T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

HCT116 KOLOREKTAL KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA *PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİT SENTAZ 2 (PTGS2)* VE *KERATİN19 (KRT19)* GEN ANLATIMLARININ TRANSKRİPSİYONEL DÜZEYDE İNCELENMESİ

ELİF ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ FİLİZ SAĞLAM

İSTANBUL-2020

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

HCT116 KOLOREKTAL KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA *PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİT SENTAZ 2 (PTGS2)* VE *KERATİN19 (KRT19)* GEN ANLATIMLARININ TRANSKRİPSİYONEL DÜZEYDE İNCELENMESİ

ELİF ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ FİLİZ SAĞLAM

İSTANBUL-2020

T.C. İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Dr. Öğretim Üyesi Filiz SAĞLAM
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER	İstinye Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Filiz SAĞLAM	İstinye Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Meryem ALAGÖZ	Biruni Üniversitesi

Elif Cınar-Yüksek Lisans Tezi

ORIJINALLIK RAPORU

%17	%10	%2	%15
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%2
2	molekulerbiyolojivegenetik.org İnternet Kaynağı	%2
3	Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam University Öğrenci Ödevi	%1
4	Submitted to Ataturk Universitesi Öğrenci Ödevi	%1
5	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
6	www.ulusaltezmerkezi.net İnternet Kaynağı	%1
7	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
8	vantipdergisi.yyu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1

T.C
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ‘’HCT116 Kolorektal Karsinoma Hücre Hattında *Prostaglandin Endoperoksit Sentaz 2* (*PTGS2*) ve *Keratin19* (*KRT19*) Gen Anlatımlarının Transkripsiyonel Düzeyde İncelenmesi’’ adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Elif ÇINAR

ÖZET

HCT116 KOLOREKTAL KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA PROSTAGLANDİN ENDOPEROKSİT SENTAZ 2 (PTGS2) VE KERATİN 19 (KRT19) GEN ANLATIMLARININ TRANSKRİPSİYONEL DÜZEYDE İNCELENMESİ

Elif Çınar
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı
Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Filiz SAĞLAM
2020

Çalışmadaki amaç; HCT116 kolorektal kanser hücre hattında *prostaglandin endoperoksit sentaz 2 (PTGS2), Keratin19 (KRT19)* genlerinin transkripsiyon düzeyindeki gen anlatımlarının belirlenmesi ve karşılaştırılmasıdır. Bu çalışmada hücre kültürü teknikleri, yarı manuel kit ile RNA izolasyonu, termal döngü cihazında cDNA sentezi ve eş zamanlı kantitatif PCR yöntemleri kullanılmıştır. Kültüre edilen kolon hücre hattından total RNA izole edilip enzimatik olarak tamamlayıcı DNA'lara dönüştürülmüştür. Son olarak PTGS ve KRT19 genlerine özgü tasarlanan primerler ile eş zamanlı PCR yapılmıştır.

Sonuç olarak gerçek zamanlı PCR sonuçlarının delta delta Ct hesaplaması ile HCT116 hücre hattında KRT19 gen ifadesinde 93,7 kat artış olduğu; *PTGS2* gen ifadesinde ise 5,88 kat azalma olduğu saptanmıştır. *PTGS2* ve KRT19 genlerinin kolorektal kanser gelişiminde rol alabileceği ve ileride yapılacak detaylı çalışmalarla prognostik öneme sahip olacağı ön görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal karsinoma, qPCR, *PTGS2*, KRT19

ABSTRACT

TRANSCRIPTIONAL EXAMINATION OF GENE PROSTAGLANDIN ENDOPEROXIDE SYNTHASE 2 (PTGS2) AND KERATIN19 (KRT19) EXPRESSION IN HCT116 COLORECTAL CARCINOMA CELL LINE

Elif Cinar
Medical Biology and Genetics Master Program
Advisor's: Asst. Prof. Filiz SAGLAM
2020

The purpose of the study; HCT116 is the determination and comparison of gene expression at the level of transcription of *Prostaglandin Endoperoxide Synthase 2 (PTGS2), Keratin19 (KRT19)* genes in colorectal cell line. In this study, cell culture techniques, RNA isolation with semi-manual kit, cDNA synthesis in the thermal loop device and simultaneous quantitative PCR methods were used. Total RNA was isolated from the cultured colon cell line and transformed into complementary DNA enzymatically. Finally, PCR was performed simultaneously with the primers designed for *PTGS2* and *KRT19* genes.

As a result, there was 93,7 fold increase in *KRT19* gene expression in the HCT116 cell line with the delta delta Ct calculation of the real-time PCR results; *PTGS2* gene expression was found to be 5,88 time less. It is predicted that *PTGS2* and *KRT19* genes may play a role in the development of colorectal cancer and will have prognostic significance with future studies.

Keywords: Colorectal carcinoma, qPCR, *PTGS2*, KRT19

TEŞEKKÜR

Bilim denen sonsuzluğun kapısını aralamak üzere çıktığım bu yolun basamaklarından olan yüksek lisans eğitimimin başından sonuna ve tezimin yazımında sabrını ve desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Süreyya BOZKURT, tez danışmanı hocam Dr. Öğr. Üyesi Filiz SAĞLAM ve Araştırma Görevlisi Hüseyin AYHAN'a teşekkürü bir borç bilmekteyim.

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı hocamız Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e de bu süreçte verdiği tüm desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Zorlu laboratuvar ve tez yazım sürecini birlikte aştığımız sevgili bölüm arkadaşlarım Duygu KAYA, Hacer KOTAN, BÜŞRA KÖSE, Hüma Tuğçe SEZGİN ve Ceren AYNACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Fikirleriyle yolumu aydınlatan, görüş açımı genişleten ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili yol arkadaşım Tolga KILIÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Öte yandan bir teşekkürde; bu günlere gelmemde ve eğitim hayatımın başından sonuna kadar destek ve emeğini esirgemeyen başta annem Oya ÇINAR, babam Ergün ÇINAR ve kardeşim Merve ÇINAR'a sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY
ETİK BEYANI
ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **v**
TABLO LİSTESİ ..... **vi**
GİRİŞ **1**
1. GENEL BİLGİLER **1**
1.1. KOLON KANSERİ 1
1.1.1. Epidemiyoloji 2
1.1.2. Kolorektal kanser aşamaları 2
1.1.3. Kolon kanserinde risk faktörleri 3
1.1.4. Kolorektal kanser moleküler mekanizması 4
1.2. HCT116 HÜCRE HATTI 7
1.3. *PTGS2* ve *KRT19* GENLERİ 7
1.4. KANTİTATİF PCR (qPCR) 9
2. MATERYAL VE METOD **10**
2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ 10
2.1.1. Besiyeri Hazırlanışı 10
2.1.2. Hücre Hatlarının Stoktan Çıkartılması 10
2.1.3. Besiyeri Değiştirme 11
2.1.4. Hücre Kültürünün Pasajlanması 11
2.1.5. Hücre Soylarının Hazırlanması ve Stoklanması 12
2.1.6. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı 12
2.2. TOTAL RNA İZOLASYONU 13
2.3. KOMPLEMENTER DNA (cDNA) SENTEZİ 14
2.4. KANTİTATİF PCR (qPCR) 16
3. BULGULAR **18**
3.1. KANTİTATİF PCR (qPCR) SONUÇLARININ ANALİZİ 18
4. TARTIŞMA VE SONUÇ **21**
KAYNAKLAR **24**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: HCT116 hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü 11
Şekil 3.1: *KRT19* geninin Ct ve Tm grafiği..... 19
Şekil 3.2: *PTGS2* geninin Ct ve Tm grafiği..... 19

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri 14
Tablo 2.2: cDNA sentez reaksiyonunda kullanılan bileşenler 15
Tablo 2.3: cDNA sentez reaksiyonundaki aşamalar 15
Tablo 2.4: Tasarlanan primer dizileri 16
Tablo 2.5: qPCR reaksiyonu bileşenleri 17
Tablo 2.6: qPCR döngü aşamaları 17
Tablo 2.7: Ct değerleriyle ifade değişim oranını hesaplama sonuçları 20

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
APC	: Adenomatozis Polipozis Coli
BCL2	: Basal Cell Lymphoma 2
ATCC	: American Type Tissue Culture Collection
CALR	: Calreticulin
cDNA	: Complementary DNA
CIMP	: CpG Island Methylator Phenotype
CIN	: Chromosomal Instability
CO2	: Karbondioksit
COX2	: Cyclooxygenase 2
Ct	: Cycle of Treshold
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksi- Nucleoside Triphosphate
DTT	: Dithiothreitol
EGF	: Epidermal Growth Factor
EMT	: Epithelial Mesenchymal Transition
FBS	: Fetal Bovine Serum
GAPDH	: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
g	: Gravite
IARC	: International Agency for Research on Cancer
IBD	: İnflamatuar barsak hastalıkları
IL-1	: İnterlökin-1
KRT19	: Keratin 19
M	: Molar
mL	: Mililitre
MMR	: Mismatch Repair
mRNA	: Messanger RNA
MSI	: Microsatellite Instability
NF-kB	: Nükleer Faktör- Kappa B
ng	: Nanogram
OD	: Optik Density
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PGE2	: Prostaglandin E2
PTGS2	: Prostaglandin Endoperoksit Sentaz 2

qPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA	: Ribo Nükleik Asit
rpm	: Rounds per minute
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Institue-1640
RTE	: Reverse Transcription Enzyme
RT-PCR	: Real- Time Polymerase Chain Reaction
TGFB	: Transforming Growth Factor Beta
Tm	: Melting temperature
TP53	: Tümör Protein 53
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
ΔΔCt	: Delta Delta Cycle of Treshold

GİRİŞ

Kolon kanserinde karsinogenezi dolaylı yoldan etkileyen genlerdeki ifade değişimlerinin anlaşılması, kanserin başlangıç mekanizmasının anlaşılabilmesi açısından oldukça dikkat çekici ve önemli bir konudur. Meydana gelen mutasyonların yanı sıra, karsinogeneze etki ettikleri bilinen genlerin ifade düzeylerinin saptanması, yeni inhibitörlerin ve antikor bazlı ilaçların geliştirilmesi için ve ilaç hedefi olabilecek reseptörlerin belirlenmesi için önem arz etmektedir. Bu çalışmadaki amaç; karsinogeneze etkileri olduğu bilinen *KRT19*, *PTGS2* genlerinin anlatım düzeylerinin transkripsiyonel düzeyde araştırılmasıdır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1.KOLON KANSERİ

Kanser, vücuttaki kontrolsüz hücre büyümesinin bir sonucu olarak gelişir. Vücudumuzun hemen hemen her yerindeki hücreler kanserli hale gelebilir ve diğer bölgelere yayılabilir.

