T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

SOX15'İN TİROİD KANSERİ HÜCRE HATTINDA WNT/B-KATENİN VE PI3K/AKT YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

GÜNAY GALAMİYEVA

DANIŞMAN
PROF. DR. AYŞE NUR BUYRU

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2022

TEŞEKKÜR

Beni güzel çalışma ekibine dahil ederek iyi arkadaşlar kazanmamı sağlayan, yüksek lisans süreci boyunca bana yol gösteren ve ilgisinden güç aldığım, sevgili danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU'ya,

Eğitimim süresince bana hep destek olan arkadaşım Narmina MALİKOVA'ya

Eğitime başladığım yabancı ülkede bana hiç yabancılık hiss ettirmeğen, yüksek lisans tez çalışmam sırasında her zaman her koşulda sevgi, ilgi ve yardımlarını esirgemeden bana yardımcı ve destek olan dostlarım Ceren ORHAN, Asuman ÇELEBİ ve Ayşegül SOYSAL'a

Her düştüğümde yanımda olan ve desteklerini benden esirgemeyen, Deniz JAFAROV'a

Sabırla beni destekleyen canım AİLEM'e

Derin ve sonsuz teşekkürler…

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. İnsan Tiroid Bezi ve Fizyolojik İşlevi 2
2.2. Tiroid Kanseri ve Sınıflandırması 3
2.3. Epidemiyoloji 6
2.3.1. Görülme Sıklığı ve Risk Faktörleri 6
2.4. Tiroid Kanserinin TNM Evrelemesi 8
2.5. Tiroid Tümörlerinin Moleküler Genetiği 10
2.5.1. RET 11
2.5.2. RET/PTC Gen Füzyonu 11
2.5.3. BRAF 12
2.5.4. BRAF Gen Füzyonu 12
2.5.5. RAS 12
2.5.6. PIK3CA 12
2.5.7. p53 13
2.5.8. P27 13
2.5.9. PTEN 13
2.5.10. RASSF1A 14
2.5.11. NTRK1 Füzyon Geni 14
2.5.12. PPARγ Gen Füzyonu 14
2.5.13. THADA Gen Füzyonu 14

2.5.14. Mitokondri DNA'sı.....15
2.5.15. miRNA'lar.....15
2.5.16. Gene-özgü Promotor Metillenmesi.....15
2.6. Tiroid Kanseri Sinyal Yolakları.....16
2.6.1. PI3K/Akt Sinyal Yolağı.....16
2.6.1.1. Akt.....17
2.6.1.2. Tiroid Kanserinde PI3K/Akt Sinyal Yolağı.....18
2.6.2. Wnt/β-katenin Sinyal Yolağı.....19
2.6.2.1. Kanonik Olmayan Wnt/β-katenin Sinyal Yolağı.....20
2.6.2.2. Kanonik Wnt/β-katenin Sinyal Yolağı.....21
2.6.2.3. Tiroid Kanserinde Wnt/β-katenin Sinyal Yolağı.....23
2.7. Kanserde Yazılım Etmenleri.....23
2.7.1. Sox Ailesi.....24
2.7.2. SOX Ailesinin Tümörijenezde Onkogenik Ve Tümör Baskılayıcı Rolleri.....25
2.7.3. SOX15 Geni Ve Proteini.....27
2.7.4. *SOX15*'in Gelişim Ve Kanser Biyolojisindeki Rolü.....28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....30
3.1. Gereç.....30
3.1.1. Materyal.....30
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....30
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....31
3.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Besiyeri ve Tamponların Hazırlanması.....32
3.1.4.1. MDA-T32 ve Nthy-ori 3-1 Hücre Hatları için Besiyeri.....32
3.1.4.2. Western Blot Çözeltileri.....33
3.1.4.3. MTT Çözeltisi.....33
3.1.5. Kullanılan Antikorlar ve Protein Standartları.....33
3.2. Yöntem.....34
3.2.1. Hücre Kültürü.....34
3.2.1.1. Stok Hücre Hatlarının Çözdürülmesi:.....34
3.2.1.2. Besiyeri Değişimi.....35
3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması.....35
3.2.1.4. Hücre Stoklarının Oluşturulması (Hücrelerin Dondurulması):.....35
3.2.1.5. Hücre Sayımı.....36

3.2.2. SOX15 Geninin Tiroid Hücre Hattında siRNA İle Susturulması 37
3.2.2.1. siRNA'ların Hazırlanması 37
3.2.2.2. Hücrelere siRNA'ların Transfeksiyonu 37
3.2.3. MTT Testi 38
3.2.4. Hücre Lizatından RNA Eldesi 39
3.2.5. cDNA Sentezi 40
3.2.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (GZ-PZR) 41
3.2.7. Hücre Lizatından Protein Eldesi 42
3.2.8. Western Blotlama 43
3.2.8.1. Proteinlerin Jele Yüklenmesi ve Elektroforezi 44
3.2.8.2. Jeldeki Proteinlerin Membrana Aktarılması 44
3.2.8.3. Blokaj Aşaması 45
3.2.8.4. Membrandaki Proteinlerin Görüntülenmesi 45
3.2.8.5. Stripping 45
3.2.9. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi 45
4. BULGULAR 47
4.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları 47
4.1.1. SOX15 Gen Ifade Ve Sirna İfade Sonuçları 47
4.1.2. SOX15 Sirna Susturmasının C-MYC Gen Ifade Düzeyine Etkisi 48
4.1.3. SOX15 Sirna Susturmasının CCND1 Gen Ifade Düzeyine Etkisi 48
4.1.4. SOX15 Sirna Susturmasının CTNNB1 Gen Ifade Düzeyine Etkisi 49
4.1.5. SOX15 Sirna Susturmasının AKT1 Gen Ifade Düzeyine Etkisi 50
4.2. SOX15, AKT1, Pakt1, CTNNB1, CCND1 Protein Ifade Sonuçları 51
5. TARTIŞMA 55
KAYNAKLAR 59
HAM VERİLER .....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
FORMLAR .....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
ETİK KURUL KARARI .....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
PATENT HAKKI İZNİ .....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 72
ÖZGEÇMİŞ 73

