MA, Sims RJ 3rd, Gottlieb PD, Tucker PW. Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol Cancer.* 2006 Jun 28;5:26.
102. Komatsu S, Imoto I, Tsuda H, Kozaki KI, Muramatsu T, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Ichikawa D, Otsuji E, Inazawa J. Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2009 Jul;30(7):1139-46.
103. Hinsch N, Frank M, Döring C, Vorländer C, Hansmann ML. QPRT: a potential marker for follicular thyroid carcinoma including minimal invasive variant; a gene expression, RNA and immunohistochemical study. *BMC Cancer.* 2009 Mar 26;9:93.
104. Fernández-Madrid F, Tang N, Alansari H, Granda JL, Tait L, Amirikia KC, Moroianu M, Wang X, Karvonen RL. Autoantibodies to Annexin XI-A and Other Autoantigens in the Diagnosis of Breast Cancer. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5089-96. Erratum in: *Cancer Res.* 2006 May 15;66(10):5526.
105. Seo PS, Quinn BJ, Khan AA, Zeng L, Takoudis CG, Hanada T, Bolis A, Bolino A, Chishti AH. Identification of erythrocyte p55/MPP1 as a binding partner of NF2 tumor suppressor protein/Merlin. *Exp Biol Med (Maywood).* 2009 Mar;234(3):255-62.

106. Choi YW, Bae SM, Kim YW, Lee HN, Kim YW, Park TC, Ro DY, Shin JC, Shin SJ, Seo JS, Ahn WS. Gene expression profiles in squamous cell cervical carcinoma using array-based comparative genomic hybridization analysis. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 May-Jun;17(3):687-96.
107. Bossy-Wetzell E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Dec;15(6):706-16.
108. Gandre-Babbe S, van der Blik AM. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2008 Jun;19(6):2402-12. Epub 2008 Mar 19.
109. Yin Y, Liu YX, Jin YJ, Hall EJ, Barrett JC. PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. *Nature*. 2003 Apr 3;422(6931):527-31.
110. Romanuik TL, Ueda T, Le N, Haile S, Yong TM, Thomson T, Vessella RL, Sadar MD. Novel biomarkers for prostate cancer including noncoding transcripts. *Am J Pathol*. 2009 Dec;175(6):2264-76.
111. Zhu M, Wang F, Yan F, Yao PY, Du J, Gao X, Wang X, Wu Q, Ward T, Li J, Kioko S, Hu R, Xie W, Ding X, Yao X. Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *J Biol Chem*. 2008 Jul 4;283(27):18916-25.
112. Assier E, Bouzinba-Segard H, Stolzenberg MC, Stephens R, Bardos J, Freemont P, Charron D, Trowsdale J, Rich T. Isolation, sequencing and expression of RED, a novel human gene encoding an acidic-basic dipeptide repeat. *Gene*. 1999 Apr 16;230(2):145-54.
113. Smallridge RC, Marlow LA, Copland JA. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Mar;16(1):17-44.
114. Rodrigues RF, Roque L, Rosa-Santos J, Cid O, Soares J. Chromosomal imbalances associated with anaplastic transformation of follicular thyroid carcinomas. *Br J Cancer*. 2004 Jan 26;90(2):492-6.
115. Dulubova I, Horiuchi A, Snyder GL, Girault JA, Czernik AJ, Shao L, Ramabhadran R, Greengard P, Nairn AC. ARPP-16/ARPP-19: a highly conserved family of cAMP-regulated phosphoproteins. *J Neurochem*. 2001 Apr;77(1):229-38.
116. Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ, Yi EC, Dai H, Thorsson V, Eng J, Goodlett D, Berger JP, Gunter B, Linseley PS, Stoughton RB, Aebersold R, Collins SJ, Hanlon WA, Hood LE. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Oct;3(10):960-9.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında İzmir’de doğdu. Ortaöğrenimini Samsun Anadolu Lisesi’nde tamamladı. Lisans eğitimini Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Kimya Bölümü’nde 2001 yılında, Yüksek Lisans Eğitimi’ni ise Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda “*Gebelikte serum arginaz seviyesi ile arginaz gen çokyapılılığı arasındaki ilişkinin araştırılması*” konulu tez çalışması ile 2004 yılında tamamladı. Ardından, 2004 yılında aynı anabilim dalında doktora eğitimine başlayan Yusuf Ziya İĞCİ İngilizce bilmekte; evli ve 1 çocuk babasıdır.