Kolon veya rektum kaynaklı kanserlere kolorektal kanser denir. Bu kanserler, kaynaklandıkları bölgeye bağlı olarak doğrudan kolon kanseri veya rektum kanseri olarak adlandırılabilse de, paylaştıkları birçok özellik nedeniyle ortak bir grup içinde düşünülürler.

Kolorektal kanser kadın ve erkekler arasında teşhis edilen en yaygın üçüncü kanser türüdür (Siegel ve ark., 2017). Kolon epitel hücrelerinde onları adenokarsinomlara dönüştüren genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklanır.

Karsinogenezdeki ilk aşama kolon veya rektumun iç tabakasındaki polip adı verilen büyümelerdir. İki ana polip tipi ise adenomatöz polipler (adenomlar) ve hiperplastik ve enflamatuar poliplerdir. Adenomlar, kansere dönüşebildiğinden, kanser öncesi lezyonlar olarak kabul edilir ve kolorektal kanserlerin %95'ini oluşturur.

Kolon kanseri, insan sağlığını tehlikeye atan yaygın bir malign tümördür. Morbidite ve mortalitesi yıldan yıla artmaktadır. Tedavisi ile ilgili araştırmalar da sürekli ilerlemektedir. Kolon kanseri patogenezi üzerine yapılan araştırmaların derinleştirilmesi ile tedavi, cerrahi ve kemoradyoterapiden bireysel tedavi kavramına kaymıştır. İlerlemiş kolorektal karsinoma hastaları, özellikle metastazı olanlar için etkili bir tedavi yöntemi yoktur (Punt ve ark., 2017; Torring ve ark., 2019; Spartalis ve ark., 2019).

1.1.1. Epidemiyoloji

Bir kalın barsak hastalığı olan kolorektal kanser, erkeklerde akciğer ve prostat, kadınlarda ise akciğer ve meme kanserinden sonra en sık görülen kanser türüdür. Güncel olarak 1,8 milyon tanı ile toplam kanser vakalarının %10,2'sini oluşturmaktadır (Bray ve ark., 2018).

Kolorektal kanser kadınlar ve erkekler birlikte değerlendirildiğinde 3. en sık görülen kanser türüdür. Dünya genelinde erkeklerde en çok tanı konulan ve ölüme sebep olan kanser türü akciğer kanseriyken, ardından prostat kanseri ve kolorektal kanser gelmektedir. Kadınlarda ise meme kanseri insidans ve ölümcüllük açısından ilk sırada yer alırken, akciğer kanseri ikinci sırada ve kolorektal kanser %9,5 ile üçüncü sırada yer almaktadır (Bray ve ark., 2018). 2015 yılı Türkiye kanser istatistiklerine göre Türkiye'de hem kadınlarda hem de erkeklerde 3.sırada görülmektedir. Kadınlarda 14,4/100.000 ve erkeklerde 23,1/100.000 sıklığında görülmektedir (TÜİK, 2015).

1.1.2. Kolorektal Kanser Aşamaları

Kolorektal kanser, "tekrarlayan" adı verilen beşinci aşama ile birlikte dört ayrı aşamada sınıflandırılır. Amerikan Kanser Ortak Komitesine göre, her aşama beş yıllık sağkalım oranları ile farklı tedavi seçeneklerine sahiptir (http://www.cancerstaging.org).

Aşama 0; kolonun mukozal astarında poliplerin oluştuğu kolon kanserinin çok erken aşamasıdır. Kolonoskopi sırasında polipler polipektomi ile tamamen ortadan kaldırılır. Bu, kolon kanserinin ileri evrelerinin ortaya çıkmasını önler.

Aşama I; bu aşamada polip bir tümöre dönüşür ve mukozanın iç astarını işgal eder. Genellikle cerrahi, dokuların kanserli kısmının kanserli olmayan kısımdan ayrıldığı bu aşama kolon kanserini tedavi etmek için ana seçenektir. Bu aşamada kolon kanseri tespit edilirse sağkalım oranı %95 civarındadır.

Aşama II; Bu aşama, kanserin kas tabakasına veya kolonun en dış tabakasına veya kolonun ötesine yayılmasına bağlı olarak Aşama IIA, Aşama IIB ve Aşama IIC olarak alt kategorilere ayrılır. Rezeksiyon cerrahisi kolon kanserinin bu evresini tehdit eden tek seçenektir ve bu evrede hastaların sağkalımı % 85'tir.

Aşama III; kolon kanseri bu aşamada kolonun tüm duvarına ve ayrıca çevresindeki lenf düğümlerine yayılmıştır ve sağkalım oranı yaklaşık %30-60'tır. Kanserin bu aşaması, kanserin kolonun ve çevresindeki lenf düğümlerinin iç, orta ve dış tabakasına yayılmasına bağlı olarak evre III a, b ve c'ye ayrılır. Ameliyatla birlikte, bu kanseri tedavi etmek için kemoterapi ve diğer tıbbi tedavi gereklidir.

Aşama IV; bu aşamada kanser, karaciğer, yumurtalık, testis, bağırsaklar gibi vücudun diğer bölümüne / organına yayılmıştır. Hayatta kalma oranı sadece %3'tür. Cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, radyasyon tedavisi uygulanır. Kolonoskopi, rutin kontrollerinde 50 yaş ve üstü için önerilir (Heidelbaugh ve Tortorello, 2012).

1.1.3. Kolon Kanserinde Risk Faktörleri

Kolorektal kanser riskini arttıran semptom ve bulgular tümörün lokalizasyonu, makroskopik yapısı tümörün yayılım derecesi ve kanama, perforasyon ve tıkanma gibi komplikasyonların oluşumuna göre değişir. Kolon kanserlerinin başlangıcı barsak içindeki hücre büyümeleri yani poliplerdir. Çoğu adenoma kökenlidir ve karsinomaya dönüşür (Steele ve Mayer, 1991).

Primer kolorektal kanserlerin %95'ini adenokarsinomlar oluşturur. Kolon kanserlerinin %60'ı distal kolonda, tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık %30'u rektumda, %20'si sigmoid kolonda yerleşir ve sıklıkla proksimale gittikçe azalır ancak çekumda hafifçe artarak %25'lere ulaşır (Noyan ve ark., 1988; Shrock, T., 1989; Muslumanoglu, M., 2000; Onuk ve Tekin, 2000).

Kanser oranının %75'ini hiçbir risk faktörü bulunmayan sporadik kanser olguları oluşturur (Shelton ve Wong, 1999). Adenomatöz polipler başta olmak üzere, hemartomatöz ve jüvenil polipozis sendromlarında da kolorektal kanser riski artar (Desai ve ark., 1995; Spigelman ve ark., 1989). Meme, over ve uterus kanserlerinde kolorektal kanser gelişme riski iki kat artmıştır (Rosen ve ark., 1986).

Kolorektal kanser riskini arttıran bazı risk faktörleri olduğu çeşitli araştırmalar ile gösterilmiştir. Bazıları diyet ve yaşam tarzıyla ilgili faktörlerden etkilenirken, bazıları genetik yatkınlıkla ilişkilidir. Diğer bir risk faktörü, Crohn veya ülseratif kolit gibi uzun süredir devam eden inflamatuar barsak hastalıklarının (IBD) varlığıdır. Bazı çalışmalar, sigara içmek, alkol kullanımı, yüksek oranda yağlı ürün, düşük oranda posalı yiyecek tüketimi, düşük fiziksel aktivite ve obezitenin dahil olduğunu doğrulamıştır. Ek olarak, birçok risk faktörünün bir kombinasyonunu içeren kolon kanseri patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır ve bu alanlarda araştırma çalışmaları devam etmektedir (Le Marchand ve ark., 1997; Slattery, M.L., 2004; Xie ve Itzkawitz, 2008; Rothwell ve ark., 2010; Agnoli ve ark., 2013).

1.1.4. Kolorektal Kanser Moleküler Mekanizması

Kolorektal kanserler, çeşitli genomik ve epigenomik değişiklikler ile karakterize olan bir grup moleküler olarak heterojen hastalıkları temsil eder (De Souza ve ark., 2013; Sadanandam ve ark., 2013; Giannakis ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014; Carethers ve Jung, 2015; Guinney ve ark., 2015; Phipps ve ark., 2015; Sinicrope ve ark., 2015; Becht ve ark., 2016; Ravindranath ve Cadigan, 2016; Sinicrope ve ark., 2016; Boudjadi ve ark., 2017; Chang ve ark., 2017; Lee ve ark., 2017; Marmol ve ark., 2017; Vu ve Datta, 2017). Genomik ve epigenomik instabilite, neoplaziyi normal kolon epitelinden ayırır ve kolorektal karsinogenezin en belirgin özelliğidir (Hanahan ve Weinberg, 2000; Little ve ark., 2008).

Anahtar moleküler biyobelirteçler, kolorektal kanserlerin biyolojik heterojenliğini anlamak ve prognoz, tedavi yanıtı ve nüks riskini tahmin etmek için kullanılabilecek alt tipleri sınıflandırmak açısından önemlidir. Bu temel moleküler özellikler veya yollar potansiyel olarak kişiselleştirilmiş tedaviler için hedefleri temsil edebilir (Inamura, K., 2018).

Mevcut moleküler sınıflandırma modellerinin çoğu Mikrosatellit Kararsızlığı (MSI), kromozomal kararsızlık (CIN) ve CpG adası Metilatör Fenotipi (CIMP) üzerine dayanmaktadır (Gyparaki ve ark., 2013; Schweiger ve ark., 2013).

En yaygın genomik instabilite şekli, kolorektal kanserlerin %85'inde bulunan CIN yani kromozomal kararsızlıktır (Grady ve Carethers, 2008). Anöploidi veya poliploidi varlığı ile tanınabilen kromozomal instabilite, sayısal kromozom değişikliklerinin veya kromozomların çoklu yapısal sapmalarının varlığı olarak tanımlanır. Akış sitometrisi, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon, bütün ekzom dizilimi ve yüksek yoğunluklu SNP dizileri dahil olmak üzere çeşitli tekniklerle değerlendirilir (Grady ve Carethers, 2008; Walther ve ark., 2008; Wang ve ark., 2014).