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Papiller, foliküler, kötü diferansiye, hürtle hücreli ve anaplastik tiroid karsinomu için birincil tümör (T), bölgesel lenf nodu (N) ve uzak metastaz (M) tanımı (42) 9
Tablo 2-2: Farklılaşmış tiroid kanseri için kanser prognostik evre grupları (AJCC 8. Baskı) (42) 10
Tablo 2-3: Anaplastik tiroid kanseri için kanser prognostik evre grupları (AJCC 8. Baskı) (42) 10
Tablo 3-1: Transfeksiyon için karışımın hazırlanması 38
Tablo 3-2: Hücre lizatından RNA eldesi yöntemi 39
Tablo 3-3: cDNA sentezinde kullanılan çözeltilerin hacimleri ve tepkime koşulları 40
Tablo 3-4: SYBR® Green Master Mix'li GZ-PZT yönteminin karışım içeriği 41
Tablo 3-5: Evrensel Prob Kütüphanesi kullanılarak hazırlanan GZ-PZT yönteminin karışım içeriği 42
Tablo 3-6: Hücre lizatından protein eldesi yönteminin akış şeması 43
Tablo 4-1: Tümör ve normal tiroid hücre hatlarında SOX15 mRNA ifade sonuçları (SS: Standart Sapma) 47
Tablo 4-2: SOX15 siRNA uygulaması sonrası Nthy-ori 3-1 hücre hattında SOX15 mRNA ifade düzeyi 47
Tablo 4-3: Tümör ve normal tiroid hücre hatlarında C-MYC mRNA ifade sonuçları (SS: Standart Sapma) 48
Tablo 4-4: SOX15 siRNA uygulaması sonrası Nthy-ori 3-1 hücre hattında C-MYC mRNA ifade düzeyi 48
Tablo 4-5: Tümör ve normal tiroid hücre hatlarında CCND1 mRNA ifade sonuçları (SS: Standart Sapma) 49
Tablo 4-6: SOX15 siRNA uygulaması sonrası Nthy-ori 3-1 hücre hattında CCND1 mRNA ifade düzeyi 49
Tablo 4-7: Tümör ve normal tiroid hücre hatlarında CTNNB1 mRNA ifade sonuçları (SS: Standart Sapma) 50
Tablo 4-8: SOX15 siRNA uygulaması sonrası Nthy-ori 3-1 hücre hattında CTNNB1 mRNA ifade düzeyi 50

Tablo 4-9: Tümör ve normal tiroid hücre hatlarında AKT1 mRNA ifade sonuçları (SS: Standart Sapma) 51
Tablo 4-10: SOX15 siRNA uygulaması sonrası Nthy-ori 3-1 hücre hattında AKT1 mRNA ifade düzeyi 51
Tablo 4-11: MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattlarında çekirdekte ve sitoplazmada SOX15, AKT1, pAKT1, CTNNB1, CCND1 protein düzeyleri 54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Tiroid bezinin anatomisi ve fizyolojik fişlevleri (6,7) 2
Şekil 2-2: Tiroid hormonu salgılanması 3
Şekil 2-3: Foliküler hücre kaynaklı tiroid kanserinin gelişim şeması (19) 5
Şekil 2-4: A.B.D.'de tiroid kanseri vakaları ve ölümlerin sayısı (31). 7
Şekil 2-5: PI3K/Akt Sinyal Yolağı (90). 16
Şekil 2-6: Akt'nin Etkinleşmesi (99). 18
Şekil 2-7: Tiroid kanserinde sinyal yolakları (111) 19
Şekil 2-8: Kanonikal Wnt/β-kateninin Sinyallenmesi. a) β-kateninin übikitinlenip proteozomal yıkımı ile hedef genlerin yazılımı bastırılmış durumdadır. b) Wnt sinyali etkin olduğunda çekirdeğe geçen β-katenin hedef genlerin yazılımını gerçekleştirir (121). 22
Şekil 2-9: SOX ailesinin sınıflandırılması (163). 25
Şekil 2-10: SOX ailesinin gen ifade düzeylerinin pan-kanser analizi (164). 26
Şekil 2-11: SOX15 geninin kromozom üzerindeki yeri (51). 27
Şekil 2-12: SOX15 geninin transkriptleri 27
Şekil 2-13: SOX15 proteininin etkileşimde olduğu proteinler (175). 28
Şekil 3-1: Thoma lamı üzerinde hücre sayımı için kullanılan alanların şematik gösterimi. 37
Şekil 4-1:MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattına ait Sox15 western blot görüntüsü. 52
Şekil 4-2:MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattına ait AKT1 western blot görüntüsü 52
Şekil 4-3: MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattına ait pAKT1 western blot görüntüsü. 52
Şekil 4-4: MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattına ait CTNNB1 western blot görüntüsü. 53
Şekil 4-5: MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattına ait CCND1 western blot görüntüsü. 53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

