



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL KANSERLERDE *MACC1*,*MET* VE
NM23-H1 GEN EKSPRESYONLARININ PROGNOZLA
İLİŞKİSİ**

Dr. Serkan CEYLAN

UZMANLIK TEZİ

Bursa – 2015



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**KOLOREKTAL KANSERLERDE *MACC1*,*MET* VE
NM23-H1 GEN EKSPRESYONLARININ PROGNOZLA
İLİŞKİSİ**

Dr. Serkan CEYLAN

Danışman: Doç.Dr.Ersin ÖZTÜRK

UZMANLIK TEZİ

Bursa – 2015

İÇİNDEKİLER

Özet	ii
Summary	iv
Giriş	1
Gereç ve yöntem	22
Bulgular	31
Tartışma ve sonuç	40
Kaynaklar	46
Teşekkür	49
Özgeçmiş	50

ÖZET

Kolorektal kanser, dünyadaki en büyük sağlık problemlerinden biridir. Tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen kolorektal kanserler, kansere bağlı ölümlerin %10'unu oluşturmaktadır. Son dönemde çeşitli populasyonlarda yapılan çalışmalar ile *MACC1*, *MET* ve *NM23-H1* genlerinin kolorektal kanser tümörlerinde nüks ve metastaz potansiyeli ile ilişkili oldukları belirlenmiştir.

Çalışmada, Türk populasyonuna ait, aile hikayesi bulunmayan kolorektal kanser hastalarının tümör dokularında metastaz gelişiminde etkili olduğu bilinen *MACC1*, *MET* ve *NM23-H1* genlerinin ekspresyon profilleri incelendi. Elde edilen veriler, web tabanlı Sabiosciences PCR-Data Analiz (RT² profiler PCR array data analysis version 3.5) programından yararlanılarak değerlendirildi. Değerlendirilen hasta grubunun tümör dokuları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, *MACC1* ve *MET* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış, *NM23-H1* geninin ekspresyon seviyesinde ise anlamlı düşüş belirlendi ($p < 0.05$). 5 yıllık takip süresi bilinen hastalar çalışmaya dahil edildi. Bu süre içerisinde nüks ve uzak metastaz gözlenen hastalara ait tümör dokularında, metastaz görülmeyen hastaların tümör dokularına göre, *MACC1* ekspresyon seviyesi 6.07 kat, *MET*' in ekspresyon seviyesinin ise 2.70 kat arttığı, *NM23-H1*' in ekspresyonunun ise 6.21 kat düştüğü belirlendi. Üç genin de istatistiksel olarak anlamlı p değerlerine sahip olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda sadece evre II tümörleri içerisinde uzak metastaz ya da nüks potansiyeline göre gruplandırılan hasta tümör dokularında *MACC1*, 5 yıl süre içerisinde metastaz geliştiren evre II hastalarında yüksek ekspresyon gösterdi.

Mevcut bulgular, bu hastaların tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesine katkı oluşturarak hastalara ait yaşam süresinin ve kalitesinin iyileştirilmesine imkan sağlayacaktır. Ayrıca elde edilen bulguların Türk populasyonuna ait bu hastalarda, kötü prognozun takibini sağlayabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi konusunda uluslararası ve ulusal literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kolorektal kanser, gen ekspresyonu, erken evre,
RT-PCR

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is one of the major health problems worldwide. Despite progress in diagnosis and treatment, CRC account for nearly 10% of global cancer-related mortality (1). Recent studies In different populations, Metastasis-associated in colon cancer-1 (*MACC1*) (6,7), the hepatocyte growth factor (HGF)/mesenchymal-epithelial transition factor (*cMET*) (6) and NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1 (*NM23-H1*) are highlighted for their prognostic value in predicting recurrence and metastasis of CRC tumors (8,9).

In this study, *MACC1*, *MET* and *MACC1* gene's expression profiles which thought to have effects on colorectal cancer are investigated. Expression profiles of these genes were evaluated for non-familial and early-onset colorectal tumor and non-tumor tissues of Turkish patients. Data, gathered from study, evaluated by web based Sabiosciences PCR-Data Analyze (RT² profiler PCR array data analysis version 3.5). When sorting these genes based on the fold change in expression between the groups, *MACC1* and *MET* were expressed at significantly higher levels in the tumor, whereas *NM23-H1* was expressed at lower levels in the tumor samples compared to the normal mucosa samples. Depend on distant metastasis occurrence in 5 year follow-up period between cases who were stage I –III at the time of diagnosis. We found that *MACC1* and *MET* expressions were 6.07 and 2.70 fold up-regulated and *NM23-H1* was 6.21 fold down-regulated in cases who developed distance metastasis in 5 years. In comparison to stage II tumors depend on distant metastasis occurrence in 5 year, *MACC1* expression was 3.07 fold induced in cases who developed distant metastasis ($p = 0.004$).

These data will be beneficial to obtain information about aggressiveness of tumor and metastasis risk in early onset, non-familial colorectal cancer patients. In addition, these results will contribute similar therapy approaches in other colorectal cancer patients, thus, patient's

survival rates and quality of their life may be improved. Moreover, our findings will be useful for the determination of biomarkers on the follow-up of poor prognosis in Turkish colorectal cancer patients that could contribute to the international and national literature.

Key words: Colorectal Cancer, gene expression, early stages, RT-PCR

GİRİŞ

Kolorektal kanserler, genetik ve epigenetik değişimlerin birikimi sonucunda meydana gelmektedir (1). Günümüzde moleküler biyolojinin gelişmesiyle karsinogenez sürecinin ve tümör gelişiminde rol oynayan moleküler değişikliklerin daha iyi anlaşılması için yeni prognostik belirteçler ve terapötik hedefler araştırılmaktadır. Genom projesinin tamamlanması ile beraber kolorektal kanser gelişiminde etkili olan genler tanımlanmakta ve bu genlerin görev aldıkları sinyal yolları belirlenmektedir. Kolorektal kanserin en önemli özelliği hastaların çoğunda uzak metastaz varlığıdır. Kolorektal kanserin ilk gelişim evrelerine ait spesifik belirtiler bulunmamakta olup yavaş ilerleyen kanser tipine örnektir. Bu nedenle hastaların büyük bir kısmında tanı sırasında uzak metastaz gözlenmektedir. Araştırmalar karsinogenezle ilişkili genleri tanımlıyor olsa da metastaz yapabilme yeteneğinde olan kanser hücrelerinde meydana gelen değişiklikler büyük ölçüde bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar ile gen ekspresyon profillerinin populasyonlar arası farklılık gösterdiği ifade edilmektedir (2).

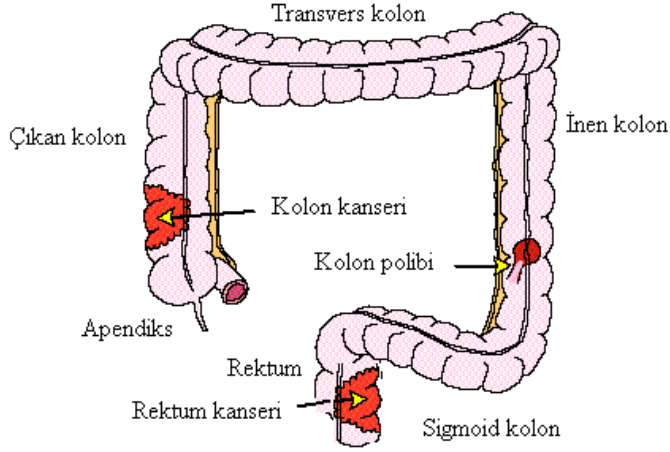
Ülkemizde sıklıkla karşılaşılan ve ölümlere neden olan Kolorektal kanserin tanı ve tedavisinde kullanılabilecek biyobelirteçler yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda tanımlanan Metastaz ile ilişkili kolorektal kanser 1 geni (*MACC1*), metastaz geni (*MET*) ve *NM23-H1* genleri metastatik kolorektal kanser tümörlerinin oluşumunda etkili oldukları saptanmıştır (3, 4). Ancak metastatik kolorektal kanser gelişiminde etkisi olduğu bilinen bu genlerin Türk populasyonundaki ekspresyon seviyeleri bilinmemektedir. Bu amaçla planlanan çalışmada, Türk populasyonuna ait, aile hikayesi bulunmayan kolorektal kanser hastalarının tümör dokularında, kolorektal kanser gelişim sürecinde etkili olduğu belirlenen *MACC1*, *MET* ve *NM23-H1* genlerinin ekspresyon profilleri değerlendirildi. Çalışmanın sonucunda, bu populasyona özgü hastalara ait tümörlerde, değerlendirilen bu üç geninde ekspresyon seviyelerinde anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Çalışmanın sonucunda, *MACC1* ve *MET* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki artışın ve

NM23-H1 geninin ekspresyon seviyesindeki azalmanın tümörün metastatik potansiyeli hakkında bilgi verebilecek moleküler belirteçler olabilecekleri önerildi.

I. Kolorektal Kanser

Kolon ve rektumda meydana gelen ve gastrointestinal sistem kanserlerinden biri olan Kolorektal kanser, görülme sıklığı bakımından akciğer, meme ve prostat kanserlerinden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (1). Dünya sağlık örgütü kayıtlarına göre, her yıl, birleşik devletlerde, yaklaşık 160.000 kişi kolorektal kanser tanısı almakta ve hastaların 57.000' den fazlasında bu hastalığa bağlı ölüm gözlenmektedir (2).

Kalın bağırsağın son 15 cm' lik kısmına rektum, kalan kısmına ise kolon adı verilmektedir (Şekil-1). Kolonda ve rektumda meydana gelen tümörlerin risk faktörleri, oluşum sebepleri ve tedavileri aynı olduğu için birlikte anılmakta ve kolorektal tümörler olarak tanımlanmaktadırlar. Bu tümörler, bağırsağın iç kısmında, genellikle polip ismi verilen yapılar şeklinde meydana gelmektedir (2). Hastalığa ait belirtiler çoğunlukla polip oluşumundan sonra başlamaktadır. Rektumdan kan gelmesi, gaitanın kanla bulaşık olması, tuvalete çıkma alışkanlıklarında değişiklikler meydana gelmesi, gaitanın incilmesi, kabızlık ya da ishal durumlarının ortaya çıkması, sık sık tuvalete gitme isteği, karında gaz ağrıları, anemi ve kilo kaybı kolorektal kanserin başlıca belirtileri olmakla beraber bu hastalığa spesifik değildirler (5).



Şekil-1: Kolorektal kanserin meydana geldiği bağırsağın kısımları.

Kolorektal kanser geniş ve farklı coğrafik alanlarda gözlenmektedir. Kanserın görülme oranı, Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya gibi gelişmiş bölgelerde; Afrika, Güney ve Doğu Asya' yı içine alan orta ve düşük gelirli diğer bölgelere oranla daha yüksektir. Bu durum, beslenme alışkanlıkları ile birlikte endüstrileşmiş modern yaşamın gelişmesine bağlanmaktadır. Kolon kanseri ve rektal kanserinin görülme sıklığı genelde paralellik göstermekle birlikte coğrafi farklılık kolon kanserinde daha belirgindir. Kuzey Amerika gibi yüksek riskli bölgelerde kolon kanseri rektal kansere göre iki kat daha sık görülmektedir. Kolorektal kanser görülme sıklığı aynı ülke içinde de yörelere ve topluluklara göre değişim göstermektedir. Bu farklılık diyet ve çevresel faktörlerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Yaş, aile hikayesi, diyet, sigara, aşırı alkol tüketimi, az fiziksel hareket kolorektal kanser tümörlerinin oluşumda etkili olan başlıca risk faktörleridir. 45-50 yaş üzeri kişilerde, anne, baba, kardeş gibi yakın aile bireylerinde kolorektal tümör veya polip olanlarda, rahim, yumurtalık ya da meme kanseri olan kadınlarda, ülseratif kolit veya Crohn gibi hastalıklara sahip bireylerde risk üç kata kadar çıkmaktadır (5, 6). 50 yaş altı tanı almış bireylerin birinci derece yakınlarında ise risk altı kat artmaktadır (7).

Kolorektal kanser sporadik ya da ailesel olarak meydana gelmektedir. Kalıtsal olarak meydana gelen kolorektal tümörlerin gelişiminde, Ailesel adenomatöz polipozis (FAP), Atenüe ailesel polipozis (AFAP) (7), Lynch sendromu (HNPCC) (7, 8), MYH ile ilişkili polipozis (MAP) ve Hiperplastik

polipozis olmak üzere farklı sendromlar gözlenmektedir. Bu sendromlar tüm kolorektal kanserlerin yalnızca yaklaşık olarak %15' ini oluşturmaktadır. Kolorektal kanser olgularının büyük bir oranı (% 80-90) sporadik olarak gelişmektedir (9).

Kolorektal kanser Türkiye' de de en yaygın görülen kanserlerden biri olup tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır.

Kolorektal tümörler birçok toplumda geç yaşta oluşmaktadır ve tanı konma yaşı ortalama 60'dır. Ancak ülkemizde sporadik olarak gelişen kolorektal tümörlerin 50 yaş altında görülme oranı diğer toplumlara göre çok daha yüksektir (10). 50 yaş altı hastalarda gelişen kolorektal kanserler genellikle daha ileri evrelerde tespit edilirler, musinöz komponent oranı daha yüksektir ve daha kötü prognoz göstermektedirler.

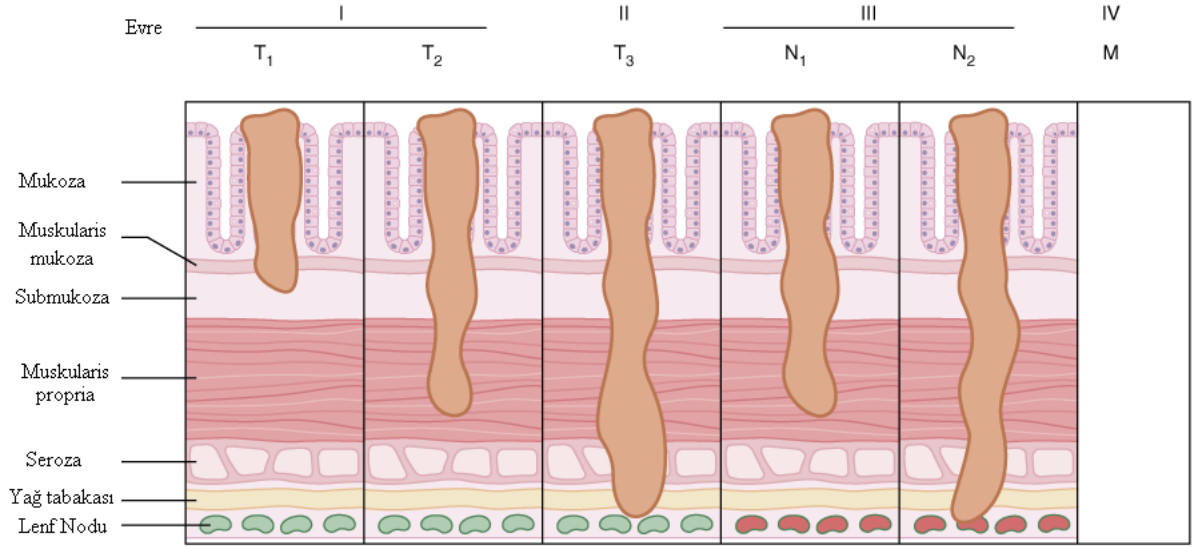
I.A. Kolorektal Kanser Tanı ve Tedavisinde Kullanılan Histopatolojik Evreleme Sistemleri

Kolorektal kanserli hastalarda tümörün evresi, gerek tedavinin belirlenmesinde gerekse tedaviye yanıtta en önemli kriterdir. Bu tümörler genellikle intramukozal epitelyal lezyonlar olarak başlarlar (intramukozal karsinom) ve tümörün gelişmesi ile submukozaya ulaşarak invaziv kanser haline gelirler. Bu aşamadan sonra lokal yayılım yanında lenfatik ve hematojen yayılım da ortaya çıkabilir. Kolon kanserlerinde tümör hücreleri lokal yayılım ile bağırsak boyunca ilerlemekte ve serozoya ulaşmakta ve bu hücreler komşu organlara tutunabilmektedirler. Rektum tümörlerinde ise seroza olmadığı için organ yayılımı daha çok görülmektedir. Aynı zamanda kolorektal tümörleri, perikolik, intermedie ve ana lenf düğümleri aracılığıyla lenfatik yayılım göstermektedirler. Özellikle karaciğerdeki metastatik tümörlerin %80' e yakınında primer odak bir kolorektal tümördür.