Kolorektal kanserde CIN nedenlerini belirleme konusunda önemli ilerleme kaydedilmesine rağmen, altta yatan mekanizmalar bilinmemektedir (Vogelstein ve ark., 1988; Lengauer ve ark., 1998; Pino ve Chung, 2010). Olası mekanizmalar arasında kromozom ayrımı, telomer disfonksiyonu ve TP53 ve APC gibi kritik genleri etkileyen DNA hasarı yanıtındaki değişiklikler bulunur. Ana hücre döngüsü kontrol noktası geni olan TP53'ün fonksiyon kaybı mutasyonları, hücre döngüsünde kontrolsüz girişe neden olur (Pino ve Chung, 2010). Kromozomal segregasyondaki kusurlarla ilişkili olan APC mutasyonları (Fodde ve ark., 2001), CIN (Pino ve Chung, 2010) ile de güçlü bir şekilde bağlantılıdır ve bu nedenle kromozomal instabiliteye yol açması ve kolorektal kanserde, kanser oranının ilerlemesini arttırması muhtemeldir. APC, WNT sinyal yolunun bir parçasını oluşturur ve inaktivasyonu, hücre proliferasyonunda artışla sonuçlanır. Bu nedenle, WNT sinyal yolu CIN kolorektal kanserlerde bekçi rolü oynar. WNT proteinleri, embriyonik indüksiyon, hücre polaritesi oluşturma, yetişkin homeostazının korunmasında da dahil olmak üzere çeşitli gelişimsel süreçlerde önemli rollere sahip, yüksek glikolize edilmiş, salgılanmış proteinlerin bir ailesidir.

Mikrosatellit karasızlığı (MSI), kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %22'sinde pozitiftir. Kolorektal kanserler genellikle CIN tümörlerinden karşılıklı olarak dışlanmış sayılır çünkü tipik olarak bir diploid karyotip gösterirler ve CIN'de görülenlerden farklı bir dizi farklı gen mutasyonları taşırlar. Kolorektal kanserler, hem CIN hem de MSI'yı gösteren bir kolorektal kanser alt kümesi olarak görülmektedir. Mikrosatellitler, DNA replikasyonu sırasında çerçeve kayması mutasyonlarına ve baz çifti ikamelerine eğimli kısa tekrarlayan DNA nükleotit sekanslarıdır. CIN'nin aksine MSI'nın altındaki mekanizmalar nispeten iyi anlaşılmıştır ve genellikle DNA Yanlış Eşleşme Onarımı (MMR) ailesindeki

genlerin normal olmayan DNA metilasyonu veya somatik mutasyon ile inaktivasyonunu içerir (Grady, W.M.,2004). Ayrıca, kalıtsal kanser sendromu olan bireyler, Lynch Sendromu, neredeyse sadece MSI kolorektal kanserleri geliştirir, çünkü bunlar, MLH1, MSH2, MSH6'yı içeren MMR genlerinden birinde germline mutasyonlara sahiptir. Buna karşılık, sporadik MSI kolorektal kanserlerin tırtıklı neoplazia yolu ile ilişkili olduğu ve sıklıkla BRAF/V600E mutasyonları taşıdığı, MMR genlerinde (Lynch Sendromu) germline mutasyonlarından kaynaklanan kanserlerde BRAF mutasyonunun olmadığı bilinmektedir (Wang ve ark., 2003; Domingo ve ark., 2004).

MSI, tümör hücrelerinde artmış somatik mutasyonlara neden olarak, yüksek tümör mutasyon yükü, neoantijen ekspresyonunun artması ve bol miktarda tümör barındıran lenfositler dahil olmak üzere moleküler ve biyolojik değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler, kontrol noktası inhibitör ilaçlarına duyarlılığın artması ile ilişkilidir (Llosa ve ark., 2015; Gargiulo ve ark., 2016; Gelsomino ve ark., 2016; Overman ve ark., 2017).

CIMP'den sorumlu olan epigenetik kararsızlık, kolorektal kanserlerin bir başka geçerli özelliğidir. CIMP-pozitif tümörlerin önemli özelliği, kanserle ilişkili genlerin promotörlerinin hipermetilasyonudur. Bu olay genetik sessizliğe ve protein ekspresyonunun olmamasına yol açar. Kolorektal kanserlerde genetik ve epigenetik değişimler birlikte olabilir, ancak metilasyon farklılıkları nokta mutasyonlarından daha sık görülür. CIMP'nin tanımları, CIMP-pozitif ve CIMP-negatif için incelenen metilasyon odakları ve kesme değerleri ile ilgili çalışmalar arasında büyük ölçüde değişmektedir. CIMP durumunun kolorektal kanser prognozu ile herhangi bir ilişkisi mevcut değildir. APC mutasyonları ve WNT/CTNNB1 sinyal yolunun aktivasyonu, CIMP ile ters ilişkilidir (Jia ve ark., 2016).

KRAS geni, kolon kanseri ve adenomlarda en sık gözlenen aktive edici onkogendir. Bu gen hücre içi sinyal transdüksiyonunda rol oynar ve 1 cm'den küçük adenomların %10'undan daha azında, 1 cm'den büyük adenomların yaklaşık %50'sinde mutasyona uğramış haldedir (Kumar ve ark., 2005).

KRAS geninin 12,13 ve 61. kodonlarındaki nokta mutasyonları, kolorektal kanserli vakaların yaklaşık %30-40'ında pozitiftir ve toplamda yaklaşık 85 KRAS mutasyonu tanımlanmıştır. KRAS'ın bu farklı moleküler fenotipleri,

makroskopik fenotipi değiştirebilecek farklı karsinogenez yollarına neden olabilir (Corso ve ark., 2013).

VEGF endotel hücre proliferasyonu, migrasyonu ve vasküler geçirgenlikte rol oynayan proanjiyonik bir faktördür (Lee ve Chan, 2011). İfadesindeki artış kötü prognoz, preoperatif radyoterapiye düşük yanıt ve tekrarlama olasılığı ile ilişkilidir (Zlobec ve ark., 2013).

1.2.HCT116 HÜCRE HATTI

Bu çalışmada American Type Tissue Culture Collection (ATCC) firmasından temin edilen HCT116 kolorektal karsinoma hücre hattı deney grubu olarak kullanılmıştır.

Brattain ve ekibi tarafından 1981 yılında kolorektal karsinomalı yetişkin erkek hastaların tümörlerinden elde edilmiş olan bir hücre hattıdır. HCT116 hücre hattı transfeksiyon için uygun bir konaktır ve kültür ortamında adherent çoğalırlar. Transformin growth factor beta 1 (TGFB1) ve beta 2 (TGFB2) ekspresyonu pozitiftir. Bu hücre hattı, ras proto onkogenin 13. Kodonunda bir mutasyona sahiptir ve bu özelliği sayesinde PCR analizleri için pozitif bir kontrol olarak kullanılabilir. (ATCC CCL-247)

1.3.*PTGS2* ve *KRT19* GENLERİ

PTGS2 veya *COX2* olarak kısaltılan *Prostaglandin Endoperoksit Sentaz-2* veya *Siklooksigenaz-2* geni, GRCh38.p12 (NCBI, Genome Referance Consortium Human Build 38 patch release-12) konumunda ve enzim yapıda protein kodlayan bir gendir (NCBI, Gene ID:5743). *PTGS2*, prostaglandin biyosentezinde hem dioksijenaz hem de peroksidaz olarak görev yaparak araşidonik asidin son ürünü olan Prostaglandin-E2 (PGE2)'ye dönüştürülmesinde anahtar enzimdir. *PTGS2* enzimi araşidonik asidin Prostaglandin-G2'ye, ardından Prostaglandin H2'ye dönüşümünü katalizler. Daha sonra bu ürün izomeraz enzimleri tarafından Prostaglandin-E2'ye dönüştürülür. PGE2, hücresel hayatta kalımı aktive eden Nükleer Faktör-kappa B (NF-kB) sinyal yolağındaki transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini arttırır. Aktive olmuş NF-kB sinyal yolağı ise Bcl2 anti-apoptatik proteininin transkripsiyonunu arttırarak apoptozun inhibe edilmesine yol açar. Böylece, anormal şekilde yükselen *PTGS2* ifadesi, PGE2 miktarını arttırarak karsinogeneze dolaylı yoldan katkı sağlar (Park ve ark., 2006).

PTGS2'nin çoğu solid tümör tipinde ifade edildiğine dair güçlü kanıtlar vardır. Hücresel ifadesi, karsinogenezin ilk evrelerinde, tümör gelişimi ve invaziv tümör büyümesi yoluyla artmıştır (Ogino ve ark., 2008). *PTGS2* ifadesinin meme kanseri, safra yolu kanseri ve kolorektal kanser ile de ilişkili olduğu bulunmuştur (Cox ve ark., 2004; Langsenlehner ve ark., 2006; Sakoda ve ark., 2006).

PTGS2'nin ifadesi, ultraviyole ışık *RAS* onkogeni, İnterlökin-1 (IL-1), epidermal büyüme faktörü beta ve tümör nekroz faktörü alfa ile indüklenebilir. Deksametazon ilaçlar, antioksidanlar ve tümör baskılayıcı protein p53 ise *PTGS2* ifadesini baskılar (Zha ve ark., 2004).

Kanser ve lenf nodu metastazı, zayıf farklılaşma ve artmış tümör büyüklüğü gibi kötü prognoz indükleyicileri ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, *PTGS2* 'nin steroid olmayan anti-enflamatuar ilaçlar tarafından inhibe edilmesi, çeşitli kanserlere karşı koruyucu bir etki ile ilişkilendirilmiştir. Steroid olmayan ilaçların kullanımının ortaya çıkması aspirin ya da seçici *PTGS2* inhibitörleri kolorektal kanser riskini azaltabilir. *PTGS2* 'nin tanısal belirteçler veya ilaç hedefi olarak tanılanabileceği hala belirsizdir (Daneau ve ark., 2010).

Sitokeratin ailesi, 20'den fazla farklı protein içerir ve asidik asit tip I ve temel tip II olmak üzere iki alt gruba bölünmüştür. Temel tip keratinler *KRT1* ila *KRT8,* asidik tip keratinler, *KRT9* ila *KRT20*'yi içerir. Yapısal bütünlüğünü korumanın yanı sıra, keratinler hücre sinyalleşmesinde, stres yanıtında ve apoptozda önemli rol oynar (Coulombe ve Omary, 2002).

Keratin19, tip I keratindir. 17q12-q21 kromozom bölgesinde bulunan keratin 19 (*KRT19*) geni, asidik tip I proteini olan CK-19'u kodlar (Paiva ve ark., 2011).