TRH = Tirotropin Salgıllatırıcı Hormon

T3 = triiodotironin

T4 = Tetraiyodotrionin

TSH = Tiroid Uyarıcı Hormon

FA = Folliküler Adenom

PTC = Papiller Tİroid Kanseri

FTC = Foliküler Tiroid Kanseri

HCC = Hürthle Hücreli Tiroid Kanseri

PDTC = Az farklılaşmış Tiroid Kanseri

ATC = Anaplastik Tiroit Kanseri

MTC = Medüller Tiroid Kanseri

MEN2 = Multipl Endokrin Neoplazi Tip 2

RET = transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenen

NFκβ (NFKB) =Nükleer Faktör Kapa Beta

DNA = Deoksiribonükleik asit

GDNF = Glial hücre hattından türetilmiş nörotrofik faktör

BRAF = B-Raf adlı proteini kodlayan gen

Akt = Protein kinaz B

MAPK = Mitojenle aktive edilen protein kinaz

AKAP9 = A-Kinaz Çapa Proteini 9

PI3K = Fosfatidilinositol 3-kinaz

PTEN = Tensin benzeri tümör baskılayıcı fosfataz

CDK = Siklin bağımlı kinaz

KİP1 = Kinaz baskılayıcı protein 1

RASSF1A = Ras ilişkili alan ailesi 1A

NTRK1 = Nörotrofik tirozin kinaz almacı 1

PPARγ = Peroksizom proliferatör-etkinleştirici almaç γ

THADA = Tiroid adenomu ile ilişkili gen

DAPK = Kalsiyum/Kalmodüline bağımlı serin treonin kinaz

GSK-3β = Glikojen sentaz kinaz 3β

PIP2 = Fosfotidilinositol 4,5-bifosfat

PIP3 = Fosfotidilinositol 3,4,5-trifosfat

mTOR = Rapamisin kinazın mekanik hedefi

FGFR2 = Fibroblast büyüme faktörü 2

TRβPV = Mutant tiroid hormonu almacı β

G6PD = Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz

B2M = beta-2-mikroglobulin

CCND1 = Siklin D1

CTNNB1 = β-katenin

PCP = Planar Hücre Polaritesi

TCF = T-hücre etmenleri

LEF = Lenfoid arttırıcı etmenler

APC = Adenomatöz Polipoz Koli

CK1α = Kazein Kinaz 1α

HMG = Yüksek mobilite grup

MDA-T32 = Tiroid kanseri hücre hattı

Nthy-ori 3-1 = Tiroid normal hücre hattı

MTT = 3-(4,5–dimethyltiazol–2–yl)-2,5diphentyltetrazolium bromide

NO_2 = Nitrit dioksit

FBS = Fetal sığır serumu

DMSO = Di Metil Sülfoksit

siRNA = susturucu RNA

SDS-PAGE = Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi

RNA = Ribonükleik asit

WHO = Dünya Sağlık Örgütü

µg = mikrogram

µl = mikrolitre

ÖZET

Günay G. (2021). Sox15'in Tiroid Kanseri Hücre Hattında Wnt/B-Katenin ve Pi3k/Akt Yolağı Üzerine Etkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Tiroid kanseri, son yıllarda insidansı hızla artan yaygın bir endokrin habis tümörüdür. Tiroid kanserinin oluşumu, gelişimi, invazyonu ve metastazı, çeşitli hücresel sinyal yolaklarının ve ilgili moleküllerin işlev bozukluğu ile ilişkilidir. Çalışmanın amacı; tiroid kanserinde SOX15'in olası işlevinin Wnt/β-katenin ve PI3K/AKT yolakları üzerine etkisini belirlemektir.

SOX15 geninin sağlıklı tiroid hücre hattında siRNA ile susturma işlemi sonrası WNT/β-katenin sinyal yolağı genlerinden CTNNB1, CCND1 ve C-MYC'in mRNA ve protein düzeyleri; PI3K/AKT sinyal yolağı genlerinden AKT1'in mRNA ve protein düzeyi, p-AKT1 protein düzeyini analiz edildi. Ayrıca tiroid tümör ve normal hücre hatlarında aynı genlerin mRNA ve protein ifadelerine bakılmıştır.

SOX15 geni tiroid normal hücre hattında %86 susturuldu. Susturma sonrası; normal hücre hattında C-MYC mRNA ifadesi değişmezken, CCND1, AKT1 ifadesi artmış ve CTNNB1, SOX15 ifadesi azalmıştır. Protein düzeyinde analiz zamanı ise susturma sonrası; normal hücre hattında SOX15, AKT, p-AKT1, CTNNB1, CCND1 ve C-MYC'in protein düzeyi azalmış bulundu.