Kolorektal kanserlerde bir diğer yayılım yolu da implantasyondur. Bu yolla bağırsak içinde ve periton boşluğunda metastazlar meydana gelebilmektedir. Cerrahi girişim sırasında da batın içine veya karın duvarına

metastaz oluşabilmektedir. Kolorektal kanser tümörlerinde gözlenen bu yayılımlar prognoz açısından son derece önemlidir ve histopatolojik yöntemler ile farklı evreleme sistemleri geliştirilmiştir. Bu amaçla günümüze kadar Dukes, Astler Coller ve Tümör-lenf nodu-metastaz (TNM) olmak üzere üç farklı evreleme sistemi geliştirilmiştir (11). Dukes sınıflaması 1932'de, bir patolog olan Dukes tarafından oluşturulup, yirminci yüzyılın ikinci yarısında standart sınıflandırma olarak kullanılmıştır. Bu sınıflandırma rektal kanser için geliştirilmiş olmasına rağmen kolon kanseri evrelendirilmesinde de yararlanılmıştır. Dukes sistemi, tümör, bağırsak duvarında sınırlı kalmakta ise Evre A, tümör bağırsak duvarını penetre etmekteyse Evre B ya da lenf düğümü metastaz varlığı görülürse evre C şeklinde tanımlanmaktadır. Daha sonra çeşitli eklemeler ile Dukes sınıflandırılması değiştirilmiştir. Değiştirilen sistemde hücrelerin yerleşiminden çok farklılaşan hücre sayısı önemli hale gelmiştir. Yeni Dukes yaklaşımı üç grade içermektedir (G1-G3). G1, çok farklılaşmış tübüller ile az nükleer polimorfizmi ve mitozu, G3 pleomorfik hücre yapısı ve yüksek insidanslı mitozu ifade etmektedir. G2 ise G1 ve G3 arasındaki evreyi oluşturmaktadır. Astler Coller sınıflandırması, Dukes sınıflamasının modifikasyonu ile yapılmış ve A' dan D' ye kategorize edilmiştir (14) A, mukozada sınırlı tümörü, B1, lenf nodu metastazı olmadan muskularis propriaya kadar tümör tutulumunu, B2, lenf nodu metastazı olmadan bağırsak duvarını aşan tümör tutulumunu, C1, bağırsak duvarını aşmamış tümör ile beraber lenf nodu metastazını, C2, bağırsak duvarını aşmış tümör ile beraber lenf nodu metastazını ve D, Uzak organ metastazını göstermektedir. Günümüzde kullanılmakta olan sınıflandırma sistemi ise Amerika Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) tarafından 1987'de geliştirilen ve Uluslar arası Kanseri Birliği (UICC) tarafından onaylanan Tümör-lenf Nodu-Metastaz (TNM) sistemidir. TNM sistemi, bağırsak duvarındaki invazyon derinliğine, bölgesel lenf nodu dağılımına ve uzak organ metastazı mevcudiyetine göre tanımlanmaktadır. İnvazyon derinliği T ile tanımlanmaktadır ve T1' den T4' e doğru artmaktadır. N, lenf nodu metastazını, M ise uzak organda görülen metastazı ifade etmektedir. Bu

sistem günümüzde kolorektal kanserde en yaygın kullanılan patolojik sınıflandırma yöntemidir (Şekil-2, Tablo-1).



Şekil-2: Kolorektal kanser tümörlerinde tanı ve tedavide kullanılan TNM evreleme sistemi.

Tablo-1: Kolorektal kanser tümörlerinde kullanılan TNM sınıflandırması ile Duker sınıflandırmasının karşılaştırılması.

TNM Sınıflandırması				Dukes Sınıflandırması
Evre	T	N	M	Evre
Evre 0	Tis	N0	M0	
Evre 1	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	B1
Evre 2	T3	N0	M0	B2
	T4	N0	M0	B2
Evre 3	T1,T2	N1,N2	M0	C1
	T3,T4	N1,N2	M0	C2
Evre 4	T1-T4	N1-N2	M1	D

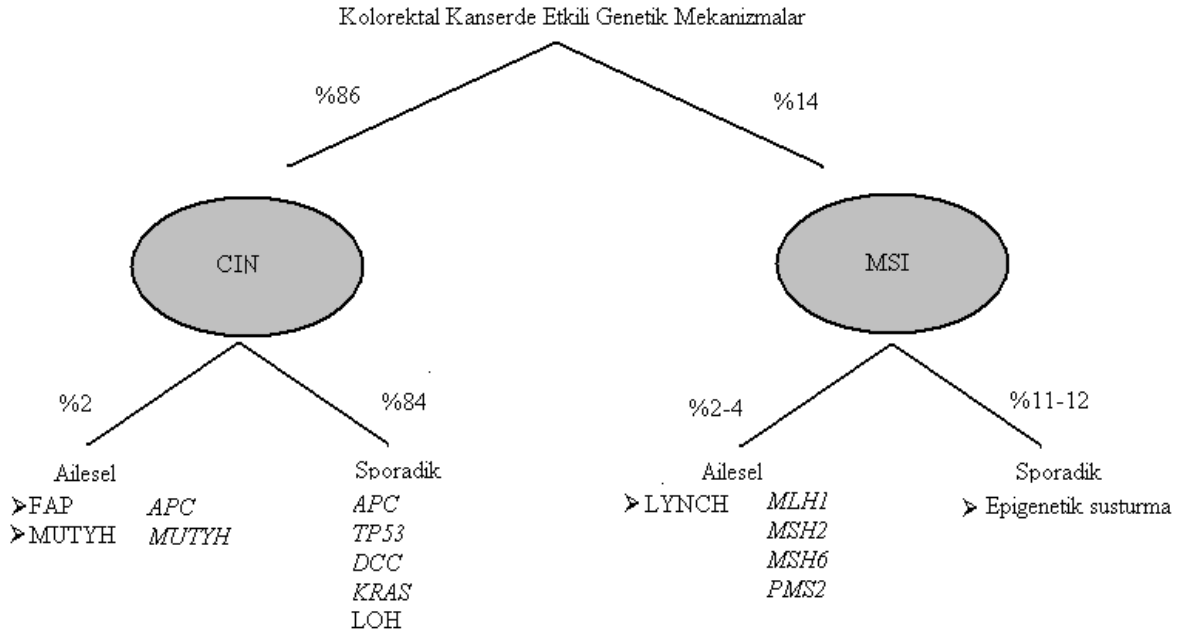
I.B. Kolorektal Kanser Tümörlerinin Oluşum Mekanizmaları

Kolorektal kanser genetik ve epigenetik değişimlerin birikimi sonucu mukozada bulunan normal hücreler invaziv adenokarsinoma dönüşmektedir. Kolorektal kanserde meydana gelen genetik ve epigenetik olaylar kromozomal kararsızlık (CIN), mikrosatellite kararsızlık (MSI), CpG metilasyonları ve geniş çaplı DNA metilasyonları olmak üzere dört ana başlıkta incelenmektedir (2).

I.B.a. Genetik Değişimler

Hücrelerin genetik materyali olan ve tüm hücrel fonksiyonların oluşumunu sağlayan genomun yapısındaki bozulmalar genetik değişimler olarak tanımlanmaktadır. Genom yaklaşık olarak 25.000 genden meydana gelmektedir. Tümör baskılayıcı genler ve onkogenler kanser gelişiminde anahtar rol oynayan gen sınıflarıdır. Normal hücrelerde bu genler, hücre büyümesi, proliferasyon ve apoptoz gibi temel fonksiyonlarda görev almaktadırlar. Bu genlerin aktivasyonları ya da baskılanmaları sonucunda normal hücre tümör hücresine dönüşmektedir (12).

Kolorektal kanser tümörlerinde onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki değişimler ile etkili olan iki temel genetik mekanizma vardır. Kanser gelişiminden önemli rol oynayan tümör baskılayıcı gen inaktivasyon mekanizmalarından biri olan Heterozigosite kaybı (LOH), yine tümör baskılayıcı genler olan Adenomatöz poliposis koli geni (*APC*), *TP53*' ün inaktivasyonu ve *KRAS* gibi onkogenlerin aktivasyonu sonucu meydana gelen kromozomal kararsızlık veya DNA tamir mekanizmalarında yer alan genlerde oluşan değişimler sonucu meydana gelen mikrosatellite kararsızlıktır (Şekil-3) (13,14,15).



Şekil-3 Kolorektal kanser oluşumunda etkili olan genetik mekanizmalar

I.B.a.a. Kromozomal Kararsızlık

Genomik kararsızlığın en yaygın görülen şekli kromozomal kararsızlıktır. Bu mekanizma, hücrelerde, kromozom sayısı ve yapısındaki değişimler sonucu oluşan anöploidi durumunun var olması şeklinde tanımlanmaktadır. CIN kökenli kolorektal tümörlerin büyük bir kısmında, *APC*, *DCC* ve *TP53* gibi tümör baskılayıcı genlerin kaybı ile bazı onkogenlerin aktivasyonu tümör gelişiminde rol oynamaktadır (16). CIN tümörlerinde etkili sinyal yolları, 5q, 18q ve 17p kromozomal kayıpları ile *KRAS* ve *BRAF* genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda aktive olmaktadır ve sporadik kökenli kolorektal tümörlerin büyük bir kısmı bu mekanizma ile oluşmaktadır (17). Bu tümörlerde sitogenetik, moleküler sitogenetik ve flow cytometric olarak tanımlanabilen çeşitli kromozomal değişiklikler ve çoklu yapısal aberasyonlar gözlenmektedir.

I.B.a.b. Mikrosatellite Kararsızlık

Mikrosatellitler, genom içerisinde belli bölgelerde, bir ya da daha fazla bazın yüz defaya kadar tekrar etmesi sonucunda oluşan bölgelerdir. DNA replikasyonuna bağlı hatalar sonucunda bu bölgelerde delesyon ya da insersiyonlar meydana gelmekte ve ilgili bölgenin uzunluğu değişmektedir. Replikasyon hatalarının tanımlanmasında ve düzenlenmesinde *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *MSH3* ve *PMS2* gibi birçok DNA tamir geninin (MMR) görev aldığı mismatch tamir mekanizması rol oynamaktadır. MSI, DNA mismatch tamir genlerinin metilasyon ya da somatik mutasyonlar ile inaktivasyonu sonucunda oluşmaktadır. Kolorektal kanserlerin %15' i MSI mekanizması ile meydana gelmektedir ve bu şekilde oluşan tümörlerin büyük bir kısmı sporadik kökenli olup çok azı aileseldir ve Lynch sendromu ile ilişkilendirilmektedir (7). Lynch sendromlu (herediter non-polyposis kolorektal kanser, HNPCC) bireylerde, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ve *PMS2* genlerinde var olan germ-line mutasyonların varlığı nedeniyle genellikle MSI görülmektedir. Bunun yanında *MLH1* geni promotör bölge metilasyonları sonucunda meydana gelen MSI durumu sonucunda sporadik kolorektal kanserlerde görülmektedir (18).

MSI durumu, kolorektal kanser hastalarının tümör alt tiplerinin sınıflandırılmasında yardımcı olabilmektedir. MSI pozitif tümörlü hastaların mikrosatellit kararsızlık göstermeye (MSS) tümöre sahip hastalara oranla daha iyi prognoza sahip oldukları gösterilmiştir. Yüksek hasta sayısına sahip çalışmada ise sağ kalım oranının MSI hastalarında daha yüksek olduğunu gösterilmiştir. Günümüz rutin uygulamalarda MSI durumunun varlığı, MMR proteinlerinin immünohistokimyasal analizleri ile ve PCR tabanlı testler ile belirlenen MSI durumu prognostik belirteç olarak kullanılmaktadır (19).

I.B.b. Epigenetik Değişimler

Epigenetik değişimler, DNA baz dizisinde herhangi bir değişiklik olmadan, gen ifadesinin düzenlenmesidir. İnsan genomunda bulunan yaklaşık 30.000 gen, belirli hücrelerde ve belirli zamanlarda ifade edilmelidir. Hücreler gen ifadesindeki bu kontrolü sağlayabilmek için bazı genleri aktif bazılarını ise inaktif duruma geçmesi için çeşitli epigenetik mekanizmaları kullanırlar. Gen metilasyonları, Histon modifikasyonları, RNA interferans mekanizmaları ve geniş çaplı DNA metilasyonları epigenetik mekanizmalara örnektir (20,4).

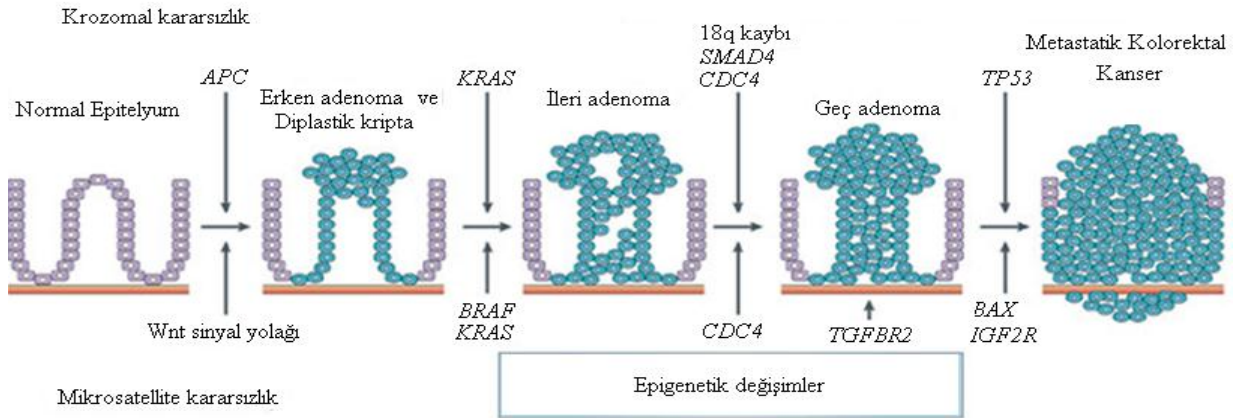
Kolorektal kanser gelişimine neden olan en önemli epigenetik değişim CpG adacıkları içeren promotör gen bölgesinin hipermetilasyonudur. *MLH1* gibi tümör baskılayıcı genlerin CpG adalarında metilasyonların oluşması sonucunda transkripsiyonel inaktivasyon gözlenmektedir. Toyota ve arkadaşları, bu gibi genlerin promotör bölgelerindeki CpG adalarında meydana gelen metilasyonları CIMP mekanizması olarak tanımlamışlardır (21). Bununla birlikte replikasyon tamir genlerinde meydana gelen metilasyonlarda MSI durumuna yol açarak tümör oluşumunu desteklemektedir.