KRT19 transkripsiyonunun ER2/ERK/SP1 sinyal yolunun aktivasyonu ile arttırıldığı ve KRT19'un HER2 reseptörü translokasyonuyla sonuçlandığı ortaya çıkmıştır (Ju ve ark., 2015; Ohtsuka ve ark., 2016).

KRT19, epitelyal hücrelerin çoğunda (Bartek ve ark., 1986) bol miktarda eksprese edilen, ancak ilginç bir şekilde, lenf nodu lenfositleri, periferik kan hücreleri veya kemik iliği hücreleri (Traweek ve ark., 1993; Datta ve ark., 1994) ile ifade edilmeyen ipliksi bir sitokeratin proteinidir. Ekspresyonu endotelyal hücrelerde ve fibroblastlarda da tespit edilmiştir (Traweek ve ark., 1993).

Keratin 19, hematopoetik hücrelerden epitelyal hücreleri ayırmak için *keratin 8* ve *keratin 18* ile birlikte kullanılır (Lu ve ark., 2010; Fortier ve ark., 2013).

Genellikle Anti-Ck19, kolon adenokarsinomları, mide, pankreas, safra yolları, karaciğer ve meme dahil olmak üzere çok çeşitli epitelyal maligniteler ile reaksiyona girer (Eyken, V., 1991; Velden, L.A., 1993).

1.4.KANTİTATİF PCR (qPCR)

Real-time PCR DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan bir metotdur (Gibson ve ark., 1996). Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir (Bustin, S.A., 2000).

PCR döngüsü seri halde yapılan sıcaklık değişimleri döngülerinden oluşur. Her bir döngü 3 adıma ayrılabilir:

- Denatürasyon: 95 °C'de çift iplikli DNA sarmalının ayrılması,
- Primerlerin bağlanması: Primerlerin 50-60 °C'de hedef DNA'ya hizalanması,
- Uzama ya da polimerizasyon: 68-72 °C'de, DNA'ya karşılık gelen dNTP'lerin bağlanması.

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltılmasında ''SYBR Green I'' yöntemi günümüzde oldukça sık kullanılmaktadır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak real-time PCR cihazında okunan floresanın da miktarı eş zamanlı olarak artar. Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve ''SYBR Green I'' boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışıma yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar.

Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış ''real-time'' cihazının monitöründen izlenebilir (Kubista ve ark., 2006). Floresan sinyalin eşik değerini aştığı noktadaki döngü sayısı ''Cycle of treshold (Ct)'' olarak ifade edilir. Ct değeri, sistemin floresan miktarındaki artışı farketmeye başladığı ve PCR ürününün log-lineer fazda eksponensiyal olarak artmaya başladığı zamandır.

2. MATERYAL VE METOD

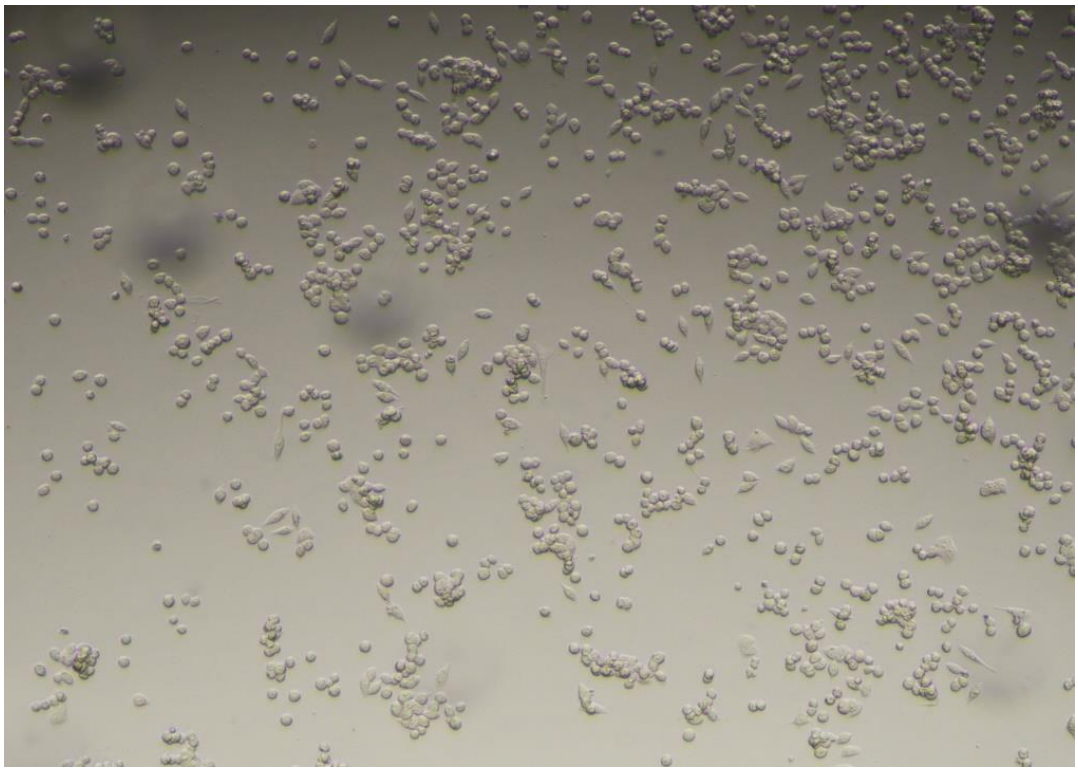
2.1.HÜCRE KÜLTÜRÜ

2.1.1. Besiyeri Hazırlanışı

Kolorektal kanser hücre hattı olan HCT116 (ATCC ® CCL247™) hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS, Pan Bitech marka, P30-1904 katalog numaralı ürün) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Pan Biotech marka, P06-07100 katalog numaralı ürün) içeren Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyeri içerisinde kültür edilmiştir.

2.1.2. Hücre Hatlarının Stoktan Çıkartılması

Sıvı azotta, kriyo tüpler içerisinde saklanan hücreler protokole uygun olarak 50 °C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde hızlı bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. 15 mililitrelik (mL) santrifüj tüplerine alınan hücreler, DMSO'nun uzaklaştırılması amacıyla 21 °C, 800 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı kısım (süpernatant) aspire edilerek üzerine 1 mL sıvı besiyeri ilave edilmiştir. Nazikçe pipetaj yapılarak hücre pelletinin çözülmesi sağlanmış ve hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan 25 santimetre karelik (cm^2) kültür flasklarına alınıp 37 °C sıcaklıkta, %5 karbondioksit (CO_2) içeren ortamda inkübe edilmiştir. Kanser hücre hattı kültürde tek tabaka halinde, flask zeminine yapışarak büyütülmüştür. (Hücrelerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri için Şekil 2.1'e bakınız.)



Şekil 2.1. HCT116 hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü

2.1.3. Besiyeri Değiştirme

Besiyerini değiştirmek gerektiğinde flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek 1X 2 mL steril fosfat tampon tuzlu çözeltisi (PBS) eklenerek hücre yüzeyinin hafifçe yıkanması sağlanmıştır. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask içerisine 5 mL taze besiyeri eklenmiştir.

2.1.4. Hücre Kültürünün Pasajlanması

Hücreler, flask yüzeyini %60-70 oranında kapladıklarında (konfluent, sıkışık durumda olduklarında) pasajlanmaları amacıyla üzerlerindeki besiyeri aspire edilmiştir. Hücre yüzeyi serum ve besiyeri kalıntılarından tamamen arındırılmak amacıyla 1X 2 mL PBS ile nazikçe yıkanmıştır. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5 mL %0,05'lik Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve hücreler 37 °C'de %5 karbondioksit (CO_2) içeren inkübatörde 5 dakika inkübe edilmiştir. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı (5 mL) kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayrıldıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu.

Hücrelerin istenilen sayıya gelene kadar çoğalmalarını sağlamak için önce, flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 mL'lik falkon tüp içerisine alındı. 21 °C'de 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1 mL besiyerinde çözündükten sonra hücre süspansiyonu 75 cm^2'lik flasklara alınarak 37 °C'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.

2.1.5. Hücre Soylarının Hazırlanması ve Stoklanması

Hücreler flask yüzeylerini kapladıklarında içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X 2 mL PBS ile nazikçe yıkandıktan sonra hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05'lik Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler, 37 °C'de, %5 CO_2 içeren inkübatörde 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri eklendi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15 mL'lik falkon tüp içerisinde, 21 °C, 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım aspire edildi. Hücreleri dondururken kullanılan medya 5 mL dimetil sülfoksit (DMSO, Neofroxx marka, 1264 katalog numaralı ürün), 5 mL FBS (Pan Biotech marka, P30-1904 katalog numaralı ürün), 40 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Pan Biotech marka, P04-03590 katalog numaralı ürün) şeklinde hazırlanmıştır. Hücre peletleri bu medyanın içerisinde dikkatlice çözülmüştür ve 1,5 mL medya ile her tüpte 1 milyon hücre olacak şekilde dağıtılmıştır. Ardından -80 °C'de saklanmıştır.

2.1.6. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımında Thoma Lamı kullanılmıştır. Hücreler, tripsin uygulanarak yüzeyden kaldırıldıktan sonra hücre süspansiyonundan 10 mikrolitre (µl) alınarak üzerine %0,5 olacak şekilde tripan mavisi (Neofroxx marka, 1475 katalog numaralı ürün) eklenerek pipetaj yapılıp iyice karışması sağlanmıştır. Bu hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak thoma lamına konuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 mL'lik besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplanmıştır.

2.2.TOTAL RNA İZOLASYONU

Kültürlenmiş 1 x 10^6 hücreden total RNA elde etmek için, Omega Biotek marka, R6834 katalog numaralı RNA izolasyon kit ürünü kullanılmıştır.

Kit komponentlerinden olan trizol içerikli TRK solüsyonuna çeker ocakta 1 mL/20 µl beta-merkaptoetanol eklenerek işleme başlanmıştır. Ardından 1 mL besiyeri içerisindeki hücre süspansiyonuna 350 µl TRK solüsyonu eklenerek, 21G ölçülü 5 mL'lik steril şırıngalı enjektör ile 10 kez mekanik olarak homojenizasyon yapılmıştır. TRK solüsyonu içerisindeki trizol, biyolojik materyalleri çözündüren ve proteinleri denatüre eden, fenol ve guanidiyum izotiyosiyanatın çözeltisidir. Bu kimyasallar nükleik asitlerin yapısına zarar vermeyerek, hücre bileşenlerini parçalayıp proteinleri denatüre ederek ortamdan ayrıştırılmak istenen nükleik asitlerden proteinleri kurtarmaktadır. Beta-merkaptoetanol ise indirgeyici bir kimyasal ajan olarak, disülfit bağlarını kırarak enzim işlevselliği için gereken üç boyutlu doğal konformasyonunu bozmaktadır. Böylece elde etmek istediğimiz nükleik asitleri yıkılmayacak olan enzimler (Rnaz, Dnaz gibi) geri dönüşümsüz olarak denatüre olmaktadır.