Sonuç olarak; Tiroid normal hücre hattında SOX15 geni yokluğunda C-MYC'in ifadesinin değişmemesi etkileşime girmediklerini göstermektedir. SOX15' in tiroid kanserinde AKT1 ve CCND1 gen ifadesi üzerine baskılayıcı etkisi söz konusudur. SOX15 geni CTNNB1 ile aynı yönlü korelasyon göstermektedir. Öngörülen bu ilişkileri belirlemek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Tiroid kanseri, SOX15, siRNA, Wnt/β-katenin, PI3K/AKT

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34219

ABSTRACT

Gunay G. (2021). Investigation of the Effect of SOX15 on Wnt / β-Catenin and PI3K / AKT Pathways in Thyroid Cancer Cell Line. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. Master of Science Thesis. İstanbul.

Thyroid cancer is a common endocrine malignancy that has rapidly increased in global incidence in recent decades. The changes of different signaling pathways and related molecular dysfunction promote the occurrence, development, invasion and metastasis of thyroid cancer. We aimed to detect the investigation of the effect of SOX15 on Wnt / β-catenin and PI3K / AKT pathways in thyroid cancer.

The mRNA and protein levels of WNT/β-catenin and PI3K/AKT signal pathways such as CTNNB1, CCND1, C-MYC and AKT1, pAKT1 respectively were analyzed after silencing of SOX15 gene with siRNA in thyroid normal cell line. In addition, mRNA and protein expressions of the same genes in thyroid tumor and normal cell lines were analyzed.

The SOX15 gene was 86% knockdown in the thyroid normal cell line. After knockdown of SOX15 gene we detected, mRNA expression of C-MYC unchanged in normal cell line, increased expression of CCND1, AKT1 and decreased expression of CTNNB1, SOX15. Western blotting results after knockdown of SOX15, protein levels of SOX15, AKT, pAKT1, CTNNB1, CCND1 and C-MYC were found to be decreased in normal cell lines.

As a result, the unchanged expression of C-MYC in the absence of the SOX15 gene in the thyroid normal cell line indicates that they do not interact. SOX15 has a suppressive effect on AKT1 and CCND1 gene expression in thyroid cancer. The SOX15 gene is inversely correlated with CTNNB1. Further studies are needed to determine these predicted relationships.

Key Words: Thyroid cancer, SOX15, siRNA, Wnt/β-katenin, PI3K/AKT.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No.34219

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tiroid bezi ve hormonları, tüm omurgalılarda organ gelişiminde, vücut büyümesi ve enerji harcaması gibi temel fizyolojik mekanizmaların homeostatik kontrolünde rol oynar (1).

Tiroid kanseri, son yıllarda insidansı hızla artan yaygın bir endokrin habis tümörüdür ve tüm kanserlerin %2,5'ini ve endokrin tümörlerin yaklaşık %90'ını oluşturur. Tiroid bezi hücrelerinin karsinogenezi tiroid kanseri oluşumuna yol açar. Tiroid kanseri gelişimi, yaşamın erken döneminde iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma, genetik yatkınlık, diyette iyot alımı, çevresel kanserojenler ve genetik yatkınlık gibi çeşitli risk faktörleriyle ilişkilidir (2).

Tiroid tümörlerinin moleküler analizi, birçok genetik değişikliğin kanser gelişiminde rol oynadığını göstermiştir. Tiroid kanserinin oluşumu, gelişimi, invazyonu ve metastazı, çeşitli hücresel sinyal yolaklarının ve ilgili moleküllerin işlev bozukluğu ile ilişkilidir. Fosfoinositol 3 kinaz (PI3K), Wnt gibi farklı reseptör-tirozin kinaz (RTK) bağımlı sinyal ve proliferasyon yolaklarının düzensizliği, tiroid kanserinin çok aşamalı tümörijenik sürecinde yer alır. Wnt/β-katenin sinyal yolu, tiroid habis tümörlerinde anahtar sinyal yolaklarından biridir. Bu yolaklar SOX genleri dahil olmak üzere farklı genler aracılığı ile düzenlenebilir (3).