I.C. Kolorektal Kanserde Metastaz Oluşum Süreci

Kolorektal kanser, tüm dünyada, kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Bu kanserde hastaların temel ölüm sebebi, karaciğer, akciğer, böbrek üstü bezleri, meme ve over gibi organlarda uzak metastaz gelişiminin gözlenmesidir. Kolorektal kanserin ilk evrelerine ait spesifik belirtiler bulunmamakta ve hastalık yavaş ilerlemektedir. Bu nedenle hastaların yaklaşık %60' ında tanı sırasında uzak metastaz gözlenmektedir. Kolorektal kanserli hastalarda tanı sonrası yaşam süresi tanı sırasındaki klinik ve patolojik evrelere bağlıdır. Erken evre kanser hastalarının tanı sonrası 5 yıllık yaşam süresi %90 oranında iken, lenf nodu oluşmuş hastalarda bu oran %35-60' a, uzak metastaz gelişen hastalarda ise %10' a kadar düşmektedir. Evre 3 tümörlerinde lenf nodu metastazı, evre 4

tümörlerinde ise uzak organ metastazı görülmekte ancak erken tümör evresi olan evre 1-2' de patolojik bir belirteç bulunmamaktadır ve tedavi protokollerinin belirlenmesinde zorluk çekilmektedir. Bununla beraber, cerrahi ve onkolojideki ilerlemelere rağmen kolorektal kanser hastalarının %30' un da, tedavi sonrası uzak metastaz ya da nüks görülmektedir. Bu nedenle kanserin erken evrelerinde ve tedavisi sonrası, tümörün metastatik potansiyeli hakkında yardımcı olabilecek belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (22).

Hücrelerde metastatik fenotip, düzensiz adezyon, invazyon artışı, hareketlilik, apoptotik sinyallere karşı direnç, proliferasyon ve anjiyogenezin tetiklenmesi ile karakterize edilmektedir. Bu özellikler, CIN, MSI ya da epigenetik değişimlere neden olan, hücre içi ve hücreler arası sinyal yollarında meydana gelen birçok moleküler değişim sonucunda oluşmaktadır (Şekil-4) (23).



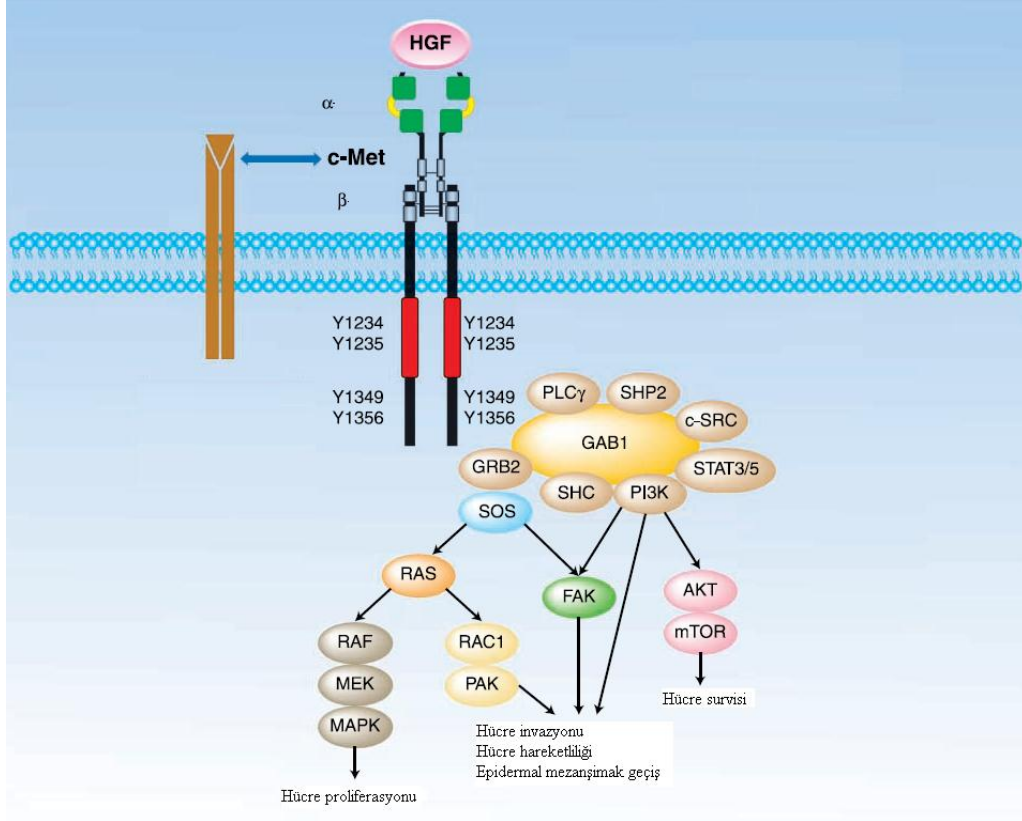
Şekil-4: Kolorektal kanserde görülen CIN ve MSI mekanizmalarının oluşum süreçleri (23).

Tümör oluşumu ve gelişiminde etkili olan mekanizmalar tanımlanmasına rağmen bu bilgiler metastaz oluşumunun izlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda, epidermal mezanşimal geçiş (EMT) mekanizmasının metastaz gelişiminde rol oynadığı ortaya konmuş ve bu mekanizmada rol oynayan sinyal yolları belirlenmiştir (24). Daha sonra

yapılan çalışmalar ile özellikle metastatik kolorektal kanser oluşumunda, Hepatosit Büyüme Faktörü/MET (HGF/MET) sinyal yolağının üzerinde durulmuştur ve buradaki genetik değişimlerin tanı ve tedavide belirteç özellikleri gösterdikleri ortaya konmuştur (25).

I.C.a. HGF/MET Sinyal Yolağı ve MET

Reseptör tirozin kinazlar (RTKs), hücre büyümesi, farklılaşması, neovasklarisasyon, ve doku tamiri gibi bir çok hücre sel süreçte düzenleyici olarak görev almaktadır. MET(c-MET) proteini, HGF sinyal yolağında, HGF proteinine bağlanan reseptör tirozin kinazdır. HGF, plazminojen serin proteaz ailesi içerisinde yer alan, 90kD büyüklüğünde bir multidomain glikoproteinidir. Bu protein normalde, mezenşimal hücrelerinden tek zincirli nc proetin olarak salgılanmaktadır. Daha sonra Furin gibi bazı proteazlar tarafından 307-308 aminoasitlik alfa ve beta parçalarına ayrılmaktadır. Bu parçalar di sülfit bağı ile birleşerek heterodimer oluşturmaktadır. Heterodimerin alfa zincirindeki yüksek affinite özelliği gösteren NH₂ ucu MET reseptörünün bağlanmasını, beta zinciri ise bu reseptörün aktif hale geçmesini sağlamaktadır (şekil-5).



Şekil-5:HGF/MET sinyal yolağı (25).

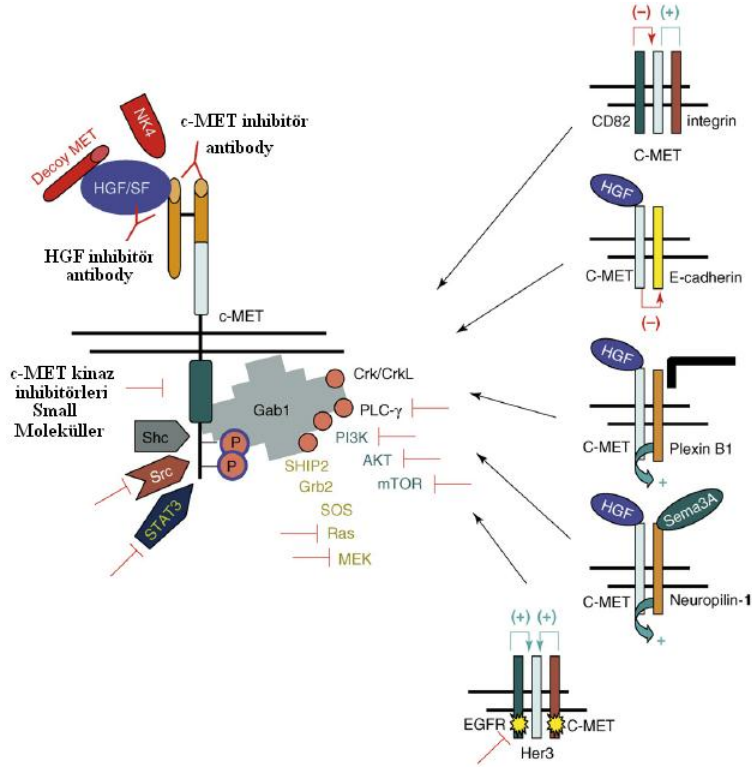
Alfa zincirinin tamamı ve beta zincirinin ise hücre dışında kalan ilk 212 aminoasiti ligand bağlaması için gereklidir. Beta zincirinin geri kalan kısmı, transmembranal domain, fosforilasyon ve kinaz alt ünitelerini içerir. Ligantı olan HGF, MET'e bağlandığı zaman reseptör dimerizasyonuna neden olarak karşılıklı alt ünitelerin trans-fosforilasyonla, birbirlerinin kinaz ünitesinde yer alan 1234 ve 1235 no'lu tirozin amino asitlerini fosforile ederek reseptörün enzimatik aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu şekilde aktifleşen reseptörler yine karşılıklı olarak birbirlerinin 1349 ve 1356 no'lu tirozinlerini fosforile etmektedirler. Böylece MET reseptörü üzerinden sinyal iletimi gerçekleşmeğe başlamaktadır. Sinyal yolağının aktifleşmesi ile meydana gelen bu fosfo-tirozin amino asitlerine adaptör protein GAB1(growth-factor-receptor-bound protein 2(Grb2)-associated binder 1) ve GRB2 gibi pek çok sinyal iletili adaptör protein bağlanmaktadır. GAB1 defosfo-tirozin amino

asitlerine bağlanmaktadır ve diğer adaptörlerden farklı bir şekilde işlev görmektedir. Diğer adaptör proteinler genel olarak fosfo-tirozin spesifik SH2veya PTB üniteleri ile bağlanırken GAB1 kendine özgü13 amino asitlik MBS (MET-binding-site) bölgesiyle fosfo-1349 ve fosfo-1356 nolu amino asitlere bağlanmaktadır. Bu durum GAB1'i MET için spesifik olan bir adaptör yapmaktadır. GAB1'in yanı sıra fosfo-1349 ve fosfo-1356 nolu aminoasitleri SH2(SRC-homology 2) domaini içeren GRB2, CBL, CRK, PI3K-p85 bağlanmalarını sağlayarak proliferasyonda görev alan GRB2-SOS-RAS-RAF-ERK, PI3K-AKT ve SRC gibi bir çok yolağı aktive etmektedir. Bu nedenle bir proto-onkogen olan *MET* in onkogene dönüşmesini sağlayan aktivasyon mutasyonları veya bu genin aşırı ekspresyonu hemen hemen her dokuda malign transformasyonun oluşumu için yeterlidir (26).

Kolorektal kanser tedavisinde özellikle HGF/MET sinyal yolağının baskılanmasında kullanılabilecek inhibitörler araştırılmaktadır (Tablo-2, Şekil-6) (27).

Tablo-2: HGF/MET sinyal yolağını baskılanması üzerine geliştirilen ilaçlar.

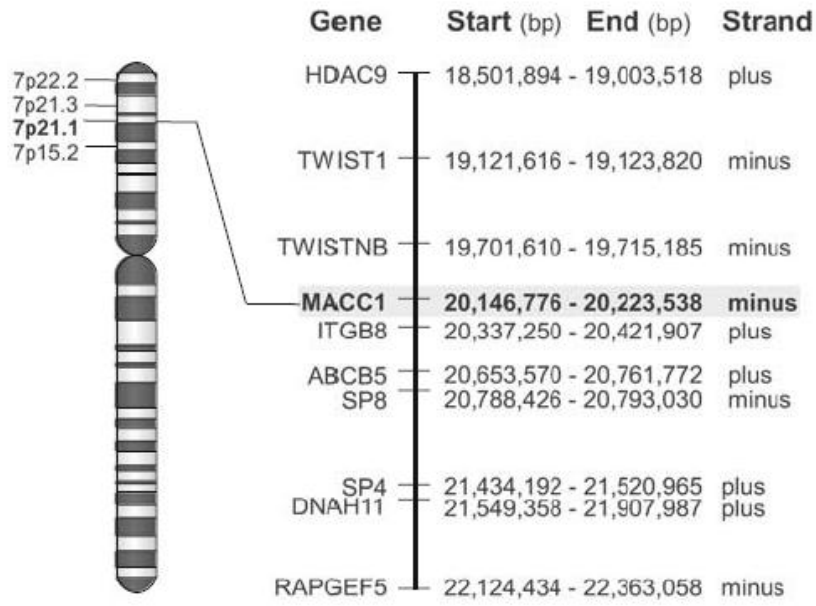
MET ve HGF/MET inhibitörleri	Aktivasyon Mekanizmaları	şirketler
MET inhibitörleri Oral Small Molekül MET Kinaz İnhibitörü	MET spesifik	ArQule (ARQ197) Pfizer (PF-2, 341, 066, PHA665752) Merck & Co. SGX Pharmaceuticals (SGK523)
Antibody	MET spesifik	Exelexis (XL880, XL184) MethylGene (MGCD265) SuperGen (MP470) Amgen Phizer (PF-2341066)
Protein İnhibitörleri HGF/MET İnhibitörleri Hümanize Antibody	MET spesifik HGF/MET spesifik	Genentech Compugen Amgen (AMG102) Galaxy Biotech Shering Plough Kringle Pharmaceuticals
Protein	NK4	



Şekil-6: HGF/MET sinyal yolağını baskılayan moleküllerin ve ilaçların etki mekanizmaları.