500 µl %70'lik etil alkol eklenip vortekslenen hücre lizatından 700 µl'si, kit komponentlerinden olan spin kolonlu koleksiyon tüpüne aktarılmıştır. Örnek, 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpüne inen sıvı boşaltılıp santifüj tekrar edilmiştir.

Kit komponentlerinden olan RNA Wash Buffer I'den 500 µl kolonlu tüpe eklenip 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Tüpe inen sıvı boşaltılıp aynı santrifüj, bu kez %99'luk etil alkol ile dilüe edilmiş RNA Wash Buffer II'den 500 µl eklenerek tekrarlanmıştır. Bu işlem bir kez daha uygulanmıştır. Ardından herhangi bir ekleme yapılmaksızın yalnızca santrifüj tekrarlanıp yine tüpe inen sıvı boşaltılmıştır.

Kolonlu tüp, koleksiyon tüpünden ayrılıp kitte mevcut olan yeni bir koleksiyon tüpüne oturtularak herhangi bir ekleme yapılmaksızın 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

Kolonlu tüp, boş 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak 60 µl kitte mevcut olan nükleazdan arındırılmış steril distile su eklenip 10.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece RNA, su ile çözünüp kolondan ayrılarak serbest kalacaktır.

Santrifüj sonunda tüpün içerisindeki sıvıda çözünmüş halde elde edilmiştir. Elde edilen bu RNA, konsantrasyonu ve optik dansitesi (OD) ölçüldükten sonra deney zamanına kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

RNA konsantrasyon ve saflık oranını ölçmek için, ''SPECTROstar Nano absorbance plate reader'' cihazı ve ''Lvis Plate'' fonksiyonu kullanılmıştır. Lvis Plate'teki örnek ölçüm noktacıklarına 2 µl RNA koyulmuştur. OD ve konsantrasyon ölçüm sonuçları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri

Blank: Su	Örnek	OD Ölçümü	Konsantrasyon(ng/mL)
	HCT116	1,89	91,88

2.3.KOMPLEMENTER DNA (cDNA) SENTEZİ

Tamamlayıcı DNA sentezi için Qiagen marka QuantiTect Reverse Transcription kiti kullanılmıştır.

Kite ait protokol izlenerek her bir örnekten alınan 10 µL total RNA, 65 °C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilerek işleme başlanmıştır. Bu işlemin yapılmasının sebebi primerlerin RNA iplikleri üzerinde uyun yerlere bağlanabilmesidir. Sonrasında spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 5 dakika boyunca buzda bekletilmiştir.

5 µL 5X konsantrasyondaki reaksiyon tamponu, 2 µL deoksinükleozit trifosfat (dNTP) çözeltisi 5,25 µL randomize primerler, 0,5 M Rnaz inhibitörü, 1,25 M'da dikloro difenil trikloroethan (DTT), 1 M reverse transkriptaz enzimi ve son olarak 10 µL RNA örnekleri eklenerek reaksiyon tüpü 25 °C'de 10 dakika, 50 °C'de 60 dakika ve son olarak 85 °C'de 5 dakika olmak üzere 75 dakikalık reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonunda tüpler 4 °C'de sabit tutulmuştur. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve kullanılan miktarları Tablo 2.2'de, sentez aşamaları ise Tablo 2.3'te gösterilmiştir.

Tablo 2.2. cDNA sentez reaksiyonunda kullanılan bileşenler

Bileşen	Miktar	Sonuç konsantrasyonu
5 X Reaksiyon tamponu	5 µL	1X
dNTP	2 µL	10 mM
Randomize primerler	5,25 µL	100 µL
RNaz inhibitörü	1 µL	0,5 mM
DTT	0,25 µL	1,25 mM
RTE (200 U/ µL)	1,5 µL	1 M
RNA	10 µL	3 M
Toplam	25 µL	

Tablo 2.3. cDNA sentez reaksiyonundaki aşamalar

Döngü Aşamaları	
Primer bağlanması	65°C'de 5 dakika; 4^0C'de 5 dakika
DNA polimerizasyonu	25°C'de 10 dakika; 50°C'de 60 dakika
Enzim deaktivasyonu	85°C'de 5 dakika

2.4.KANTİTATİF PCR (qPCR)

Gen ifadelerinin analizi için qPCR'da kullanılmak üzere tasarlanmış olan primerler Tablo 2.4'te gösterilmektedir.

Tablo 2.4. Tasarlanan primer dizileri

Gen	Primer dizisi
PTGS2	Forward: ATCATTCACCAGGCAAATTGC Reverse: GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG
KRT19	Forward: CGGGACAAATTCTTGGTGCC Reverse: ATCCAGCACCCTGCGCAGGCC

Amplifikasyon, Corbett Research Real-Time PCR Thermal Cycle cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon tüpüne 10 µL 2X SYBR Green (HibriGen marka, mg-sybr-01-400 katalog numaralı ürün), forward ve reverse primerlerin her birinden 1,5 µL, 4 µL cDNA örneği, 4 µL nükleazdan arındırılmış su eklenerek hazırlandı. Reaksiyonun bileşenleri Tablo 2.5'teki gibi, reaksiyonun aşamaları ise tablo 2.6'daki gibidir.

Tablo 2.5. qPCR reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Miktar	Sonuç konsantrasyonu
2X SYBR Green Reaksiyon Karışımı	10 µL	1 X
Forward primer	1,5 µL	0,3 µM
Reverse primer	1,5 µL	0,3 µM
cDNA	4 µL	<500 ng
Su	4 µL	
Toplam	21 µL	

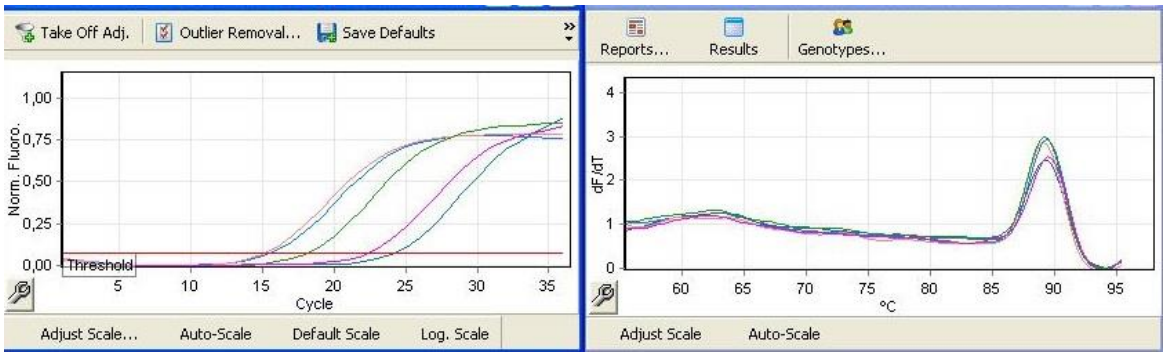
Tablo 2.6. qPCR döngü aşamaları

qPCR Döngü Aşamaları		
Denatürasyon		94 santigrat derecede 4 dakika
Çoğalma	1. Denatürasyon	95 santigrat derecede 30 saniye
	2. Bağlanma	58 santigrat derecede 30 saniye
	3. Uzama	72 santigrat derecede 30 saniye
Sonlanma		72 santigrat derecede 10 dakika
X 36 DÖNGÜ		

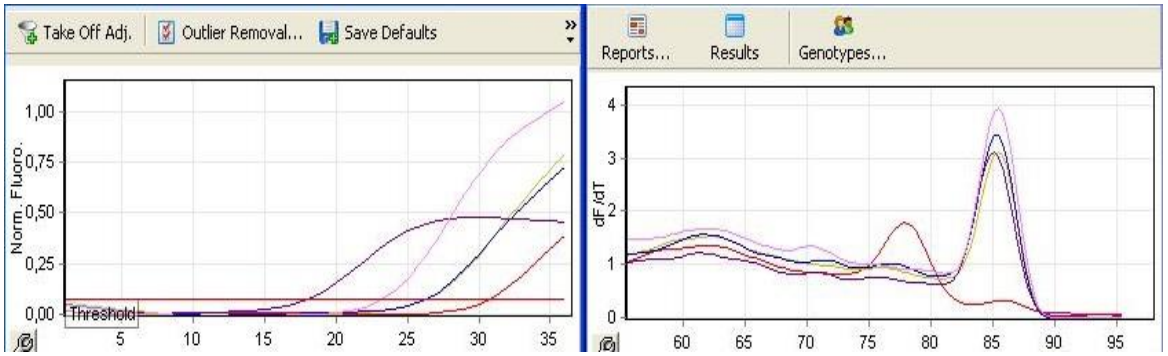
3. BULGULAR

3.1.KANTİTATİF PCR (qPCR) SONUÇLARININ ANALİZİ

Yapılan qPCR analizinde; *KRT19* ve *PTGS2* genlerinin anlatım düzeyleri GAPDH genine göre normalize edilerek araştırılmıştır. İfade analizi, üç tekrarlı deney seti sonucundan elde edilen Ct değerlerinin ortalaması ile hesaplanmaktadır (Rao ve ark., 2013). Öncelikle araştırılmak istenilen her bir genin Ct değeri, house-keeping denilen ifade seviyesi bir hücrede her zaman aynı olan genin Ct değerinden çıkartılır. Bu değere, "delta Ct" (ΔCt) denilmektedir. Sonrasında deney grubunun delta Ct değerleri, kontrol grubunun delta Ct değerlerinden sırasıyla çıkartılarak "delta delta Ct" (ΔΔCt) değerleri bulunur. Bu değerler ise deney grubunun kontrol grubuna kıyasla, araştırılan genlerdeki house-keeping genine nazaran ifade seviyesindeki değişimi göstermektedir. Bu değerlerin her bir replikasyon döngüsündeki artan veya azalan kat sayısını bulmak için ise 2 üzeri negatif kuvveti alınmaktadır ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$).