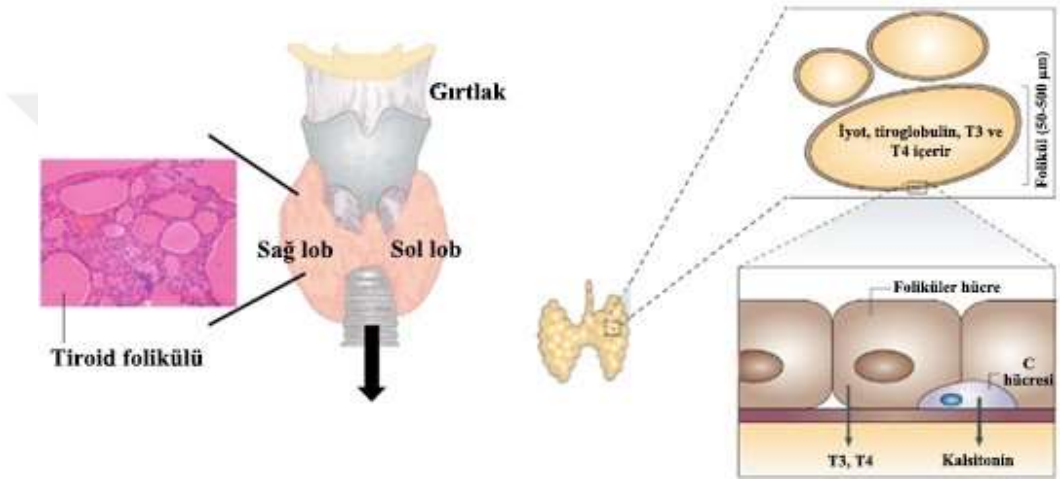
Sox ailesi tümör oluşumunda yazılım etmeni olarak da görev almaktadır. Korunmuş bir yüksek mobilite grup (HMG) alanı ile DNA'ya bağlanarak yazılımsal düzenleyici olarak işlev görmektedir. SOX yazılım etmenleri, kanserde hücre kaderini ve farklılaşmayı kontrol etmektedir. Ayrıca birçok SOX ailesi üyesi ilerleme ve metastazda rol oynamaktadır (4). Memelilerde SOX15 (Cinsiyet belirleyici bölge Y-kutusu 15 geni), SOX G alt grubunun tek üyesi olup DNA bağlanmasını kolaylaştıran yüksek mobilite grup alanına sahiptir (5).

Bu çalışmada, SOX15 geninin tiroid kanserinde etki mekanizmasını belirlemek için; tiroid kanserli ve sağlıklı hücre hatlarında, kanserle ilişkili hücresel mekanizmaları düzenleyen iki önemli yolak olan Wnt/β-katenin ve PI3K/AKT ile etkileşimi araştırılacak. Bu projenin amacı; tiroid kanserinde SOX15'in olası işlevinin Wnt/β-katenin ve PI3K/AKT yolakları üzerine etkisini belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

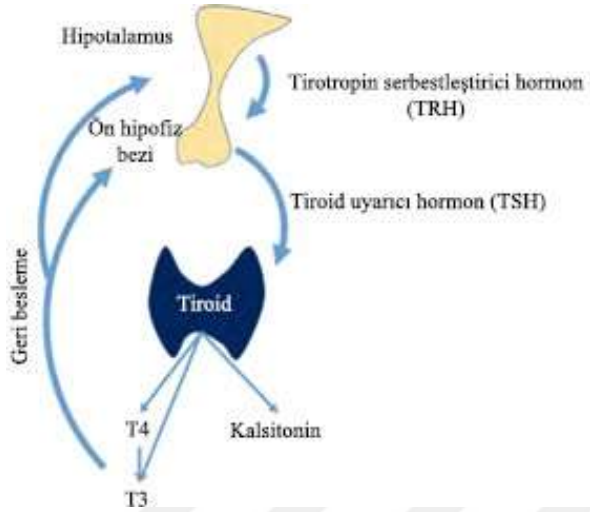
2.1. İnsan Tiroid Bezi ve Fizyolojik İşlevi

Boyunda trakeanın önünde ve çevresine yerleşik olan tiroid bezi; foliküler hücrelerden (tirositler), parafoliküler kalsitonin üreten C hücrelerinden, endotel hücrelerin, fibroblastlardan ve lenfositlerden oluşur (6).



Şekil 2-1: Tiroid bezinin anatomisi ve fizyolojik fişlevleri (6,7)

Tiroid bezinin temel yapısal ve işlevsel bileşeni folikül olarak adlandırılır (Şekil 2-1). Hormon, epitel hücre tabakası ile çevrili olan folikülde sentezlenir ve depolanır. Foliküler hücreler iyodürü kandan alır ve iyota oksitledikten sonra triglobulin proteinlerine bağlanmak üzere kolloide salgılar. Oluşan protein proteolize uğrayarak oluşan T3 (triiyodotironin) ve T4 (tetraiyodotironin) kan dolaşımına salgılanır. Depo formu olan T4 bir iyot atomunu serbest bırakarak etkin olan T3 hormonuna dönüşür. Hipotalamus tarafından üretilen TRH (tirotropin salgılayan hormon) hipofizdeki almaçlara bağlanır ve TSH (tiroid uyarı hormon) salgılanır. Foliküler hücrelerdeki TSH almaçları tiroid hormonunun fazla salgılanmasının önlenmesiyle görevlidir. Tiroid hormonlarının sentezi ve salgılanması, hipotalamus-hipofiz-tiroid aksının geri bildirim sistemi aracılığı ile gerçekleşir (Şekil 2-2) (6).



Şekil 2-2: Tiroid hormonu salgılanması

Tiroid; hücre metabolizması, büyüme ve gelişiminde rol oynamaktadır. Tiroid işlevinin bozulması sonucunda tiroid hormon düzeylerindeki artış yada azalma sonunda hipertiriodizm ve ya hipotiriodizme neden olur (7).