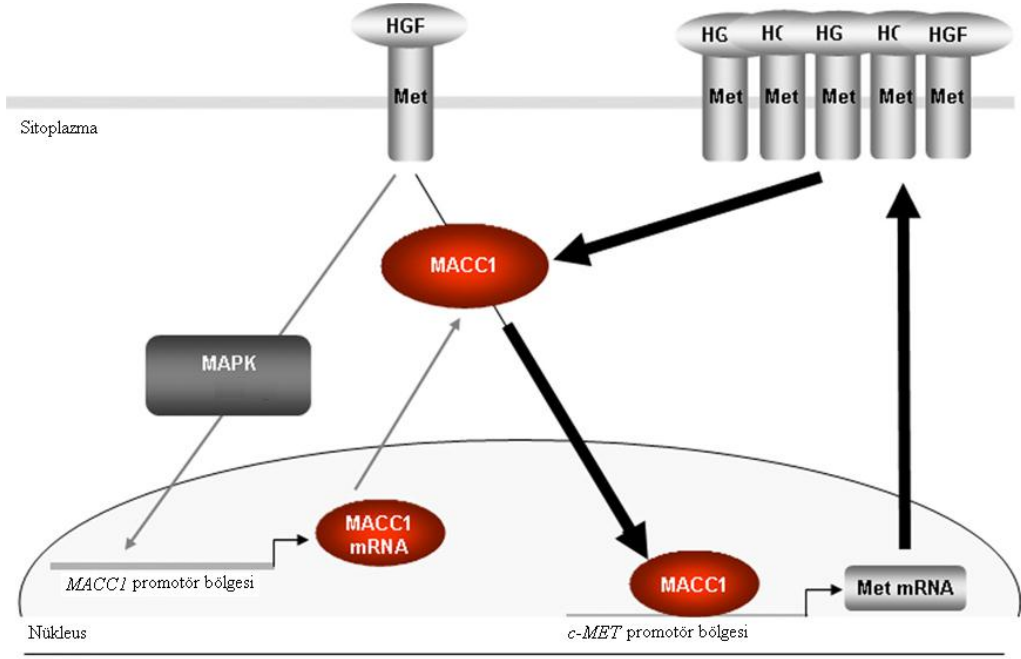
I.C.b. *MACC1* geni

2009 yılında, Stein ve arkadaşları, kolorektal kanser dokularında metastataz oluşumunda görev alan ve 7p21.1 de lokalize olan, *MACC1* (*Metastasis-associated in colon cancer-1*)genini tanımlamışlardır (Şekil-7). *MACC1* geni yedi ekzon altı introndan oluşmaktadır ve 852 aminoasitlik bir protein kodlamaktadır (3).



Şekil-7: *MACC1* geninin kromozom üzerindeki lokalizasyonu.

MACC1 proteini, *MET* geninin promotör bölgesine bağlanarak bir transkripsiyon faktörü özelliği göstermektedir. *MACC1* gen ürünü, *MET* geninin promotöründeki Sp1 bağlanma bölgesinin 60 bç' lik yakınına bağlanır ve bu genin transkripsiyonunu arttırarak HGF/*MET* sinyal yolağını işlevsel konuma getirmekte ve böylece tümör gelişimi ve yayılımında anahtar bir düzenleyici olarak görev almaktadır (Şekil-8) (28).



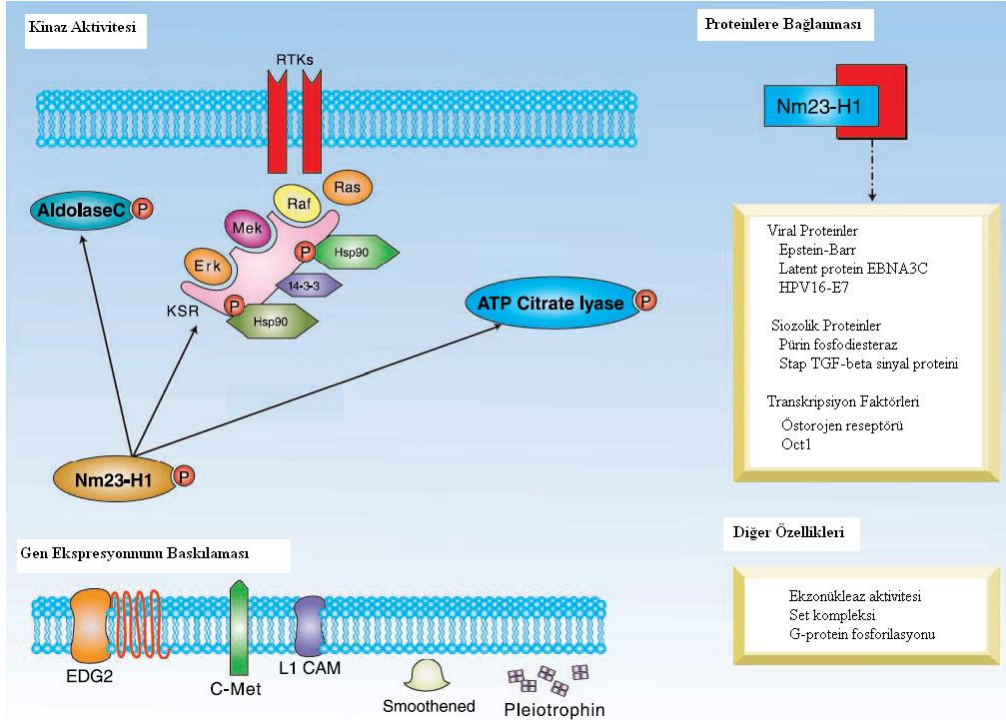
Şekil-8: MACC1 geninin HGF/MET sinyal yolağındaki etki mekanizması

Kolorektal kanserle ilgili klinik araştırmalar, *MACC1*' in, tümör yayılımında ve uzak metastaz riski taşıyan hastalarda tanı koydurucu bir biyobelirteç olabileceğinin vurgulamaktadır. Bu çalışmalarda, *MACC1* ekspresyonunun, 5-10 yıllık takipte uzak metastaz gösteren hastalarda anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir (29).

I.C.c. NM23-H1 Geni

İlk olarak sıçanların melanom hücre kültürlerinde belirlenen *nm 23*, ilk tanımlanan metastaz baskılayıcı gen ailesidir. Nm 23 ailesi, *NM23-H1*' un bulunduğu 8 önemli tümör baskılayıcı genden meydana gelmektedir. 17q22 de lokalize olan *NM23-H1* geni, bir difosfat kinaz (NDP-K) olan NDPK-A ürününü kodlamaktadır. NDP-kinaz enzimleri G proteinine GTP (guanin tri fosfat) bağlayarak hücre içi sinyal iletimini kolaylaştırmaktadırlar (5,30).

NM23-H1 üç farklı yol ile tümör metastazını baskılamaktadır. Bunlardan ilki, bir histidin protein kinaz olarak görev alarak Aldoze C' nin, ATP-sitrat lizinin ve MAP kinaz sinyal yolağında anahtar rol oynayan Ksr için substrat olarak görev almasıdır. Eğer *NM23-H1* geni farklı ekspresyon gösterirse Hsp90 Ksr proteinini bağlanamaz bunun sonucunda da Erk sinyal yolağı aktif hale geçerek tümör oluşumu tetiklenir. Aynı zamanda, bazı viral proteinlerin, Pn proteininin, transkripsiyon faktörlerinin ve TGF-beta sinyal yolağı proteinlerinin sitoplazmada serbest halde bulunan *NM23-H1* gen ürününe bağlanarak sinyal iletiminde görev aldığı görülmektedir. *NM23-H1*, LPA, EDG2, c-MET gibi hücre yüzey reseptörlerinin ve büyüme faktörlerinin kontrolünde rol oynamaktadır. Ayrıca *NM23-H1*' in DNA ekzonükleaz aktivitesine sahip olduğu ve set kompleksinde yer aldığı da bilinmektedir. *NM23-H1* tüm bu özellikleri ile normal hücrelerde tümör oluşumunu engellemekte, tümör hücrelerinde ise metastazı baskılamakta görev almaktadır (Şekil-9).



Şekil-9: *NM23-H1* geninin hüresel fonksiyonları.

Günümüzde moleküler biyolojinin gelişmesiyle karsinogenez sürecinin ve tümör gelişiminde rol oynayan moleküler değişikliklerin daha iyi anlaşılması için yeni prognostik belirteçler ve terapötik hedefler araştırılmaktadır. Araştırmalar karsinogenezle ilişkili genleri tanımlıyor olsa da metastaz yapabilme yeteneğinde olan kanser hücrelerinde meydana gelen değişiklikler büyük ölçüde bilinmemektedir(6.7)

Günümüzde hangi hastalarda karaciğer metastazı gelişeceğini gösteren kuvvetli bir belirteç yoktur. *MACC1* geni, 2009 yılında Stein U ve ark (2) tarafından tanımlanmış olup, ekspresyonunun hem hastaliksız hem toplam yaşam sürelerinde kısalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. HGF reseptörünü kodlayan *MET* geni *MACC1* geninin transkripsiyonel hedefidir (8). Dolayısıyla *MACC1* gen ekspresyonu kanser hücrelerinin proliferasyon, invazyon ve HGF aracılıklı yayılımını yani tümör büyümesini ve metastazına neden olmaktadır. Buna karşın, bir tümör süpresör gen olan *Nm23-H1* gen ekspresyonu ise kolorektal kanserlerin de içinde bulunduğu bir grup kanserde metastaza karşı koruyucu etki göstermektedir (9). Ancak bu genlere ilişkin

bilgiler yeni olup, klinikteki etkinlikleri ve prognostik değerlilikleri için daha birçok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın amacı kolorektal kanser nedeniyle rezeksiyon uygulanan hastaların normal görünümlü ve tümörlü dokularında *MACC1*, *MET* ve *NM23-H1* gen ekspresyonlarının hastalığın prognozuyla ilişkisini araştırmaktır. Çalışmanın sonunda *MACC1* ve *MET* gen ekspresyonlarının korelasyon göstermesi beklenmektedir. Bu iki genin ekspresyonuna karşın koruyucu olarak metastaz göstermeyen dokularda Nm23-H1 gen ekspresyonunun da aynı oranlarda artması gerekmektedir. Bu durumun oluşmadığı tümörlerin daha agresif seyretmesi ve karaciğere daha sıklıkla metastaz yapmaları beklenmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

II.A. Gereç

II.A.a. Hasta Grubu

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalına 2006 - 2011 tarihleri arasında başvuran hastaların arasında çalışmaya uygun 64 vaka seçilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların ailelerinde kanser öyküsü bulunmamaktadır. Tüm vakalar sporadik oluşan kolorektal tümörlere sahiptir. Seçilen grupta, tanı sırasında evre I, evre II ve evre III tümörlerine sahip ve ameliyat öncesi kemoterapi ve radyoterapi görmeyen hastalar yer almaktadır. Araştırmaya dahil edilmesi planlanan ilgili hastaların normal ve tümör doku materyallerinin temini; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu' nun 2012-3/12 no' lu kararı ile uygun bulunduktan sonra, bu hastalara ait tümörü ve normal dokuyu en iyi temsil eden parafin bloklar Patoloji Anabilim Dalı arşivinden elde edildi. Hastalara ait klinik özellikler ise Genel Cerrahi ve Patoloji Anabilim Dalı arşivlerinden elde edildi.

Ameliyat sonrası hastalığın tekrarlaması olarak tanımlanan nüks ve metastaz varlığını gözlemleyebilmek için hastalar, tanı sonrası en az 3 yıllık süre ile takibe alındı. Nüks oluşumuna kadar geçen süre hastalıksız sağ kalım olarak ifade edildi. Klinik takip, ameliyat sonrası biyokimyasal analizler ve görüntüleme teknikleri ve periyodik poliklinik kontrolleri ile yapıldı. Hastalar 1 yıl boyunca her üç ayda bir, bir yıldan sonra 6 ayda bir kontrole çağrılarak ve kolonoskopi yapılarak takibe alındı. Lokal ilerleme ve uzak metastaz durumu bilgisayarlı tomografi / manyetik rezonans görüntüleme cihazları ile radyolojik olarak değerlendirildi. Periyodik olarak fiziksel muayene, rutin kan analizleri ve karaciğer fonksiyon testleri yapılmış olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastaların, hastalıklı ve hastalıksız ortalama yaşam süreleri hesaplandı. Elde edilen klinik verilerden yararlanılarak hastalar, nüks, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz varlığına göre gruplara ayrılarak değerlendirildi (Tablo-3).

Tablo-3: Hastalara ait kliniksel özellikler.

No	Cinsiyet	Yaş	Evre	Lokalisasyon	Musinöz Komponent	Lenf Nodu Sayısı	Uzak Metastaz veya Nüks	No	Cinsiyet	Yaş	Evre	Lokalisasyon	Musinöz Komponent	Lenf Nodu ayısı	Uzak Metastaz veya Nüks
1	K	31	1	Kolon	-	-	+	33	K	53	2	Rektum	-	-	-
2	K	42	2	Rektum	-	+	-	34	E	48	2	Rektum	-	-	-
3	E	34	1	Kolon	-	-	+	35	E	52	1	Kolon	-	+	+
4	K	41	1	Kolon	-	-	-	36	K	59	2	Rektum	-	-	-
5	E	45	3	Rektum	+	+	+	37	E	47	1	Rektum	-	-	-
6	K	44	2	Kolon	-	-	-	38	K	56	2	Rektum	-	-	-
7	K	49	2	Rektum	-	-	-	39	E	46	1	Kolon	-	-	+
8	K	54	3	Kolon	+	+	-	40	K	57	2	Rektum	-	-	-
9	E	34	1	Rektum	-	-	+	41	E	52	3	Rektum	+	+	+
10	K	51	2	Rektum	-	-	-	42	K	45	2	Kolon	-	-	-
11	K	41	3	Rektum	+	+	+	43	K	58	3	Rektum	+	+	+
12	E	41	2	Rektum	-	+	+	44	K	58	3	Kolon	+	+	-
13	E	38	2	Kolon	-	-	+	45	K	51	2	Rektum	-	-	+
14	K	53	3	Rektum	+	+	-	46	E	41	3	Rektum	+	+	-
15	E	49	2	Rektum	-	+	-	47	K	48	2	Kolon	-	-	+
16	E	58	1	Rektum	-	-	+	48	E	48	1	Rektum	-	-	-
17	K	57	2	Rektum	-	-	-	49	K	53	3	Kolon	+	+	+
18	K	35	3	Kolon	+	+	-	50	E	57	2	Rektum	-	-	+
19	K	48	2	Rektum	-	-	+	51	K	56	3	Rektum	+	+	-
20	K	32	2	Kolon	-	+	-	52	E	51	1	Kolon	-	-	-
21	E	46	2	Kolon	-	-	+	53	K	52	2	Rektum	-	+	+
22	E	51	2	Rektum	-	+	-	54	K	45	3	Rektum	+	-	-
23	E	52	2	Kolon	-	-	-	55	E	42	2	Kolon	-	+	-
24	K	41	3	Rektum	+	+	+	56	E	50	2	Rektum	-	-	-
25	E	43	2	Rektum	-	-	-	57	K	52	1	Rektum	-	-	+
26	K	45	2	Kolon	-	-	-	58	E	58	3	Kolon	+	+	+
27	E	49	2	Rektum	-	-	-	59	K	59	2	Rektum	-	-	-
28	K	54	1	Kolon	-	-	+	60	K	60	3	Kolon	+	-	-
29	E	50	2	Kolon	-	-	-	61	E	48	2	Rektum	-	+	+
30	K	52	2	Rektum	-	-	+	62	K	60	1	Rektum	-	-	-
31	K	47	2	Rektum	-	-	-	63	K	45	3	Kolon	+	+	-
32	E	56	2	Kolon	-	+	+	64	K	59	3	Kolon	+	+	+