Şekil 3.1. *KRT19* Geninin Ct ve Tm Grafiği



Şekil 3.2. *PTGS2* Geninin Ct ve Tm Grafiği

Tablo 3.1. Ct değerleriyle ifade değişim oranını hesaplama sonuçları

	HCT116	Delta Ct ΔCt (HCT116)	Ekspresyon Değişimi 2^- ΔΔCt
	Ortalama Ct değeri		
GAPDH (house-keeping gen)	29,31		
KRT19	15,1	11,75	93,70
PTGS2	26,19	0,66	0,17

Tablo 3.1'de house-keeping gen GAPDH olmak üzere, HCT116 hücre hattında *KRT19* ve *PTGS2* genlerinin ifade seviyeleri verilmiştir. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre genlerden birinin ifade seviyesinde artış, diğerinde ise azalma olduğu gözlemlenmiştir. Analiz, üç tekrarlı deney seti halinde gerçekleştirilmiş olup, esas alınacak değer için ikisinin ortalaması alınmıştır.

Çalışmanın sonuçlarında 3 kez tekrarlı eş zamanlı PCR sonuçlarının delta delta Ct (ΔΔCt) hesaplaması ile genlerin ifade oranları HCT116 hücre hattı için; *KRT19* geninde 93,7 kat artmış, *PTGS2* geninde ise 5,88 kat azalmış olduğu saptanmıştır.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolorektal kanser, dünya çapında kadınlar ve erkekler arasında görülen en yaygın üçüncü kanser türüdür (Siegel ve ark., 2017). Kolon epitel hücrelerindeki genetik ve epigenetik değişimlerin birikmesiyle adenokarsinomlara dönüşerek, insan sağlığını büyük ölçüde tehlikeye atan yaygın bir malign tümöre sahiptir.

Kolorektal kanser karsinogenezini doğrudan ya da dolaylı yoldan etkileyen genlerdeki ifade değişimleri hem kanserin başlangıç mekanizmasının anlaşılması açısından hem de yeni ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

Siklooksijenaz-2 (*PTGS2*) upregülasyonu özellikle kolon kanserlerinde dikkat çekicidir. *PTGS2* normal kolonik mukozada tayin edilemezken kolorektal karsinomların %85'inde artmış olarak bulunur (Brown ve DuBois, 2005).

Özellikle hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar yüksek *PTGS2* ekspresyonunun; dayanıklı hale getirerek tümörojenik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir ve bu fenotipik değişiklikler yüksek selektif *PTGS2* inhibitörleri verilerek geriye döndürülmüştür (Tsujii ve DuBois, 1995). Son yapılan çalışmalar *PTGS2*'nin neoplastik tümör hücreleri ile ilişkili anjiyogenezde çok önemli rol oynadığını göstermiştir (Tsujii ve ark., 1998).

Yapılan çalışmalar *PTGS2*'nin karsinogenezde önemli rol oynadığını düşündürmektedir (Eberhart ve ark., 1994; Sano ve ark., 1995; Reddy ve ark., 1996; Zimmermann ve ark., 1999).

PTGS2 'nin örneğin aspirin gibi steroidal olmayan anti-enflamatuar ilaçlarla inhibisyonunun, kolorektal kanser ameliyatını takiben klinik sonuçları iyileştirdiği ve insidansını azalttığı gösterilmiştir (Tougeron ve ark., 2013; Zoratto ve ark., 2014).

Çalışmamızda *PTGS2* geninin ifadesi, kolorektal karsinoma hücre hattı HCT116'da qPCR yöntemi ile belirlenmiştir. HCT116 hücre hattında, *PTGS2* geninin ifadesinde 5,88 kat azalma tespit edilmiştir.

Normal kolon ve meme dokularında *PTGS2* proteini tespit edilememektedir. 2001 yılında Dannenberg ve ekibi, meme ve kolon kanserlerinde *PTGS2* geninin ifadesinde sırasıyla %40 ve %85 oranlarında artış olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanısıra kolorektal kanserler, mesane kanseri, skuamöz hücreli adenokarsinom, karaciğer, mide, cilt ve özafagus kanserlerinde de bu genin ifadesinin yüksek oranda arttığı bilinmektedir (Fosslien, E., 2000; Hosomi ve ark., 2000; Dannenberg ve ark., 2001).

PTGS2 gen ifadesinin yüksek oranda olması, PGE2 miktarını ve NF-kB yolağının aktivasyonunu arttırır. Aktivasyonu artan NF-kB sinyal yolağı ise BCL2 transkripsiyonunu tetikleyerek hücrede apoptoz direncinin meydana gelmesine neden olur (Park ve ark., 2006).

Literatürdeki çalışmalarda, *PTGS2* geninin birçok kanserli dokuda ifadesinin arttığı; dolaylı bir şekilde anjiyogenez ve apoptoz direncinde rol aldığı ve mesane kanserinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Daniel ve ark., 1999; Dempke ve ark., 2001).

2000 yılında Soslow ve ekibi, *PTGS2* ifadesinde, kolon, akciğer ve meme kanserlerinin iyi ve orta derecedeki farklı karsinomlarında artış gözlemlemiş, COX-1'in ise yapısal olarak düşük seviyelerde ifade edildiğini ortaya koymuşlardır (Soslow ve ark., 2000).

PTGS2 'nin aşırı ifadesinin, lenf nodu tutulumunun derecesi ile pozitif ilişkili olduğu, fakat HER2, ER ve PR reseptörlerinin ekspresyonu ile ilişkili olmadığı gözlemlenmiştir (Ghahremanfard ve ark., 2013).

PTGS2 ekspresyonunun hücreler arası adezyonu azalttığı, anjiogenezi arttırdığı, hücre proliferasyonunu arttırdığı ve apoptozisi azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Jones ve ark., 1999; Souza ve ark., 2000; Morris ve ark., 2001; Kakiuchi ve ark., 2002).

Biz ise yaptığımız bu çalışmada, daha önce birçok farklı solid tümör tipinde *PTGS2* 'nin yüksek ifadesinin bulunduğu çalışmaların aksine, kolorektal kanser hücre dizisinde *PTGS2* gen ifadesinin azalmış olduğunu tespit ettik.

Keratinler, epitelyal hücrelerdeki ara filamentleri (IF) oluşturan proteinlerdir ve uzun yıllar boyunca yaygın olarak tümörlerin patolojik tanısı için immünohistokimyasal belirteçler olarak kullanılmıştır (Karantza V., 2011). 17q21.2 kromozom bölgesinde bulunan *keratin 19* (*KRT19*) geni, asidik tip I proteini olan sitokeratin (CK) 19 proteini CK-19'u kodlar (Paiva ve ark., 2011).

KRT19 prognostik bir belirteç olarak çalışılmış ve hepatoselüler karsinom, pankreatik nöroendokrin tümörler ve potansiyel olarak HER2-pozitif meme kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde spesifik olarak rol aldığı kanıtlanmıştır (Cen ve ark., 2017; Ju ve Datta, 2017). Yaptığımız çalışmada *KRT19* geninin ifade düzeyinde 93,7 kat artış gözlemlenmiştir.

KRT19'un tip I sitokeratin olarak epitelyal tümör hücrelerinde bolca eksprese edildiği ve metastatik tümörler için bir biyobelirteç görevi gördüğü çalışmalarla gösterilmiştir (Stathopoulos ve ark., 2005; Chen ve ark., 2007).

Bir sitokeratin proteini olan KRT19'un birkaç kanserde farklı şekilde eksprese edildiği bilinmektedir. Meme, kolon, karaciğer ve barsak kanserlerinde yüksek oranda eksprese edilir ve hastalarda kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir (Kabir ve ark., 2014; Asfaha ve ark., 2015; Ju ve ark., 2015; Kawai ve ark., 2015). Bununla birlikte KRT19'un ekspresyonunun, meme kanseri kök hücre benzeri hücrelerde ve hücre dizilerinde kanser ilerlemesi ile negatif korelasyonu olduğu da bilinmektedir (Bambang ve ark., 2009; Ju ve ark., 2013; Saha ve ark., 2017).

KRT19 sadece kanser metastazını ve ilaç direncini düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda sertlik, metastatik ve ilaca dirençli belirteçlerin ekspresyonunu modüle eder. *KRT19*'un PDGFRa/ laminin B1/ keratin 19, HER2/ EPK/ SP1, WNT/ NUMB/ NOTCH, EGR1/ PTEN/ AKT dahil olmak üzere çeşitli sinyalleme kademelerini düzenlediği bilinmektedir (Ju ve ark., 2013; Ju ve ark., 2015; Ohtsuka ve ark., 2016; Goavere ve ark., 2017; Saha ve ark., 2017).

KRT19 kolon kanseri kök hücreleri, kolon ve barsaklarda LGR5+ kripta bazlı kolon hücrelerini yükselterek radyo direnci göstermiştir (Asfaha ve ark., 2015).

Biz de çalışma sonucumuzda literatürü destekler şekilde, *KRT19* ifadesinin kolon kanser hücre dizisinde arttığını tespit ettik.

Çalışmamızın sonucunda gerçek zamanlı PCR sonuçlarının delta delta Ct hesaplaması ile HCT116 hücre hattında *PTGS2* geninin ifadesinde 5,88 kat azalma; *KRT19* geninin ifadesinde ise 93,7 kat artış olduğu saptanmıştır. Bu iki genin kolon kanseri ve diğer kanser türlerinde karsinogenezle doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkili olduğu ve anjiyogenez, apoptoz direnci gibi biyolojik süreçlerde rol alabileceği saptanmıştır.

Bu çalışma sonucunda, bu iki genin kolon kanseri gelişiminde rol aldığı ve ileride yapılacak detaylı çalışmalarla genlerin fonksiyonel düzeyde araştırılmasıyla, yeni inhibitör ve antikor bazlı ilaçları geliştirme çabaları için ve ilaç hedefi olabilecek reseptörlerin tayini açısından prognostik bir öneme sahip olacağı ön görülmektedir.

KAYNAKLAR

Agnoli, C., Grioni, S., Sieri, S., Palli, D., Masala, G., Sacerdote, C., *et al.* (2013). Italian Mediterranean Index and risk of colorectal cancer in the Italian section of the EPIC cohort. *Int. J. Cancer 132*, 1404–1411.

Asfaha, S., Hayakawa, Y., Muley, A., Stokes, S., Graham, T. A., Ericksen, R. E., et al. (2015). Krt19(+)/ Lgr5(-) Cells Are Radioresistant Cancer-Initiating Stem Cells in the Colon and Intestine. Cell Stem Cell. 16: 627–638.