2.2. Tiroid Kanseri ve Sınıflandırması

Çok sık karşılaşılan tiroid nodüllerinin %90'ından fazlası selim lezyonlar olmasına rağmen klinik olarak önem taşırlar. Tiroid kanseri vakalarının yaklaşık %4-6,5'inde (8,9) çoğunu foliküler adenomların (FA'lar) oluşturduğu nodül oluşumu gözlenmektedir. FA'ların yaklaşık %5'i habis tümörlerdir (10). Habis tiroid tümörleri farklılaşmış, az farklılaşmış ve farklılaşmamış karsinomlar olarak üçe ayrılır. Tiroid bezinin habis neoplazmaları epitel kökenli veya epitel olmayan habis oluşumlar olarak sınıflandırılır. Epitel kökenli tümörler foliküler hücrelerden veya parafoliküler C hücrelerinden köken alırken; diğer sarkomlar ve habis lenfomalar epitel olmayan tümörleri içermektedir (11):

I. Epitel kökenli tümörler
   A. Selim Foliküler Tümörler
      - Foliküler Adenom
   B. Foliküler hücrelerin habis tümörleri
      - Foliküler karsinom

- Papiller karsinom
- Az farklılaşmış karsinom
- Anaplastik (farklılaşmamış) karsinom

C. C hücrelerinin habis tümörleri
- Medullar karsinom

II. Epitel kökenli olmayan tümörler

A. Habis lenfoma

B. Sarkomalar

2.2.1. Papiller Tiroid Kanseri

En yaygın görülen tiroid kanseri tipi Papiller tiroid kanseri (PTC), hastalarda katı bir nodül olarak ortaya çıkar ve bu nodüller her iki tiroid lobuna yayılarak tümör oluşturabilir. PTC'nin yayılmasında lenf sistemi büyük öneme sahiptir. Genellikle metastazın ilk görüldüğü yer servikal lenf düğümleridir (12).

PTC tanısında mikroskobik olarak buzlu cam görünümlü çekirdek ve yalancı inklüzyonların bulunması önem taşımaktadır. Bunlarla birlikte kalsiyum birikimi ile oluşan psammoma cisimcikleri de görülmektedir (13). PTC'nin en çok gözlenen histolojik alt türleri; papiller tiroid mikrokarsinomu, foliküler, onkositik, berrak hücreleri, diffüz sklerozan, uzun hücreli, kolumnar hücre, katı ve kribriformdur. Bu varyantlardan katı, uzun hücreli ve kolumnar hücre şeklinde olanlar kötü prognoz ve vasküler invazyon ile tanımlanır (14).

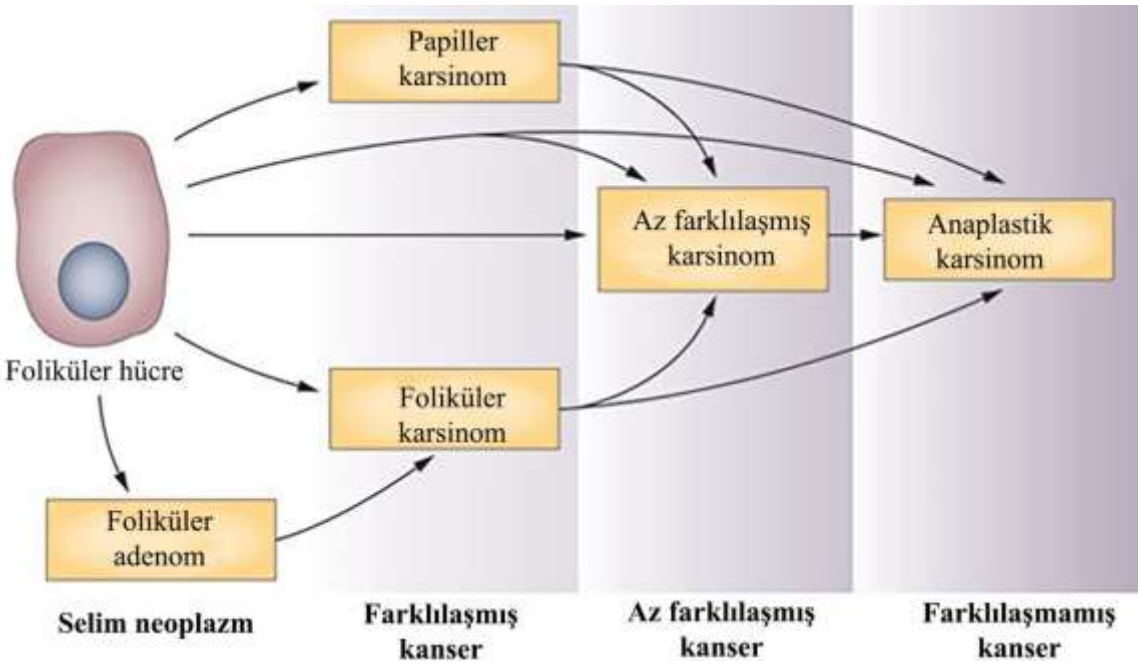
2.2.2. Foliküler Tiroid Kanseri

Foliküler tiroid kanseri (FTC), PTC'den farklı olarak foliküler hücre farklılaşması sonucu oluşur. 50 yaşın üzerindeki kadınlarda ve iyot eksikliği olan hastalarda daha sık görülmektedir (15). PTC'ye kıyasla daha çok hematojen olarak yayıldığı gözlenmiştir. Öncelikle akciğer ve kemik olmak üzere uzak metastazlar oluşturabilmektedir (16). Ayrıca FTC, fibröz kapsülle çevrili selim bir tiroid tümörü olan foliküler tiroid adenomundan (FTA) da köken alabilmektedir (17).