II.A.b. Kullanılan Aletler

- PCR (GeneAMP 9700) (USA)
- LightCycler 480II (Roche Diagnostics, USA)
- Isıticılı blok (DB-2A) (Techne, England)
- Su banyosu (BM 302) (Nüve, İstanbul, Turkey)
- Santrifüj (Z-23), (Hermle, Germany)
- Santrifüj (22R) (Beckman Coulter, Germany)
- Plate santrifüjü (Thermo, USA)
- Manyetik Karıştırıcı (Vorteks) (Velp Scientifica, Italy)
- + 4°C Buzdolabı (Alaska, İstanbul, Turkey)
- - 20°C Buzdolabı (Bosch, İstanbul, Turkey)
- - 80°C Buzdolabı (Nüve, İstanbul, Turkey)
- PCR UV kabini (Biosan, Latvia)
- Nanodrop (2000) (Thermo, USA)

II.A.c. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- RNeasy FFPE kiti (50 örneklik) (Qiagen, USA)
- Biostic Paraffin Removal Reagent (MO BIO, USA)
- RNA Extraction kit (QIAGEN, Germantown, Maryland, USA)
- ProtoScript M-MuLV First Stand cDNA Synthesis Kit (Biolabs, USA)
- Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem, USA)
- Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystem, USA)
- Etanol (Merck, Germany)

II.B. Yöntem

II.B.a. Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi

Ameliyat sonrası çıkartılarak formalin ile fiske edilip parafin içerisine gömdürülen ve Patalog tarafından değerlendirilen dokular patoloji arşivinden temin edildi. Normal ve tümör doku olarak tanımlanmış hastaya ait parafin blok için ependorf tüpler oluşturuldu ve parafin bloklardan 0.2-0.4 cm kesilerek bu tüpler içerisine alındı. Materyaller, BIOstic (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA) ile 2 kez muamele edilerek parafinden arındırıldı. BIOstic ile doku üzerindeki parafin çözdürüldükten sonra materyaller, %100-%70 ve %40' lık alkol aşamalarından geçirildi ve alkol oda ısısında uçuruldu. Bu aşamalardan sonra 40 hastaya ait tümör doku ve 8 hastaya ait normal dokudan, parafin bloktan RNA izolasyonuna uygun ticari kit (Qiagen RNeasy FFPE kit) kullanılarak prosedüre uygun şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

II.B.b. Elde Edilen RNA' ların Miktar ve Kalite Tayini

Elde edilen RNA' ların miktarı ve kalitesi NanoDrop 2000 Spektrometre (Thermo scientific, Wilmington, DE, USA) cihazı kullanılarak ölçüldü (Tablo-4).

RNA örneklerinin 260 ve 280 nm' deki dalga boylarında yapılan ölçümleri ve bu dalga boylarından elde edilen değerlendirilen birbirlerine olan oranları, miktar ve kalite konusunda bilgi verdi.

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği göstermektedirler. Bu nedenle 260 nm' de ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng/ μ L veya μ g/mL düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. RNA' nın konsantrasyonunun saptanmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemler DNA' nın spektral analizi ile tamamen aynıdır. Sadece tek zincirli RNA' nın miktarının belirlenmesinde kullanılan formül farklıdır.

II.B.c. Total RNA (ng/μl) = 260 nm' deki absorbans x 40 x Dilüsyon Faktörü

RNA molekülleri için 1 optik dansitenin 40 μg/mL' ye karşılık geldiği bilinmektedir. Bununla birlikte 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Proteinlerde bilindiği gibi 280 nm' de absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 280 nm' de ölçülen bir değerdeki artışı A260/A280 oranında düşmeye neden olur. izole edilen total RNA örneklerinin saflığından bahsetmek için bu oran 1.8-2.00 arasında olmalıdır.

Tablo-4: Hastalara ait örneklerin RNA konsantrasyonları ile ilgili nanodrop ölçümleri.

Örnek ID	Nükleik Asit Kons.	Ünite	A260	A280	260/280	Örnek Tipi	Örnek ID	Nükleik Asit Kons.	Ünite	A260	A280	260/280	Örnek Tipi
1	123.2	ng/µl	0,349	0,188	1,85	RNA	33	94.2	ng/µl	0,56	0,297	1,89	RNA
2	128	ng/µl	2,979	1,581	1,88	RNA	34	142	ng/µl	4,431	2,365	1,87	RNA
3	110.2	ng/µl	2,268	1,205	1,88	RNA	35	250	ng/µl	2,045	1,193	1,71	RNA
4	59	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA	36	34.6	ng/µl	0,326	0,19	1,72	RNA
5	142.6	ng/µl	9,024	4,817	1,87	RNA	37	154	ng/µl	1,276	0,72	1,77	RNA
6	90.7	ng/µl	0,856	0,483	1,77	RNA	38	175.2	ng/µl	0,99	0,524	1,89	RNA
7	56.1	ng/µl	0,856	0,483	1,77	RNA	39	89.2	ng/µl	2,22	1,18	1,88	RNA
8	154	ng/µl	0,3	0,182	1,65	RNA	40	90	ng/µl	3,575	1,868	1,91	RNA
9	110.2	ng/µl	0,429	0,221	1,94	RNA	41	170	ng/µl	12,31	6,411	1,92	RNA
10	58.7	ng/µl	18,08	9,915	1,82	RNA	42	125	ng/µl	9,024	4,817	1,87	RNA
11	69	ng/µl	0,987	0,545	1,81	RNA	43	98.2	ng/µl	2,74	1,472	1,86	RNA
12	145	ng/µl	10,16	5,401	1,88	RNA	44	90	ng/µl	1,313	0,696	1,89	RNA
13	165	ng/µl	1,615	0,905	1,78	RNA	45	165	ng/µl	0,667	0,321	2,08	RNA
14	129	ng/µl	1,342	0,712	1,89	RNA	46	178	ng/µl	3,077	1,607	1,92	RNA
15	58.9	ng/µl	1,649	0,877	1,88	RNA	47	145	ng/µl	1,763	0,883	2	RNA
16	85.7	ng/µl	7,359	3,798	1,94	RNA	48	125.6	ng/µl	0,535	0,303	1,77	RNA
17	148	ng/µl	0,415	0,245	1,69	RNA	49	56.2	ng/µl	18,08	9,915	1,82	RNA
18	125	ng/µl	2,896	1,493	1,94	RNA	50	90	ng/µl	1,342	0,712	1,89	RNA
19	360.1	ng/µl	0,644	0,358	1,8	RNA	51	115	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA
20	85.7	ng/µl	0,729	0,414	1,76	RNA	52	146.1	ng/µl	0,764	0,465	1,64	RNA
21	65	ng/µl	3,575	1,868	1,91	RNA	53	87	ng/µl	0,597	0,343	1,74	RNA
22	225	ng/µl	12,31	6,411	1,92	RNA	54	264	ng/µl	2,5	1,422	1,76	RNA
23	325	ng/µl	9,024	4,817	1,87	RNA	55	102	ng/µl	1,615	0,905	1,78	RNA
24	126	ng/µl	2,74	1,472	1,86	RNA	56	148	ng/µl	1,342	0,712	1,89	RNA
25	458	ng/µl	1,313	0,696	1,89	RNA	57	41.7	ng/µl	1,649	0,877	1,88	RNA
26	145	ng/µl	3,414	1,777	1,92	RNA	58	175	ng/µl	5,622	2,991	1,88	RNA
27	105	ng/µl	2,5	1,422	1,76	RNA	59	182	ng/µl	0,729	0,414	1,76	RNA
28	75.2	ng/µl	0,639	0,366	1,74	RNA	60	201	ng/µl	0,56	0,297	1,89	RNA
29	156	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA	61	109	ng/µl	0,639	0,366	1,74	RNA
30	101.7	ng/µl	0,764	0,465	1,64	RNA	62	142.1	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA
31	120	ng/µl	0,376	0,215	1,75	RNA	63	36	ng/µl	0,764	0,465	1,64	RNA
32	158	ng/µl	0,293	0,165	1,78	RNA	64	102	ng/µl	0,429	0,221	1,94	RNA

II.B.d. RNA' lardan cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA' nın 5 ng' ProtoScript M-MuLV First Stand cDNA Synthesis Kit' i kullanılarak komplementer DNA (cDNA) elde edildi. İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi için kullanılan PCR karışımı ve programı Tablo-5 ve Tablo-6' da verildi. Çalışılması hedeflenen her bir örnek için 0,2 µl' lik PCR tüpü içerisine Tablo-5' te verilen malzemelerden reaksiyon karışımı oluşturuldu. Elde edilen miks pipetaj yapılarak karıştırıldı ve santrifüje alınarak spin atıldı. PCR tüpü içerisindeki miks, 37°C' de 2 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen cDNA' lar üzerine reaksiyon karışımı bulunan her bir PCR tüpüne 90 µl dH₂O ilave edilerek karıştırıldı ve ürünler bir sonraki aşamaya kadar -20°C' de saklandı.

Tablo-5: cDNA sentezi için oluşturulan reaksiyon karışımı.

Bileşenler	1 Örneklik Reaksiyon
RNA	50 ng-200 ng (0.5 µg- 2 µg)
M-MuLV Enzyme Mix (10X)	3.5 µl
M-MuLV Reaction Mix (2X)	7.5 µl
Random Primer (60 µM)	2.5 µl
Nucleas-free H ₂ O	Toplam hacim 20.0 µl olacak şekilde dH ₂ O ile tamamlanır

Tablo-6: cDNA sentezi için kullanılan PCR programı.

PCR Programı	
	30
16 °C' de	→ dakika
	30
42 °C' de	→ dakika
	5
85 °C' de	→ dakika
4 °C' de	→ ∞

II.B.e. Real-Time PCR ile mRNA Ekspresyon Analizleri

Çalışmada, farklı toplumlarda, metastatik kolorektal kanser ile ilişkilendirilen 3 farklı genin ekspresyon seviyelerinin Türk populasyonunda değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Literatür araştırması sonucu belirlenen *MACC1*, *NM23-H1* ve *MET* genlerinin yer aldıkları sinyal yolları ve görevleri Tablo-7' de belirtilmiştir.

Tablo-7: *NM23-H1*, *MET* ve *MACC1* genlerinin özellikleri

mRNA Adı	Accession Numarası	Ekspresyon Durumu	Kromozom Lokalisasyonu	Görev Aldığı Sinyal Yolu
<i>MACC1</i>	NM_182762	↑	7p21.1	HGF/MET
<i>MET</i>	NM_000245	↑	7q31	HGF/MET
<i>NM23-H1</i>	NM_021169	↓	17q	ERK

Çalışmamızda kullanılmak üzere belirlediğimiz genlere ilgili primerler literatürden seçilmiştir. Çalışmada, PCR döngüsü esnasında oluşan spesifik PCR ürününü belirlemek ve eş zamanlı değerlendirmek amacıyla floresan ışığa yapabilen işaretli (Taqman problu) primerler kullanıldı.

mRNA ekspresyonlarının Ct değerleri, Light Cycler480II cihazının veri tabanından yararlanılarak elde edildi. Eşik değeri (Threshold) olarak tanımlanan CT değeri, floresan ışımada (ΔR_n) artışın başladığı ilk siklusu ifade eder. $R_n(+)$, yüklenen örneğin reaksiyona giren tüm komponentlerin floresan emisyonu, $R_n(-)$ ise negatif kontrolün ve reaksiyonu gerçekleşmeyen örneklerin floresan emisyonu olarak tanımlanmaktadır. ΔR_n , $R_n(+)$ ve $R_n(-)$ arasındaki fark olup, CT değerinin hesaplanmasında kullanılan temel göstergedir. Çalışmada, housekeeping gen olarak kullanılan beta-aktin geninin ortalama Ct değeri belirlenerek PCR Array' den elde edilen verilerin normalizasyonu yapıldı.

II.B.f. İstatistiksel Analiz

mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimleri inceleyebilmek için öncelikle LightCycler 480 II cihazının veri tabandan, yüklenen örneklerin Row Data ve CT değerleri elde edildi. Hastalar, klinik özelliklerine göre gruplara ayrıldı ve Sabioscience sitesinde yer alan PCR Array Veri Analizi sayfasına yüklendi.

Web tabanlı Sabiosciences PCR-Data Analiz (RT2 profiler PCR array data analysis version 3.5) programından yararlanılarak, evreler arasında miRNA ekspresyon düzeyindeki değişimleri ifade eden kat değişimi (fold change) grafikleri ve değerlendirilen gruplara göre mRNA' ların hangilerinin yüksek eksprese (up-regüle) hangilerinin düşük eksprese (down- regüle) olduğunu gösteren Clustrogram görüntüsü oluşturuldu. Sabiosciences PCR-Data Analiz sisteminde 2' deltact değerlerinden Student T testi yapılarak her bir miRNA' nın p değeri belirlendi. Sonuçlar % 95' lik güven aralığında ve anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi. mRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların, hastaların klinik özellikleri ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak için ise Sabiosciences PCR-Data analiz programından yararlanıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, 2006-2011 yılları arasında kolorektal kanser tanısı almış, operasyon öncesi radyoterapi ya da kemoterapi almamış, Evre I, evre II veya evre III tümörüne sahip 64 hasta değerlendirildi. Hastaların yaş aralığı 30-60 arasında olup ortalama yaş 58 olarak belirlendi. Çalışmaya dahil edilen hastaların 27' si erkek, 37' si kadındır. 38 vakada primer tümörün rektumda, 26 vakada ise kolonda lokalize olduğu saptandı. Altmış dört hastanın on yedisinde müsinöz komponent varlığı belirlendi. 25 hastada lenf nodu metastazı belirlendi. Seçilen hastalar en az üç yıl takibe alındı ve 27 hastada ise uzak metastaz ya da nüks varlığı gözlemlendi. Değerlendirilen hastaların klinik ve patolojik özellikleri Tablo-8' de verilmektedir.

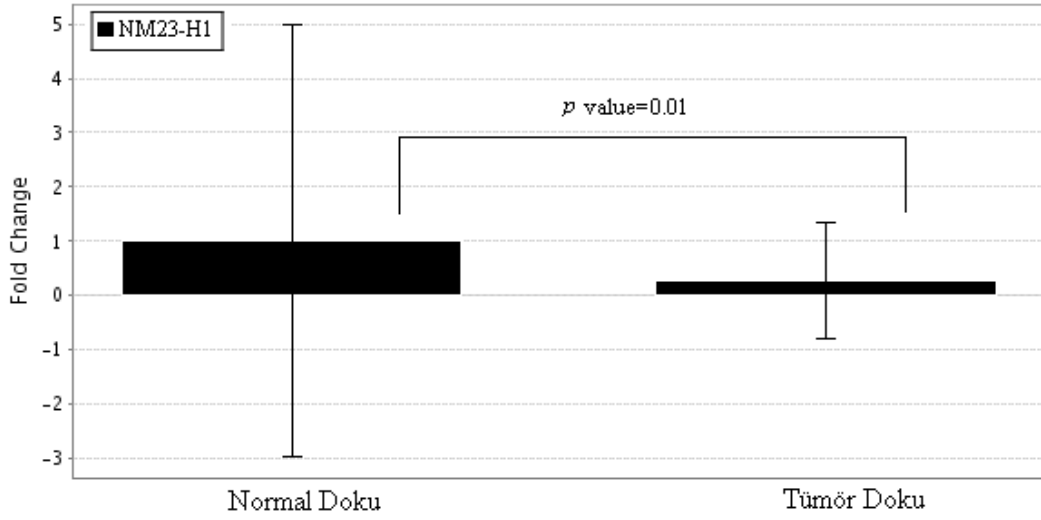
Tablo-8: Hastalara ait klinik özellikler.