ATCC. HCT116 cell line: CCL-247. Ürün açıklama: "https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-247.aspx?geo_country=tr" 20-Mayıs-2019 tarihinde alınmıştır.

Bambang, I. F., Lu, D., Li, H. P., Chiu, L. L., Lau, Q. C., Koay, E., ve ark. (2009). Cytokeratin 19 regulates endoplasmic reticulum stress and inhibits ERp29 expression via p38 MAPK/XBP-1 signaling in breast cancer cells. Exp. Cell Res. 315: 1964–1974.

Bartek, J., Bartkova, J., Taylor-Papadimitriou, J., Rejthar, A., Kovarik, J., Lukas, Z., ve ark. (1986). Differential expression of keratin 19 in normal human epithelial tissues revealed by monospecific monoclonal antibodies. Histochem J 18: 565-575.

Bartek, J., Taylor-Papadimitriou, J., Miller, N., Millis, R. (1985). Patterns of expression of keratin 19 as detected with monoclonal antibodies in human breast tissues and tumours. *Int. J. Cancer 36*, 299.

Becht, E., de Reynies, A., Giraldo, N. A., Pilati, C., Buttard, B., Lacroix, L., ve ark. (2016). Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. *Clin. Cancer Res. 22*, 4057–4066.

Boudjadi, S., Bernatchez, G., Senicourt, B., Beausejour, M., Vachon, P. H., Carrier, J. C., ve ark. (2017). Involvement of the Integrin alpha1beta1 in the Progression of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel). 9*, 96.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68(6), 394–424.

Brown J. R., & DuBois R. N. (2005). *PTGS2*: a molecular target for colorectal cancer prevention. J Clin Oncol. 23:2840-2855.

Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 25: 169-93.

Spartalis, C., Schmidt, E. M., Elmasry, M., Schulz, G. B., Kirchner, T., Horst, D. (2019). In vivo effects of chemotherapy on oncogenic pathways in colorectal cancer Cancer Sci.

Cancer Genome Atlas Network Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 2012;487:330–337.

Carethers, J. M., & Jung, B. H. (2015). Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology. 149,* 1177–1190.

Cen, D., Chen, J., Li, Z., Zhao, J., Cai, X. (2017). Prognostic significance of cytokeratin 19 expression in pancreatic neuroendocrine tumor: A meta-analysis. PLoS One 12: e0187588.

Chang, C. C., Lin, P. C., Lin, C. C., Lan, Y. T., Lin, H. H., Lin, C. H., et al. (2017). Molecular and Clinicopathological Differences by Age at the Diagnosis of Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci. 18,* 1441.

Chen, T. F., Jiang, G. L., Fu, X. L., Wang, L. J., Qian, H., Wu, K. L., ve ark. (2017). CK19 mRNA expression measured by reverse-tran- scription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer treated by chemo-radiation: An independent prognostic factor. Lung Cancer 56: 105-114.

Corso, G., Pascale, V., Flauti, G., Ferrara, F., Marrelli, D., and Roviello, F. (2013). On-cogenic mutations and microsatellite instability phenotype predict spe-cific anatomical subsite in colorectal cancer patients. Eur J Hum Genet *21(12)*: 1383-1388.

Coulombe, P. A., & Omary, M. B. (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. Current opinion in cell biology 14 (1):110-122.

Cox, D. G., Pontes, C., Guino, E., Navarro, M., Osorio, A., Canzian, F., ve ark. (2004). Cancer polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (*PTGS2* /COX2) and risk of colorectal cancer.

Daneau, G., Boidot, R., Martinive, P., Feron, O. Clin. (2010). Cancer Res Identification of cyclooxygenase-2 as a major actor of the transcriptomic adaptation of endothelial and tumor cells to cyclic hypoxia: effect on angiogenesis and metastases.

Daniel, T. O., Liu, H., Morrow, J. D., Crews, B. C. and Marnett, L. J. (1999). Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. Cancer research, 59(18), 4574-4577.

Dannenberg, A. J., Altorki, N. K., Boyle, J. O., Dang, C., Howe, L. R., Weksler, B. ve ark. (2001). Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target fort he prevention of cancer. *The lancet oncology*, 2(9), 544-551.

Datta, Y. H., Adams, P. T., Drobyski, W. R., Ethier, S. P., Terry, V. H., Roth, M. S. (1994). Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. J. Clin. Oncol. 12: 475-482.

De Sousa, E. M. F., Wang, X., Jansen, M., Fessler, E., Trinh, A., de Rooij, L. P., et al. (2013). Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat. Med. 19*, 614–618.

Dempke, W., Rie, C., Grothey, A., Schmoll, H. J. (2001). Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127,411-417.

Desai, D. C., Neale, K. F., Talbot, I. C., et al. (1995). Juvenile polypozis. Br J Surg. 82: 14-7.

Domingo, E., Laiho, P., Ollikainen, M., et al. (2004). BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. J Med Genet. 41:664–8.

Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., Giardiello, F. M., Ferrenbach, S., DuBois, R. N. (1994). Upregulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology. Oct;107(4):1183-8.

Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., et al. (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat. Cell Biol. 3*, 433–438.

Fortier, A. M., Asselin, E., Cadrin, M. (2013). Keratin 8 and 18 Loss in Epithelial Cancer Cells Increases Collective Cell Migration and Cisplatin Sensitivity through Claudin1 Up-regulation. J. Biol. Chem. 288: 11555–11571.

Fosslien, E. (2000). Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 30(1), 3-21.

Gargiulo, P., Della Pepa, C., Berardi, S., Califano, D., Scala, S., Buonaguro, L., ve ark. (2016). Tumor genotype and immune microenvironment in POLE-ultramutated and MSI-hypermutated Endometrial Cancers: New candidates for checkpoint blockade immunotherapy? *Cancer Treat. Rev. 48*, 61–68.

Gelsomino, F., Barbolini, M., Spallanzani, A., Pugliese, G., Cascinu, S. (2016). The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat. Rev. 51*, 19–26.

Ghahremanfard, F., Toussy, J. A., Kazeminezhad, B., & Ramezani, F. (2013). Role of cyclooxygenese-2 (*COX2*) expression in breast cancer differentiation and its relationship with hormone receptors status. 8 (4): 235-240.

Giannakis, M., Hodis, E., Jasmine Mu, X., Yamauchi, M., Rosenbluh, J., Cibulskis, K., et al. (2014). RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nat. Genet. 46*, 1264–1266.

Gibson, U. E., Heid, C. A., Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res. 6: 995- 1001.

Govaere, O., Petz, M., Wouters, J., Vandewynckel, Y. P., Scott, E. J., Topal, B., ve ark. (2017). The PDGFRα-laminin B1-keratin 19 cascade drives tumor progression at the invasive front of human hepatocellular carcinoma. Oncogene. 36: 6605–6616.

Grady, W. M., Carethers, J. M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. Gastroenterology. 135:1079–99.

Grady, W. M. (2004). Genomic instability and colon cancer. Cancer Metastasis Rev. 23:11–27.

Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reynies, A., Schlicker, A., Soneson, C., et al. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med. 21*, 1350–1356

Gyparaki, M. T., Basdra, E. K., and Papavassiliou, A. G. (2013). DNA methylation biomarkers as diagnostic and prognostic tools in colorectal cancer. J Mol Med (Berl) *91(11)*: 1249-1256.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2010). The hallmarks of cancer. Cell. 100:57–70.

Heidelbaugh, J. J., & Tortorello, M. (2012). The adult well male examination. Am Fam Physician. 85:964–71.

Hosomi, Y., Yokose, T., Hirose, Y., Nakajima, R., Nagai, K., Nishiwaki, Y. ve ark. (2000). Increased cyclooxygenase 2 (COX2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung. *Lung cancer*, 30(2), 73-81.

Inamura, K. (2018). Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. Cancers (Basel). Jan 20; 10 (1): 26. PMID: 29361689.

Jia, M., Jansen, L., Walter, V., Tagscherer, K., Roth, W., Herpel, E., et al. (2016). No association of CpG island methylator phenotype and colorectal cancer survival: Population-based study. *Br. J. Cancer. 115*, 1359–1366.

Jones, M. K., Wang, H., Peskar, B. M., Levin, E., Itani, R. M., Sarfeh, I. J., ve ark. (1999). Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. Nat Med. Dec; 5(12): 1418-23.

Ju, J. H., Yang, W., Lee, K. M., Oh, S., Nam, K., Shim, S., ve ark. (2013). Regulation of Cell Proliferation and Migration by Keratin19-Induced Nuclear Import of Early Growth Response-1 in Breast Cancer Cells. Clin. Cancer Res. 19: 4335–4346.

Ju, J. H., Oh, S., Lee, K. M., Yang, W., Nam, K. S., Moon, H. G., ve ark. (2015). Cytokeratin19 induced by HER2/ERK binds and stabilizes HER2 on cell membranes. Cell Death Differ. 22,665-676.

Kabir, N. N., Ronnstrand, L., Kazi, J. U. (2014). Keratin 19 expression correlates with poor prognosis in breast cancer. Mol. Biol. Rep. 41: 7729–7735.

Kakiuchi, Y., Tsuji, S., Tsujii, M., Murata, H., Kawai, N., Yasumaru, M., ve ark. (2002). Cyclooxygenase-2 activity altered the cell- surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. Cancer Res. Mar 1; 62(5): 1567-72.

Kane, M., Loda, M., Gaida, G., et al. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. Cancer Res. 57:808–811.

Karantza, V. (2011). Keratins in health and cancer: More than mere epithelial cell markers. Oncogene 30: 127-138.

Kawai, T., Yasuchika, K., Ishii, T., Katayama, H., Yoshitoshi, E.Y., Ogiso, S., et al. (2015). Keratin 19, a Cancer Stem Cell Marker in Human Hepatocellular Carcinoma. Clin. Cancer Res. 21:3081–3091.

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction Mol Aspects Med. 27: 95-125.

Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. (2005). The gastrointestinal tract. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7 th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Company. 857- 869.

Langsenlehner, U., Yazdani-Biuki, B., Eder, T., Renner, W., Wascher, T. C., Paulweber, B., ve ark. Clin. (2006). Cancer Res. The cyclooxygenase-2 (*PTGS2*) 8473T>C polymorphism is associated with breast cancer risk.

Le Marchand, L., Wilkens, L. R., Hankin, J. H., Kolonel, L. N., Lyu, L. C. (1997). A case-control study of diet and colorectal cancer in a multiethnic population in Hawaii (United States): Lipids and foods of animal origin. *Cancer Causes Control. 8,* 637–648.