FTC'nin nadir bir alt türü olan Hürthle hücreli karsinom (HCC) %75 oranında Hürtle hücrelerinden oluşmaktadır. Hürtle hücreleri yüksek mitokondri içerikleri

nedeniyle çok miktarda eozinofilik granüler sitoplazmaya sahip çok kenarlı hücrelerdir (18).

FTC, PTC'ye göre daha agresif bir tiroid kanseri türüdür. Özellikle tümörün invazyon derecesi FTC'nin prognozunda önemli rol almaktadır.Tümör invazyonunun gözlendiği hastalarda sağ kalım %50'lerde iken invazyonun olmadığı veya az olduğu hastalarda sağ kalım oranı çok daha yüksektir (15).



Şekil 2-3: Foliküler hücre kaynaklı tiroid kanserinin gelişim şeması (19)

2.2.3. Az Farklılaşmış Tiroid Kanseri

Az farklılaşmış tiroid kanseri (PDTC), farklılaşmış tiroid kanserleri (PTC/FTC) ile anaplastik tiroid kanseri (ATC) arasında orta derecede histolojik ve prognostik benzer özellikler gösteren tiroid tümörlerini içerir (19).

Turin'de düzenlenen bir uzlaşı toplantısı sonucunda gelişmiş çekirdek özelliklerinin olmaması, çekirdeklerin kıvrımlı bir şekilde gözlenmesi, nekrozun ve mitotik etkinliklerin çok olması PDTC'de tanı kriterleri olabileceği kararı alınmıştır (Şekil 2-3) (20). PDTC'ler çoğunlukla hızlı büyüyen tiroid nodülleridir ve lenf düğümlerinden akciğer ve kemik gibi organlara uzak metastaz yapabilmektedir. PDTC'nin prognozu PTC'ye göre daha kötü olup 5 yıllık sağkalım oranı %20-60 arasındadır (21).

2.2.4. Anaplastik Tiroid Kanseri

ATC, en agresif seyreden ve ölümcül olan tiroid kanserleriden biridir (22). Farklılaşmış tiroid tümörlerinden veya doğrudan foliküler hücrelerden gelişebilir (Şekil 2-3). Histolojik özellikleri arasında invazyon, şekilsiz çekirdekler ve mitoz etkinliğinin artması yer almaktadır. ATC hastalarda disfaji, disfoni ve nefes darlığı gibi belirtilere neden olan ve hızlı büyüyen bir tiroid nodülüdür. Ortalama sağkalım süresi 6 aydır ve hastaların %50'sinde tanı konulduğunda uzak metastazlar gözlemlenmektedir (23).

2.2.5. Medüller Tiroid Kanser

Parafoliküler C hücrelerinden oluşan medüller tiroid kanseri (MTC), tiroid kanserlerinin %5-8'ini oluşturur. Vakaların yaklaşık %75'i sporadic, kalan kısmı ise kalıtsal multipl endokrin neoplazi tip 2 (MEN2) sendromları sonucu olup (24) MEN2 hastalarının büyük çoğunluğu, RET (transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenen) proto-onkogeninde mutasyonu taşımaktadır (25). MTC; servikal lenf düğümlerine metastaz yapma eğiliminde olup uzak metastazlar genellikle karaciğer, kemik ve akciğerlerde görülmektedir (26).

2.3. Epidemiyoloji

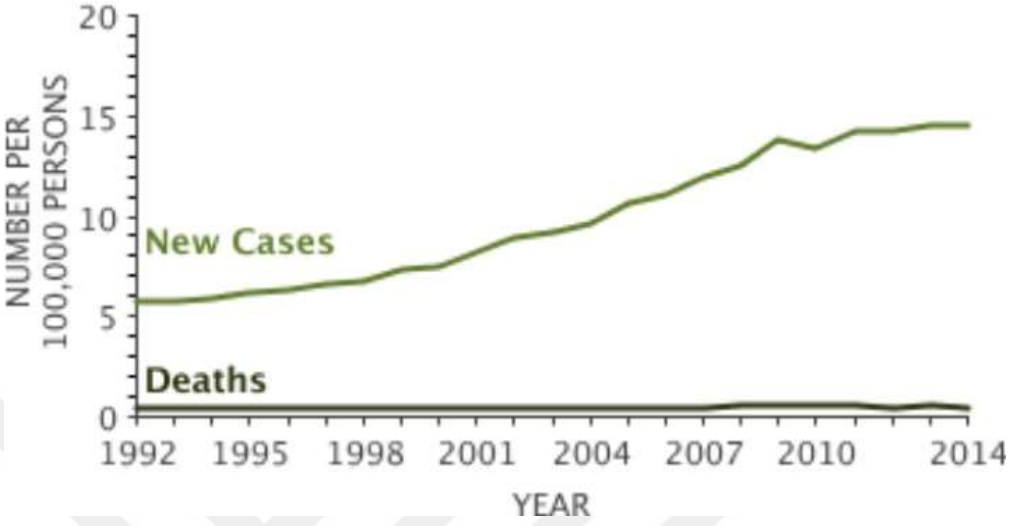
2.3.1. Görülme Sıklığı ve Risk Faktörleri

Tiroid kanserinin görülme sıklığı kadınlarda beşinci sırada yer alırken, erkeklerde yirminci sıradadır (27). Tiroid kanseri çocuklarda daha az görülmesine rağmen sıklığı her yıl %1 artmaktadır. Tiroid kanseri tanısı konmuş çocukların %90'ında papiller tiroid kanseri görülmektedir (2).