Değerlendirilen Parametreler	Hasta Sayısı (%)
Hasta	64
Yaş	
30-39	6(9.3)
40-49	26(40.6)
50-60	32(50)
Cinsiyet	
Kadın	37(57.8)
Erkek	27(42.18)
Tümör Büyüklüğü	
<3	14(21.8)
>3	50(78.1)
Müsinöz Komponent Durumu	
Yok	47(73.4)
Var	17(26.5)
Tümör Lokalisasyonu	
Kolon	26(40.6)
Rektum	38(59.3)
Evre	
I	13(20.3)
II	26(40.6)
III	25(39)
Nüks yada uzak Metastaz Durumu	
Yok	37(57.8)
Var	27(42.18)

Real-time PCR Array sistemleri kullanılarak, 64 kolorektal tümörde metastaz ile ilişkilendirilmiş 3 farklı mRNA' nın ekspresyon profilleri analiz edildi. İlk olarak tümör dokusundaki mRNA ekspresyon seviyeleri normal dokudaki ekspresyon seviyeleri ile, web tabanlı Sabiosciences PCR-Data Analiz (RT² profiler PCR array data analysis version 3.5) programından yararlanılarak karşılaştırıldı ve istatistiki değerler bu programda yer alan Student T testi ile elde edildi (Tablo-9, Şekil-10, Şekil-11, Şekil-12).

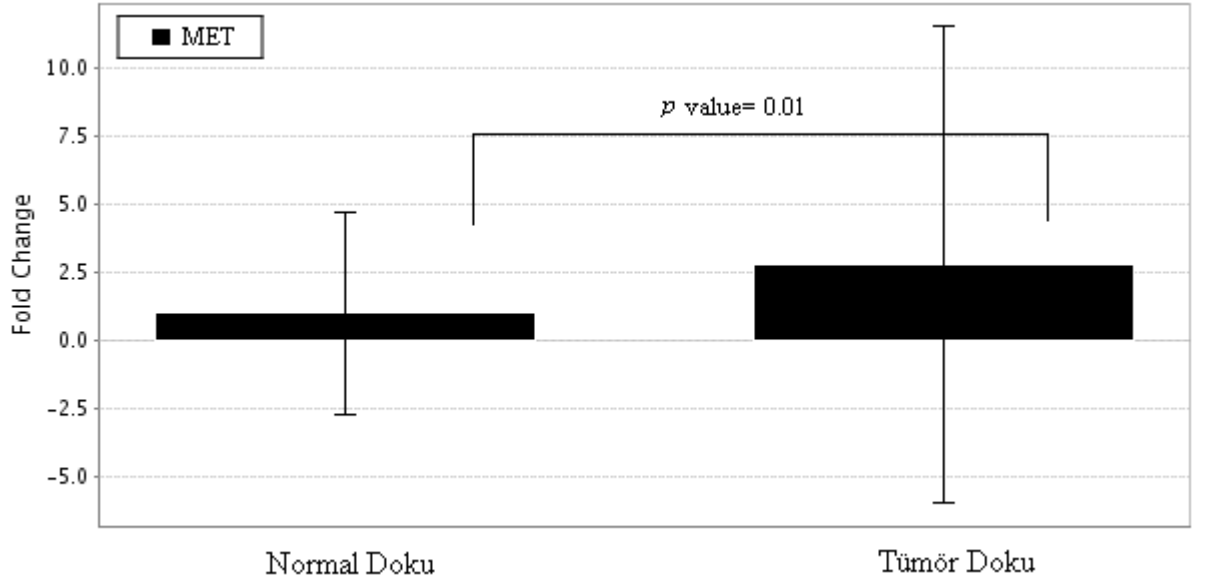
Tablo-9: Normal doku ile karşılaştırıldığında tümör dokudaki *NM23-H1*, *MET* ve *MACC1* ekspresyon seviyeleri.

Genler	Normal Doku	Tümör Doku	Kat Değişimi	p value
	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))		
<i>NM23-H1</i>	3.441.212	0.877711	0.2551	0.0157
<i>MET</i>	0.606163	1.925.436	31.764	0.0133
<i>MACC1</i>	0.450556	1.555.531	34.525	0.0038

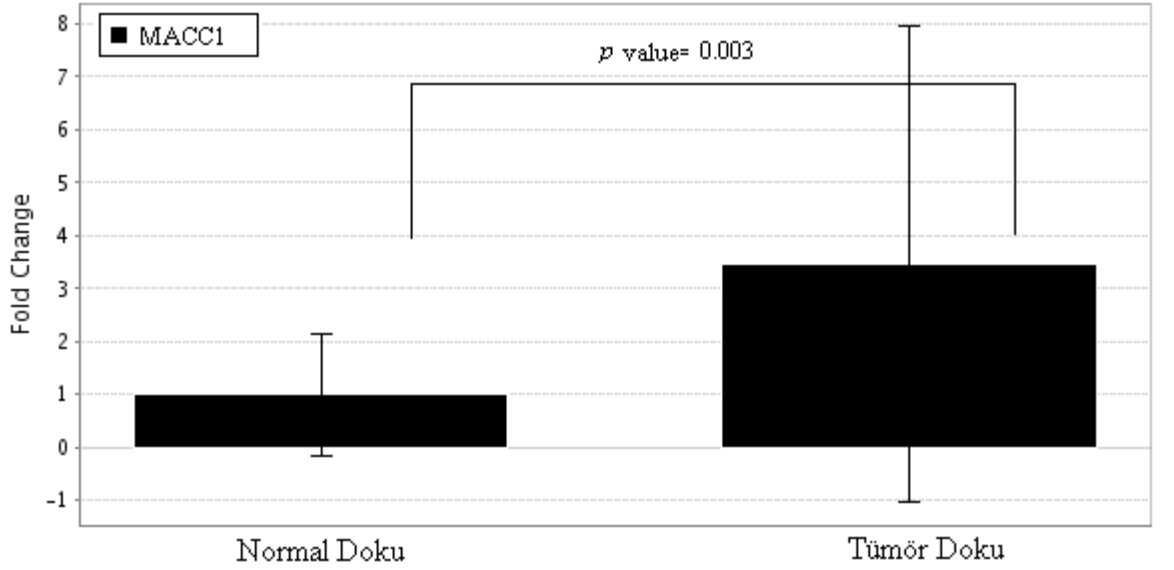


Şekil-10: Normal doku ve Tümör dokuda *NM23-H1* ekspresyon seviyesi.

Tümör baskılayıcı bir gen olan *NM23-H1*, normal dokulardaki ekspresyonu, tümör dokularındaki ekspresyon seviyesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşüş meydana geldiği görülmüştür.



Şekil-11: Normal doku ve Tümör dokuda *MET* ekspresyon seviyesi.



Şekil-12: Normal doku ve Tümör dokuda *MACC1* ekspresyon seviyesi.

Birer onkogen olan *MACC1* ve *MET*, normal doku ile karşılaştırıldığında Tümör dokuda sırasıyla 31 ve 34 kat artış göstererek istatistiksel olarak anlamlı bulunmuşlardır.

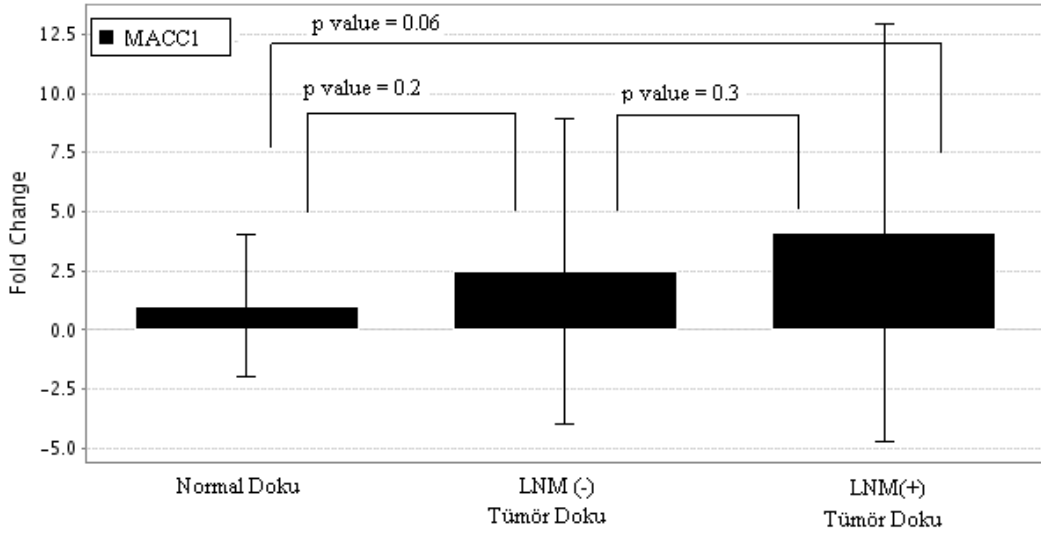
Normal kolon mukozası ile evrelere ayrılarak gruplanan tümör dokular karşılaştırılarak mRNA' ların ekspresyon seviyeleri incelendi. Histopatolojik

evreleme sistemine göre tümör dokular 3 gruba ayrıldı. Evre1 tümörleri grup 1, evre 2 tümörleri grup 2 ve evre 3 tümörleri de grup 3 olarak tanımlandı. Normal dokular ise kontrol grup olarak alındı. Evreler arasında mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimler web tabanlı PCR-Data Analiz programından yararlanılarak belirlendi. Farklı evrelere ait kolorektal tümörlerin normal doku ile karşılaştırılması sonucu *MET* ve *MACC1*' in ekspresyonlarının evre III tümörlerinde evre I tümörlerine göre anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. (Tablo-10).

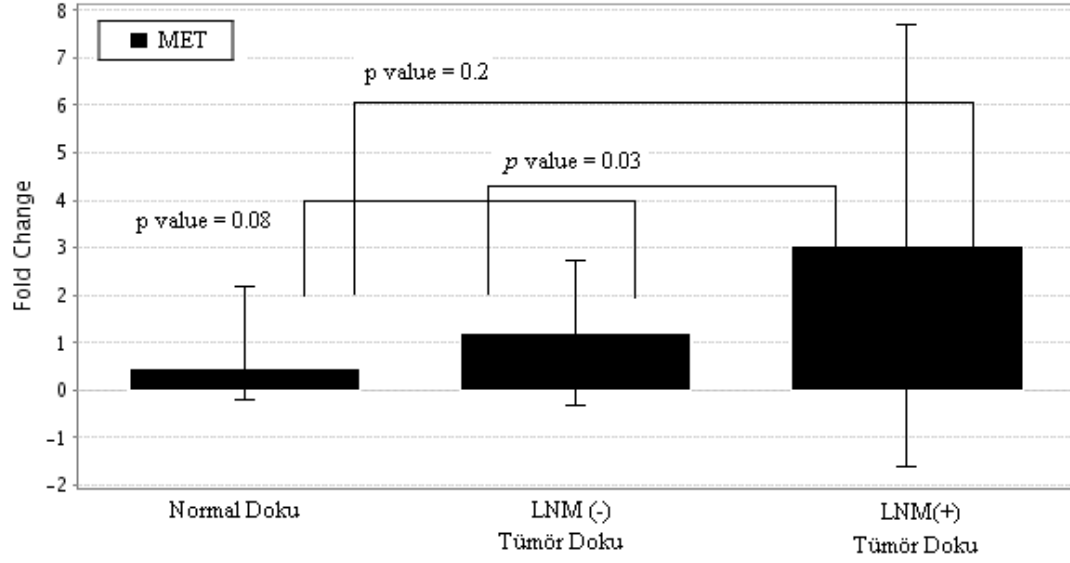
Tablo-10: Kolorektal kansere ait farklı evrelerdeki *NM23-H1*, *MET* ve *MACC1* ekspresyon seviyeleri.

Gen Adı	Evre I	Evre II	Evre III	Evre I/II		Evre II/III		Evre I/III	
	2 [^] (-Avg. (Delta(Ct)))	2 [^] (-Avg. (Delta(Ct)))	2 [^] (-Avg. (Delta(Ct)))	Kat Değişimi	p- value	Kat Değişimi	p- value	Kat Değişimi	p- value
<i>NM23-H1</i>	0,42472	0,3915	0,305582	-1,0849	0,33 104	-1,2812	0,60 5598	-1,3899	0,70 7856
<i>MET</i>	0,545569	0,968171	1,925436	1,7746	0,15 968	1,9887	0,25 9889	3,5292	0,01 2421
<i>MACC1</i>	0,44046	0,775236	1,555531	1,7601	0,27 037	2,0065	0,70 5291	3,5316	0,00 4539

Lenf nodu metastaz varlığına göre hastalar değerlendirildiğinde lenf nodu metastazı negatif hastalar ile lenf nodu metastazı pozitif hastalar belirlenerek normal dokuyla ve birbirleriyle istatistiki olarak karşılaştırıldı (Şekil-13, Şekil-14, Şekil-15).

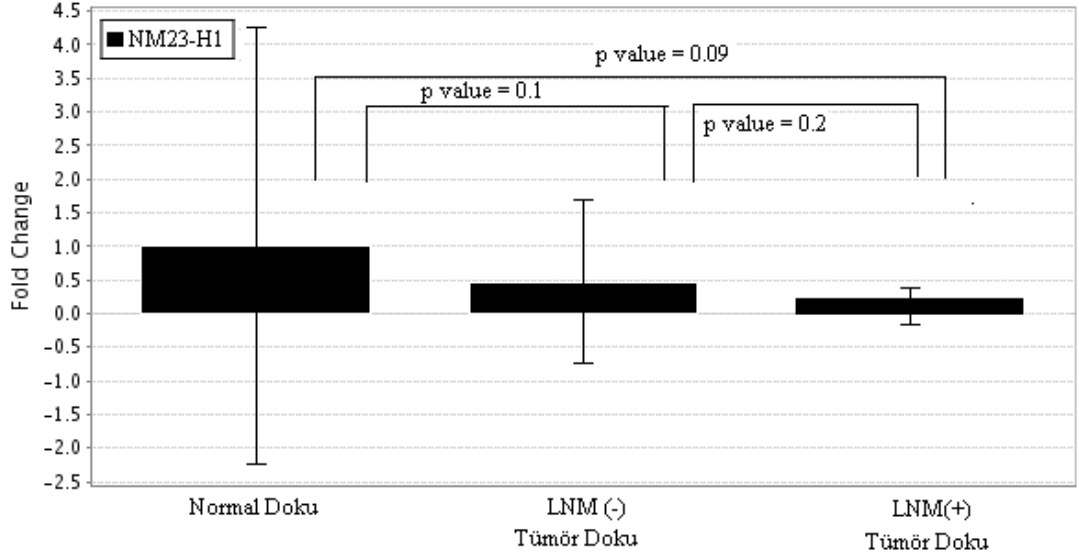


Şekil-13: Tümör dokularda LNM durumu ve *MACC1* ekspresyonu.