Lee, J. K. & Chan, A. T. (2011). Molecular prognostic and predictive markers in colorectal cancer: Current status. Curr Colorectal Cancer Rep *7(2)*: 136-144.

Lee, D. W., Han, S. W., Cha, Y., Bae, J. M., Kim, H. P., Lyu, J., et al. (2017). Association between mutations of critical pathway genes and survival outcomes according to the tumor location in colorectal cancer. *Cancer. 123*, 3513–3523.

Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature. 396*, 643–649.

Little, M. P., Vineis, P., Li, G. (2008). A stochastic carcinogenesis model incorporating multiple types of genomic instability fitted to colon cancer data. J Theor Biol. 254:229–38.

Llosa, N. J., Cruise, M., Tam, A., Wicks, E. C., Hechenbleikner, E. M., Taube, J. M., et al. (2015). The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov. 5*, 43–51.

Lu, J., Fan, T., Zhao, Q., Zeng, W., Zaslavsky, E., Chen, J. J., ve ark. (2010). Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients. Int. J. Cancer. 126: 669–683.

M.L. Torring, A.Z. Falborg, H. Jensen, R.D. Neal, D. Weller, I. Reguilon, U. Menon, P. Vedsted Advanced-stage cancer and time to diagnosis: an International Cancer benchmarking Partnership (ICBP) cross-sectional study Eur. J. Cancer Care (2019), Article e13100.

Marmol, I., Sanchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., Rodriguez Yoldi, M.J. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, *18*, 197.

Morris, C. D, Armstrong, G. R, Bigley, G., Green, H., Attwood, S. E. (2001). Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. Am J Gastroenterol. Apr; 96(4): 990-6.

Müslümanoğlu, M. (2000). Kolon Hastalıkları. Cerrahi Gastroenteroloj. Editör, Degerli Ü. Nobel tıp kitabevi, İstanbul, pp:162-168.

NCBI. PTGS2 prostaglandin-endoperoxide synthase 2. [Homo sapiens (human)] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5743 Gene ID: 5743, Son güncelleme tarihi: 15-Haziran-2019

Noyan, T. M., Özenç, A., Hersek, E. (1988). Kolorektal Karsinomlu 300 Vakanın Retrospektif Analizi. Ulusal Cerrahi Kongresi 88. İstanbul 5-9 Haziran Bildiri Özetleri: 83.

Ogino, S., Kirkner, G. J., Nosho, K., Irahara, N., Kure, S., Shima, K., ve ark. Clin. (2008). Cancer Res. Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer.

Ohtsuka, T., Sakaguchi, M., Yamamoto, H., Tomida, S., Takata, K., Shien, K., et al. (2016). Interaction of cytokeratin 19 head domain and HER2 in the cytoplasm leads to activation of HER2-Erk pathway. Sci. Rep. 6: 39557.

Onuk, E., & Tekin, E. (2000). Kolon ve rektum kanserleri. Genel Cerrahi. Editör, Engin A, Ankara, Atlas kitapçılık, pp:574-580.

Overman, M. J., McDermott, R., Leach, J. L., Lonardi, S., Lenz, H. J., Morse, M. A., et al. (2017). Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): An open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol. 18*, 1182–1191.

Paiva, F., Duarte-Pereira, S., Costa, V. L., Ramalho-Carvalho, J., Patrício, P., Ribeiro, F. R., ve ark. (2011). Functional and epigenetic characterization of the KRT19 gene in renal cell neoplasms. DNA Cell Biol 30: 85-90.

Park, J. Y., Pillinger, M. H., & Abramson, S. B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clinical immunology*, 119(3), 229-240.

Phipps, A. I., Limburg, P. J., Baron, J. A., Burnett-Hartman, A. N., Weisenberger, D. J., Laird, P. W., et al. (2015). Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology. 148*, 77–87.

Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology. 138*, 2059–2072.

Prof. Feza Yarbuğ Karakayalı, MD. What is Colorectal Cancer? https://fezayarbugkarakayali.com.tr/en/diseases/colon-and-rectum-cancer/what-is-colorectal-cancer/ adresinden erişildi.

Punt, C. J., Koopman, M., Vermeulen, F. (2017). From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer, Nature reviews Clin. Oncol. 14, 235-246.

Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the 2^ (-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3),71.

Ravindranath, A. J., & Cadigan, K. M. (2016). The Role of the C-Clamp in Wnt-Related Colorectal Cancers. *Cancers (Basel). 8*, 74.

Reddy, B. S., Rao, C. V., Seibert, K. (1996). Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. Cancer Res. Oct 15; 56(20): 4566-9

Rosen, P., Fireman, Z., Figer, A., et al. (1986). Colorectal tumor screening in women with a past history of breast, uterine, or overian malignances. Cancer. 57: 1235-9.

Rothwell, P. M., Wilson, M., Elwin, C. E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C. P., ve ark. (2010). Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet. 376*, 1741–1750.

Sadanandam, A., Lyssiotis, C. A., Homicsko, K., Collisson, E. A., Gibb, W. J., Wullschleger, S., et al. (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat. Med. 19*, 619–625.

Saha, S., Choi, H., Kim, B., Dayem, A., Yang, G., Kim, K., ve ark. (2017). KRT19 directly interacts with β-catenin/RAC1 complex to regulate NUMB-dependent NOTCH signaling pathway and breast cancer properties. Oncogene. 36: 332–349.

Sakoda, L. C., Gao, Y. T., Chen, B. E., Chen, J., Rosenberg, P. S., Rashid, A., ve ark. (2006). Carcinogenesis.

Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R. L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., ve ark. (1995). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. Cancer Res. Sep 1; 55(17): 3785-9.

Schrock, T., Çev.Gören A, Koç, M., Gürel, E. (1989). Kolon ve rektum kanserleri. (Current surgical diagnosis & treatment) Çağdaş Cerrahi. Türkiye klinikleri kitabevi, Ankara, pp:695.

Schweiger, M. R., Hussong, M., Röhr, C., Lehrach, H. (2013). Genomics and epigenomics of colorectal cancer. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med *5(2)*: 205-219.

Shelton, A. A., & Wong, W. D. (1999). Colorectal Cancer. In Current Surgical, Therapy, Cameron SL (ed). St. Louis, Mosby. 217-228.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G. S., Barzi, A., ve ark. (2017). Colorectal cancer statistics, *CA Cancer J. Clin. 67*, 177–193.

Sinicrope, F. A., Shi, Q., Smyrk, T. C., Thibodeau, S. N., Dienstmann, R., Guinney, J., et al. (2015). Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology*. *148*, 88–99.

Slattery, M. L. (2004). Physical activity and colorectal cancer. *Sports Med 34*, 239–252.

Soslow, R. A., Dannenberg, A. J., Rush, D., Woerner, B. M., Khan, K. N., Masferrer, J., ve ark. (2000). 15 *PTGS2* is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. 89(12): 2637–2645.

Souza, R. F., Shewmake, K., Beer, D. G., Cryer, B., Spechler, S. J. (2000). Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. Cancer Res. Oct 15; 60(20): 5767-72).

Spigelman, A., Murray, V., Phillips, R. (1989). Cancer and the Peutz-Jeghers Syndrome. 30: 1588.

Stathopoulos, E. N., Sanidas, E., Kafousi, M., Mavroudis, D., Askoxylakis, J., Bozionelou, V. ve ark. (2005). Detection of CK-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood of breast cancer patients with histologically and immunohistochemically negative axillary lymph nodes. Ann Oncol 16: 240-246.

Steele, G. D., Mayer, R. J. (1991). Adenocarcinoma of the colon and rectum. In Surgery of the Alimentary Tract, Zuidema GD. (ed). WB Saunders Company. Vol 4, Chapter 11: 118-132.

The Human Protein Atlas. Prostaglandin-endoperoxide synthase 2, *PTGS2*. "https://www.proteinatlas.org/ENSG00000073756-*PTGS2* /tissue" 20-Mayıs-2019 tarihinde alınmıştır.

Tougeron, D., Sha, D., Manthravadi, S., Sinicrope, F. (2013) Aspirin and colorectal cancer: back to the future. *Clin Cancer Res* 20 (5): 1087–1094.

Traweek, S. T., Liu, J., Battifora, H. (1993). Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction. Am J Pathol 142: 1111-1118.

Tsujii, M., & DuBois, R. N. (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. Cell. 83, 493–501.

Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R. N. (1998) Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 93, 705– 716.

Van Der Velden, L.A., et al. (1993). Cytokeratin expression in normal and (pre)malignant head and neck epithelia: an overview. Head Neck 15: 133-146.

Van Eyken, P., (1991). Immunocytochemistry of cytokeratins in primary human liver tumors. APMIS Suppl. 23: 77-85.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., ve ark. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med. 319,* 525–532.

Vu, T., & Datta, P.K. (2017). Regulation of EMT in colorectal cancer: A culprit in metastasis. *Cancers (Basel). 9*, 171.

Walther, A., Houlston, R., Tomlinson, I. (2008). Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. Gut. 57:941–50.

Wang, L., Cunningham, J. M., Winters, J. L., et al. (2003). BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. Cancer Res. 63:5209–12.

Wang, W. L., Huang, H. C., Kao, S. H., et al. (2014). Slug is temporally regulated by cyclin E in cell cycle and controls genome stability. Oncogene.

Xie, J., Itzkowitz, S. H. (2008). Cancer in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol*. *14*, 378–389.

Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W. G., Isaacs, W. B., & De Marzo, A. M. (2004). Cyclooxygenases in cancer: Progress and perspective. Cancer letters 215(1), 1-20.

Zhang, B., Wang, J., Wang, X., Zhu, J., Liu, Q., Shi, Z., et al. (2014). Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature. 513*, 382–387.

Zimmermann, K. C., Sarbia, M., Weber, A. A., Borchard, F., Gabbert, H. E., Schror, K. (1999). Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. Cancer Res. Jan 1; 59(1): 198-204.

Zlobec, I., Vuong, T., Compton, C. C., Lugli, A., Michel, R. P., Hayashi, S., ve ark. (2013). Combined analysis of VEGF and EGFR predicts complete tumour response in rectal cancer treated with preoperative radiother-apy. Br J Cancer *98(2)*: 450-456.

Zoratto, F., Rossi, L., Verrico, M., Papa, A., Basso, E., Zullo, A., ve ark. (2014) Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis. *Tumor Biology*; doi:10.1007/s13277-014-1845-9.