Şekil-14: Tümör dokularda lenf nodu metastazı durumu ve *MET* ekspresyonu.

LNM: Lenf nodu metastazı,



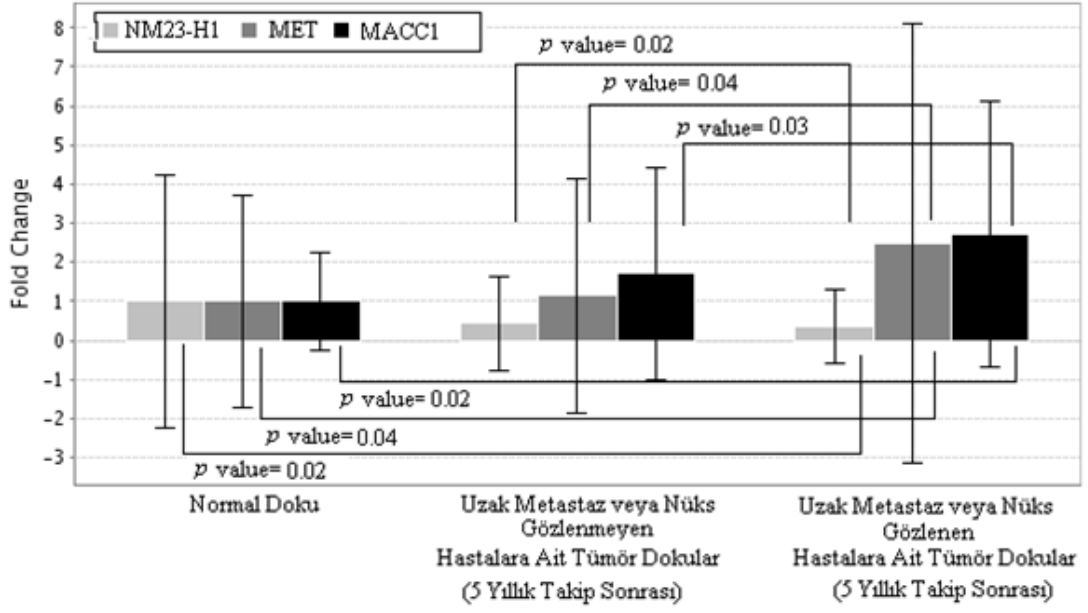
Şekil-15: Tümör dokularında LNM durumu ve *NM23-H1* ekspresyonu.

MACC1, *MET* genleri LNM (-) tümör dokuları ile karşılaştırıldığında, LNM (+) tümör dokularında sırasıyla 2.38 ve 2.87 kat artış, *NM23-H1* ise 1.7 kat azalış gösterdi. *MET* genindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.03$)

5 yıllık takip sonrası nüks ve uzak metastaz görülmeyen hastalara ait tümör dokular ile nüks ve uzak metastaz görülen hastalara ait tümör dokularında bu 3 genin ekspresyon seviyeleri incelendi. (Tablo-11 ve Şekil-16).

Tablo-11: *NM23-H1*, *MET* ve *MACC1* ekspresyon seviyelerinin uzak metastaz ya da nüks potansiyeli taşıyan tümör dokularındaki kat değişimleri ve p değerleri.

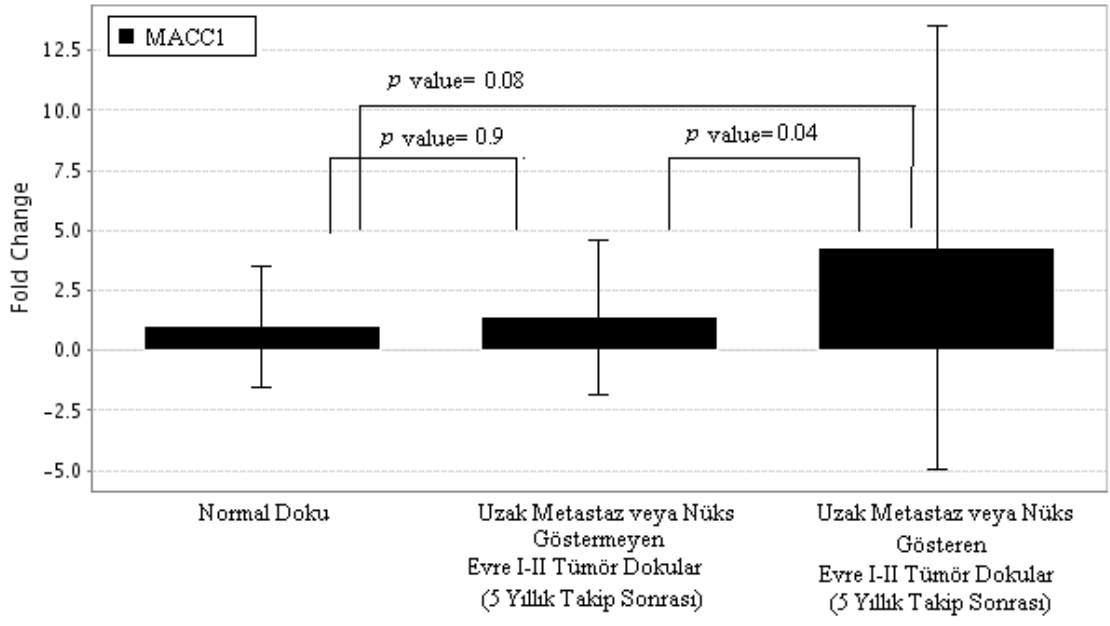
Gen Adı	Tümör Doku (5 Yıllık Takip Sonrası)								
	Normal Doku	Uzak Metastaz yada Nüks (-)		Uzak Metastaz yada Nüks (+)		(-)/(+)			
	2 ⁻ Avg.(Delta(Ct))	2 ⁻ Avg.(Delta(Ct))	Kat Değişimi	p value	2 ⁻ Avg.(Delta(Ct))	Kat Değişimi	p value	Kat Değişimi	p value
NM23-H1	195.432	0.939306	0.4806	0.075185	0.314326	0.1608	0.024866	-62.175	0.024866
MET	0.626875	13.962	22.272	0.381161	2.123.282	33.871	0.042413	27.009	0.041469
MACC1	0.353247	0.618101	17.498	0.456723	1.555.531	44.035	0.02611	60.752	0.039797



Şekil-16: 5 yıllık takip sonrasında uzak metastaz ya da nüks gözlenen hastalara ait tümör dokularında *NM23-H1*, *MET* ve *MACC1* genlerine ait ekspresyonlar.

Nüks ve uzak metastaz gözlenen hastalara ait tümör dokularında, metastaz görülmeyen hastaların tümör dokularına göre, *MACC1* ekspresyon seviyesi 6.07 kat, *MET* in ekspresyon seviyesinin ise 2.70 kat arttığı, *NM23-H1* in ekspresyonunun ise 6.21 kat düştüğü belirlendi. Üç geninde istatistiksel olarak anlamlı p değerlerine sahip olduğu gözlemlendi.

Evre I-II ve evre III tümörleri, daha sonraki yıllarda uzak metastaz ya da nüks gösterme durumlarına göre kendi içlerinde gruplara ayrıldı ve 3 genin ekspresyon seviyeleri incelendi. Yapılan istatistikler sonucunda daha sonraki yıllarda uzak metastaz gösteren evre I-II tümörlerinde *MET* ya da *NM23-H1* de anlamlı bir değişim gözlenmezken, *MACC1* ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlendi (Şekil-17).



Şekil-17: Erken evre kolorektal tümörlerinde, uzak metastaz ya da nüks potansiyali gözlenen hasta dokularındaki *MACC1* ekspresyonu.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Karmaşık bir oluşum sürecine sahip olan kolorektal kanser, başta gelişmiş ülkeler olmak üzere tüm dünyada en yaygın görülen kanserlerden biridir. Sporadik ya da ailesel olarak meydana gelen bu tümörler kansere bağlı ölümlerinde başında gelmektedir (2). Günümüzde moleküler biyoloji ve genetiğin gelişmesiyle birlikte kolorektal kanser oluşum sürecinde etkili olan genler ve bu genlerin yer aldıkları sinyal yolları tanımlanmıştır. *KRAS*, *BRAF*, *MLH1*, *MSH2* ve *APC* genlerinin kolorektal kanser gelişim sürecindeki etkileri belirlenmiş ve rutin hasta hizmeti dahilinde tanı ve tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır (17). Fakat tanımlanan bu genler ve etkili oldukları sinyal yolları kanser gelişiminin tamamen anlaşılmasında yetersiz kalmaktadır. Kolorektal kanserin en önemli özelliği hastaların çoğunda uzak metastaz varlığıdır. Kolorektal kanserin ilk gelişim evrelerine ait spesifik belirtiler bulunmamakta olup yavaş ilerleyen kanser tipine örnektir. Bu nedenle hastaların büyük bir kısmında tanı sırasında uzak metastaz gözlenmektedir. Kolorektal kanserli hastalarda tanı sonrası yaşam süresi tanı sırasındaki klinik ve patolojik evrelere bağlıdır. Erken evre kanser hastalarının tanı sonrası 5 yıllık yaşam süresi %90 oranında iken, lenf nodu oluşmuş hastalarda bu oran %35-60'a, uzak metastaz gelişen hastalarda ise %10'a kadar düşmektedir. Evre 3 tümörlerinde lenf nodu metastazı, evre 4 tümörlerinde ise uzak organ metastazı görülmekte ancak erken tümör evresi olan evre 1-2' de patolojik bir belirteç bulunmamaktadır. Kolorektal kanser tedavi protokollerinin belirlenmesinde bu patolojik evreler kullanılmaktadır. Evre II ve evre III kolorektal kanser tümörlerinde temel tedavi cerrahi operasyondur. 1980' ler den itibaren Evre III kolorektal tümörlerinde ameliyat sonrası Fluoropirimidin tabanlı kemoterapi kullanılmaktadır. Daha sonra ki yıllarda flurourasil' in yanında levamisol ilave edilerek ölümün %30 oranında azaltıldığı bulunmuştur. 2004 yılında mozaik ilaç kombinasyonları modeli ile 5-FU ve leucovorine, oxaplatin eklenmiş ve FOLFOX kürü bulunmuştur. Günümüzde, evre III hastaları için altı aylık FOLFOX kemoterapisi

verilmektedir. Daha sonradan uzak metastaz veya nüks gösteren evre II hastalarında ameliyat sonrası kemoterapi fayda sağlamasına rağmen hangi hastaların nüks yada uzak metastaz risk potansiyeli taşıdığı belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle kanserin erken evrelerinde, tümörün metastatik potansiyeli için yardımcı olabilecek yeni belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (21). Günümüz çalışmaları, kolorektal kanserin tanı ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılacak yeni moleküllerin belirlenebilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalar ile evre II ve evre III hastalarının nüks ve metastaz riskinin anlaşılabilmesi için pek çok genetik ve moleküler belirteç taranmıştır. Ayrıca bazı çalışmalarla kanser oluşumunda etkili olan değişimlerin populasyonlar ve hatta bireyle arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. Metastaz gelişiminde rol oynayan mekanizmalar incelendiğinde özellikle *MACC1*, *MET* ve *NM23-H1* olmak üzere üç genin önemi vurgulanmıştır.

Kolorektal kanser ülkemizde de en yaygın görülen kanserlerden biridir. Tanı alan hastaların birçoğu kötü prognoza sahiptir ve yüksek oranda uzak metastaz gelişim riski taşımaktadırlar (6). Gelişmiş toplumlarda, kolorektal kanserin tanı ve tedavisinde kullanılabilen belirteçlerin sayısı oldukça azdır. Fakat Türk toplumuna özgü biyobelirteçler henüz yeni araştırılmaya başlanmıştır. Kolorektal kanserde metastaz gelişim sürecinde etkili oldukları belirlenen *MACC1*, *MET* ve *NM23-H1* genlerinin Türk popülasyonuna ait ekspresyon seviyelerinin değerlendirildiği bir çalışma ise bulunmamaktadır. Çalışmamızda, Real-time PCR kullanarak, evre I, II ya da III kolorektal kanser tanısı almış hastaların tümör dokularında bu üç genin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı histolojik evrelere ait tümör dokularında bu genlerin ekspresyon seviyeleri değerlendirilerek sporadik gelişen Türk popülasyonuna ait erken evreli tümörlerde, tümörün metastatik potansiyeli hakkında belirteç olarak kullanılabilirlikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

NM23 gen ailesinde yer alan *NM23-H1*, 17q22' de lokalizedir. Tümör baskılayıcı bir gen olan *NM23-H1*, difosfat kinazlardan biri olan NDPK-A ürününü kodlayarak hücre içi sinyal iletiminde görev almaktadır (32). Meme,

karaciğer, over ve gastrik kanserlerde yapılan çalışmalar ile *NM23-H1* yüksek ekspresyonu, düşük metastatik potansiyel ile ilişkilendirilmiştir. Nöroblastoma, pankreas kanserleri ve baş-boyun kanserlerinde ise *NM23-H1* geninin metastatik süreçte herhangi bir ilişkisi belirlenmemiştir. Hartsough ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışma (33) ile *NM23-H1* gen ekspresyonunun MAPK ve TGF-beta sinyal yolağını baskılayarak kanserde invazyonu engellediği gözlemlenmiştir. Kapitanovic ve arkadaşları (34) *NM23-H1* gen ekspresyonunun kolorektal kanser tümörleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda *NM23-H1* ekspresyonunun tümör dokularda azaldığı saptanmıştır. Mevcut tez çalışmasında 64 tümör ve normal doku karşılaştırıldığında, *NM23-H1* geninde yaklaşık 2 kat azalma belirlendi ve istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi ($P < 0.05$). Kapitanovic ve arkadaşlarının yine aynı çalışmalarında (35) kolorektal tümörlerde evreler arası *NM23-H1* ekspresyonunu incelenmiştir ancak bir farklılık gözlemlenmemiştir. Mevcut çalışmada *NM23-H1* ekspresyonun ileri evrede düştüğü belirlendi ($p > 0.05$). Cheah ve arkadaşları da kolon tümörlerinde gerçekleştirdikleri çalışma ile tümör evreleride ve *NM23-H1* ekspresyonu arasında bir korelasyon belirlemişlerdir. Aynı çalışmada *NM23-H1* ekspresyonunun erken evre ve düşük metastatik potansiyelli tümörlerde, yüksek metastatik potansiyelli olan ileri evrelere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Mevcut tez çalışmasında, daha sonraki yıllarda uzak metastaz gösteren hastalara ait erken evre tümör dokular ile metastaz göstermeyen erken evre tümör dokularda *NM23-H1* ekspresyonu karşılaştırıldığında, metastaz gösteren hasta dokularında 6.21 kat düşüş gösterdi ve istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi ($p = 0.024$). Elde edilen bu bulgu ile sporadik gelişen kolorektal tümörlerde *NM23-H1* ekspresyon seviyesinin yükseltilmesine yönelik girişimlerin metastatik potansiyeli baskılayabileceğini düşündürmektedir.

MET, en önemli proto-onkogen genlerden biridir. Hücre büyümesi, farklılaşması ve doku tamiri gibi birçok hücresel süreçte düzenleyici olarak görev alan HGF/*MET* sinyal yolağında anahtar rol üstlenmektedir (36). HGF/*MET* sinyal yolağında ki önemli görevinden dolayı *MET* ekspresyonu

baş-boyun, meme, akciğer, gastrik, over, pankreas olam üzere birçok sloid tümörde araştırılmış ve çalışmalar sonucunda *MET* proto-onkogeninin onkogene dönüşmesi sonucunda tümör gelişimi ve metastaz oluşumunun başladığı gösterilmiştir (37,38). Boccacio ve arkadaşları kolorektal kanser tümörlerinde *MET* ekspresyonunun yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Mevcut tez çalışmasında, bormal dokular ile karşılaştırıldığında erken evre tümör dokularında *MET* ekspresyonunun 31.76 kat yüksek olduğu görüldü ($p < 0.05$). Fischer ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptıkları çalışma (38) ile *MET* ekspresyonunun ileri evre tümörlerde artış gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan birçok çalışma ile ailesel kanserlerde *MET* gen mutasyonlarının varlığı, sporadik tümörlerde ise gen mutasyonun nadir rastlanıp ekspresyonun arttığı bildirilmiştir (6). Sporadik kolorektal tümörler ile yapılan tez çalışmasında, *MET* ekspresyonunun evrel-II ile karşılaştırıldığında özellikle evre III' ler de 3.5 kat anlamlı yükselişi gözlemlendi ($p = 0.01$). Bununla birlikte, *MET* ekspresyonunun özellikle metastatik potansiyel taşıyan düşük evreli tümörlerde arttığı belirlendi ($p = 0.03$). c-*MET*' in yüksek ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmekte ve bu genin amplifikasyonu bazı kemoterapik ilaçlara karşı dirence sebep olmaktadır. Birçok çalışma ile *MET* i hedef olarak HGF/*MET* sinyal yolağını inhibe edici yeni moleküllerin ya da ilaçların bulunması hedeflenmiştir. Günümüzde *MET* ekspresyonu prognostik bir belirteç olarak kullanılmakta ve tirozin kinaz inhibitörleri ve geliştirilen farklı ilaçlar ile bu sinyal yolağı baskılanmaktadır. Sporadik gelişen türk popülasyonuna ait kolorektal tümörlerde *MET* ekspresyon profilini belirleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut tez çalışması ile, Türk popülasyonunda da *MET* in yüksek ekspresyonunun düşük evreli tümörler için prognostik bir belirteç olabileceği görülmektedir.

Stein ve arkadaşlarının 2009 yılında metastatik kolorektal kanser tümörleriyle çalışma ile *MACC1* genini tanımlamışlardır (4). Stein ve arkadaşları daha sonraki çalışmalarında, *MACC1* geninin hücre kültürü deneylerinde proliferasyonda, invazyonda ve migrasyonda rol oynadığını bulmuşlardır (27). Yine aynı süreçte bu genin *MET* onkogenininin transkripsiyonunu arttırarak HGF/*MET* sinyal yolağında görev aldığını ve

böylece metastaz oluşumunda görev aldığını belirtmişlerdir (28). Daha sonra çeşitli grupların yaptıkları araştırmalar ile *MACC1* yüksek ekspresyonu, meme ve karaciğer tümörlerinde ve epitelyum hücre kanserlerinde kötü prognoz ve düşük yaşam süresi ile ilişkilendirilmiştir (41). Mevcut tez çalışmasında, *MACC1* ekspresyonu tümör dokuda normal dokuya göre 34 kat artış gösterdi ($p= 0.03$). *MACC1* ekspresyonu klinik parametreler ile karşılaştırıldığında, tümör boyutu, lokalizasyonu ya da müsinöz komponent varlığı ile herhangi bir istatistiksel anlamlılık elde edilememiştir. Ancak evreler arası yapılan karşılaştırmada *MACC1* ekspresyonunun lenf nodu metastaz varlığı ile karakterize edilen evre III tümörlerinde anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi ($p= 0.04$). Lenf nodu metastazı bulunan tümörler ile lenf nodu metastazı içermeyen tümörler karşılaştırıldığında *MACC1* yüksek ekspresyonunda anlamlılık gözlemlendi. Stein ve arkadaşlarının *MACC1* ile ilgili yaptıkları ikinci çalışmada da (21), metastatik potansiyelin yüksek olduğu hasta grubundan bu genin ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Ayrıca mevcut tez çalışmasında, belirlenen hasta grubunun erken evre tümörlerinde *MACC1* ekspresyon analizleri yapıldı. Arşiv materyallerinde, 5 yıllık takip sürecinde uzak metastaz gelişen erken evre tümörlerde, *MACC1* ekspresyonu ile metastaz göstermeyen hastalara ait erken evre tümör dokularındaki *MACC1* ekspresyonu karşılaştırıldı ve metastaz gösteren gruba ait tümör dokuda anlamlı ekspresyon artışı belirlendi. Kolorektal kanserde erken evre ifade edilen ve tanısal belirteçleri oldukça yetersiz olan evre I-II tümörleri içerisinde uzak metastaz gösteren ve göstermeyen erken evre tümörlerinde *NM23-H1*, *MET* ve *MACC1* ekspresyonlarına bakıldığında *NM23-H1* ekspresyonunda düşüş, *MET* ve *MACC1* ekspresyonlarında ise artış saptandı ve *MACC1*' in bu yüksek ekspresyonunda anlamlılık belirlendi. Elde edilen bulgular sonucunda *MACC1*' in yüksek ekspresyonunun Türk populasyonunda özellikle erken evreli tümörlerde hem tanısal hem de metastatik potansiyel için bir biyobelirteç olabileceği gösterildi.

Mevcut çalışmanın sınırlamaları; vaka sayısının azlığı (Türk populasyonunda 30-60 yaş arası tanı almış, aile hikayesi olmayan, evre I, evre II ve evre III kolorektal kanser tümörlerine sahip 64 hastaya ait tümör ve

normal doku ele alındı.) sebebiyle farklılık belirlenen tüm parametrelerde istatistiksel anlamlılığa ulaşamadı. Çalışmaya dahil edilen hastaların bir çoğu hayatta olduğu için mevcut çalışmada survi analizi yapılamadı.

Sonuç olarak, mevcut çalışma Türk popülasyonuna ait, aile hikayesi bulunmayan ve kemoterapi ya da radyoterapi tedavisi görmemiş kolorektal kanser hastalarına ait tümör dokularda; farklı popülasyonlarda metastaz ile ilişkilendirilen ve tanı, tedavi ve hasta takibinde birer etkili biyobelirteç olarak belirlenen *NM23-H1*, *MET* ve *MACC1* ekspresyonlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Türk popülasyonuna ait genç yaşta gelişen tümörde, *NM23-H1*' in düşük, *MET* ve *MACC1*' in ise yüksek seviyelerdeki ekspresyonlarının bu hasta grubunun metastatik potansiyeli için belirleyici oldukları bulunmuştur. Elde edilen bulgular ışığında; sporadik olarak gelişen bu tümörlerde be genlerin ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar değerlendirilerek, tümörün agresivitesi ve hastada metastaz gelişebilme riski ile ilgili bilgi edinilebileceği düşünülmektedir. Böylece diğer kolorektal kanser hastaları ile benzer tedavi yaklaşımları uygulanarak takip edilen bu hasta grubunda, etkin tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesinde katkı oluşturarak hastaların yaşam süresinin ve kalitesinin iyileştirilebilmesine imkan sağlanabilecektir. Bu özellikteki tümörlerin tedavisinde, *MET* ve *MACC1* genlerinin ekspresyonları düşürecek ya da *NM23-H1* geninin ekspresyonunu arttıracak yeni moleküllerin ve yöntemlerin bulunmasında, çalışmanın kaynak oluşturabileceği düşünülmektedir. Çalışmada elde edilen bulgular; Türk popülasyonunda sporadik kökenli erken evreli tümörlere sahip hastalarda kötü prognozun takibini sağlayabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi konusunda uluslararası ve ulusal literatüre katkı sağlar niteliktedir.

Çalışmada elde edilen bulguların bundan sonraki ileri fonksiyonel çalışmalar için yol gösterici olması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Aiello M, Vella N, Cannavo C, Scalisi A, Spandidos DA, Toffoli G, Buonadonna A, Libra M, Stivala F. Role of genetic polymorphisms and mutations in colorectal cancer therapy (Review). *Molecular Medicine Reports*, 2011;4:203-8.
2. Beder A, Krasinskas AM. Molecular Diagnostics of Colorectal Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:204-15.
3. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Listrom MB, Rilke FO. Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. In: *Gastrointestinal pathology an atlas and text* 1999:909-1068.
4. Stein U, Walther W, Arlt F, Schwabe H, Smith J, Fichtner I, Birchmeier W, Schlag PM. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat Med* 2009;15:59-67.
5. Lee HY, Lee H. Inhibitory activity of nm23-H1 on invasion and colonization of human prostate carcinoma cells is not mediated by its NDP kinase activity. *Cancer Lett* 1999;145:93-9.
6. Anne BB, Clive A. Colorectal cancer. Clinical review. *BMJ* 2007;335:715-8.
7. Migliore , Migheli F, Spisni R, Coppede F. Genetics, Cytogenetics and Epigenetics of Colorectal Cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:792362.
8. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:100-15.
9. Labianca R, Beretta DG, Kildani B. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;2:106-33.
10. Yilmazlar T, Zorluoglu A, Ozguc H, Korun N, Duman H, Kaya E, Kizil A. Colorectal cancer in young adults. *Tumori* 1995;8:230-3.
11. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ. Colorectal cancer. *The Lancet* 2010;375:1030-47.
12. Kim MH, Kim H. Oncogenes and tumor suppressors regulate glutamine metabolism in cancer cells. *J Cancer Prev.* 2013;18:221-6.
13. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;21:11-27.
14. Walther A, Johnstone E, Swanton C. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 2009;9:489-99.
15. Walther A, Houlston R, Tomlinson I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut*, 2008;57:941-50.
16. Goldstein NS. Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecular and morphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification. *Am J Clin Pathol*, 2006; 125:1461-453.

17. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2004;23:11-27.
18. Kim H, Jen J, Volgestein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*,1994;145:148-56.
19. Pancione M, Remo A, Colantuoni V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Pathol Res Int*, 2012;10:509348.
20. Barrow TM, Michels KB. Epigenetic epidemiology of cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;455:70-83.
21. Toyota M, Ohe M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:710–5.
22. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000;100:57-70.
23. Arlt F, Stein U. Colon cancer metastasis: MACC1 and MET as metastatic pacemakers. *Int J Biochem Cell Biol*,2009;41:2356-9.
24. Mikulits W. Epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma *Ann Pathol*. 2009: 65-6.
25. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Molecular Pathways*,2009;15: 4263-9.
26. Zaanani A, Laurent-Puig P, Taieb J. MET signalling pathway and its therapeutic implications in gastrointestinal cancers, *Bull Cancer*,2009; 101:25-30.
27. Lemos C, Sack U, Schmid F, Juneja M, Stein U. Anti-metastatic treatment in colorectal cancer: targeting signaling pathways. *Curr Pharm Des* 2013;19:841-63.
28. Stein U, Dahlmann M, Walther W. MACC1 - more than metastasis? Facts and predictions about a novel gene. *J Mol Med* 2010;88:11-8.
29. Stein U. MACC1 - a novel target for solid cancers. *Expert Opin Ther Targets*,2013;17:1039-52.
30. Kapoor S. nm23H1 expression and its role in the evolution of non-gastrointestinal malignancies. *World J Gastroenterol*,2009;15:506-17.
31. Steeg PS, Horak CE, Miller KD. Clinical-translational approaches to the Nm23-H1 metastasis suppressor, *Clin Cancer Res*,2008;15:5006-12.
32. Lin XQ, Liang Y, Ding SP, Li JC. Genetic instability on chromosome 17q21 in gastric cancer of Chinese patients, *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*,2005;38:148-56.
33. Ouatas T, Clare SE, Hartsough MT, De La Rosa A, Steeg PS. MMTV-associated transcription factor binding sites increase nm23-H1 metastasis suppressor gene expression in human breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis*,2002;19:35-42.
34. Kapitanović S, Cacev T, Berković M, Popović-Hadžija M, Radosević S, Seiwert S, Spaventi S, Pavelić K, Spaventi R. nm23-H1 expression and loss of heterozygosity in colon adenocarcinoma. *J Clin Pathol*,2004;52:1312-8.

35. Kapitanović S, Cacev T, Radosević S, Spaventi S, Spaventi R, Pavelić K. APC gene loss of heterozygosity, mutations, E1317Q, and I1307K germ-line variants in sporadic colon cancer in Croatia. *Exp Mol Pathol*,2004;77:193-200.
36. Birchmeier W, Brinkmann V, Niemann C, Meiners S, DiCesare S, Naundorf H, Sachs M. Role of HGF/SF and c-Met in morphogenesis and metastasis of epithelial cells. *Ciba Found Symp*,1997;212:230-40.
37. Gelsomino F, Rossi G, Tiseo M. MET and Small-Cell Lung Cancer. *Cancers*, 2014;13:2100-15.
38. Twardowski PW, Mack PC, Lara PN Jr. Papillary renal cell carcinoma: current progress and future directions. *Clin Genitourin Cancer*,2014; 12:74-9.
39. Fischer J, Palmedo G, von Knobloch R, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, Kovacs G. Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene*,1998;17:733-9.
40. Yao Y, Dou C, Lu Z, Zheng X, Liu Q. MACC1 Suppresses Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma by Targeting the HGF/c-MET/AKT Pathway. *Cell Physiol Biochem*,2015;35:983-96.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim esnasında bilgi, beceri ve deneyimleriyle bana ışık tutan, bu naçizane mesleği öğrenmemde gösterdikleri çabalar için minnettar olduğum ve beraber olmaktan sonsuz memnunluk ve mutluluk duyduğum, başta tez hocam Doç.Dr.Ersin Öztürk olmak üzere tüm Genel Cerrahi AD öğretim üyelerine en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Tezimin hazırlık aşamasında yardımlarını ve desteğini benden esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Araştırma Görevlisi Seçil Ak'a, eğitimim boyunca beraber olmaktan keyif aldığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tüm Genel Cerrahi çalışanlarına da her zaman için bana gösterdikleri yakın dostluk için teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

07 Ağustos 1983 tarihinde Erzurum'da doğdum. İlköğrenimimi Erzurum İnönü İlkokulunda, orta öğrenimimi Erzurum Anadolu Lisesi ve lise öğrenimimi Erzurum Fen Lisesinde tamamladım. 2001 yılında girmeye hak kazandığım Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2007 yılında mezun oldum. 2010 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Genel Cerrahi AD'da göreve başladım. Halen bu kurumda Araştırma Görevlisi olarak görevime devam etmekteyim. Evli ve iki çocuk babasıyım.