1975'te Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.)'de 100,000 vakada %4,9 oranında tiroid kanseri teşhis edilmiştir. Bu sayı Şekil 2-4'te gösterildiği gibi 2014 yılına kadar kademeli olarak 3 kat artmış ve 2014'te %14,3'e yükselmiştir (28). Aynı artış Asya, Avrupa, Okyanusya ve Güney Amerika gibi diğer kıtalarda da gözlemlenmiştir (29).

Amerikan Kanser Derneği A.B.D.'de 2020 yılı içinde yaklaşık 52,890 yeni tiroid kanseri tanısı konulduğunu (vakaların 12,720'si erkek, 40,170'i kadın) ve tiroid

kanserinden kaynaklı ölümün ise 2,180 (1,040 erkek ve 1,140 kadın) olduğunu bildirmiştir (30).



Şekil 2-4: A.B.D.'de tiroid kanseri vakaları ve ölümlerin sayısı (31).

İyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma şimdiye kadar tiroid kanseri ile ilişkili olan tek çevresel risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Ancak vakaların çoğunda diyet, genetik ve hormonal sistemler de risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (31).

İyonlaştırıcı radyasyonlara (nükleer silahlar ve kazalar) çevresel maruziyeti olan toplumlardan elde edilen verilere dayanan çalışmalara göre tiroid kanseri ile radyasyon arasında bir ilişki bulunmakta olup radyasyona maruziyeti ile yaş ters orantılı bulunmuştur. Örneğin; Beyaz Rusya'nın Çernobil nükleer kazasından ciddi şekilde etkilenen bölgelerinde 1986'daki kazadan sonra çocukluk çağı tiroid kanseri sıklığının 100 kattan fazla arttığı gözlenmiştir (31,32).

İyot, tütün veya alkol gibi faktörlerin etkisini ölçmek oldukça zor olduğundan ilgili raporlar çelişkili sonuçlar içermektedir. Örneğin; iyot, tiroid hormonu üretimi ve normal tiroid işlevi için gerekli olmasına rağmen, bazı araştırmacılar düşük iyotlu diyetin tiroid kanseri riskini arttırdığı yönünde bildiriler yaparken, diğerleri bu durumun tersini bildirmektedir (31).

Obezite ve tiroid kanseri arasındaki ilişkinin mekanizması tam olarak belirlenememiş olsa da bazı çalışmalara göre bireylerde farklılaşmış tiroid kanseri

gelişmine neden olduğu gözlemlenmiştir (33). İnsülin; foliküler hücre farklılaşması, çoğalması ve transformasyonunu düzenleyen bir hormondur. PTC hastalarının %50'sinden fazlasında insülin direnci gözlemlenmiştir (27). Obezite, hem hiperinsülinemi hem insülin direncine neden olduğundan tiroid kanseri için risk faktörleri arasında kabul edilmektedir (33).

Cinsiyet hormonları tiroid kanseri etiyolojisini etkilemektedir. Üreme çağındaki kadınlarda erkeklere göre tiroid kanseri görülme sıklığı 2-4 kat daha fazladır. Menopoz tedavisinde kullanılan ekzojen cinsiyet hormonları (estradiol) tiroid kanserinde hücre bölünmesini ve invazyonunu baskılamaktadır (34). Kadınlarda ilk hamileliğin düşük veya kürtaj ile sonlanması tiroid kanseri için risk faktörleri arasında yer almaktadır (35).

Cowden, Werner, Gardner gibi kalıtsal hastalıklar farklılaşmış tiroid kanserinin görülme sıklığını arttırmaktadır (36). Bu hastalıklara genetik yatkınlığı olan kişilerde neoplazmların gelişme riskinin arttığı görülmüştür (37).

Tiroid karsinogenezinde en önemli risk faktörlerinden biri oksidatif strestir. Vücuttaki tepkin oksijen düzeylerinin artmasına ve antioksidan seviyelerinin düşmesine neden olduğundan kişide oksidasyon düzeyinin bozulmasına yol açar. Oksidatif stres inflamasyon sırasında oluşan süperoksit anyonlarının aşırı üretimi sonucu oluşmaktadır. Süperoksit anyonlar DNA'ya zarar vererek mutasyonlara neden olmaktadır (38).

2.4. Tiroid Kanserinin TNM Evrelemesi

TNM evreleme, kanser vakalarının risk durumlarına göre sınıflandırılmasıdır. TNM; tümör (T), lenf nodu (N) ve uzak metastaz (M) anlamına gelmekte olup tümörlerin sınıflandırılması için Pierre Denoix tarafından geliştirilmiş ve 1950 yılında Union for International Cancer Control (UICC) tarafından uyarlanmıştır (39). Günümüzde kullanılan evreleme sistemi American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından hazırlanmıştır (40).

TNM sınıflandırması, üç ana bileşenin değerlendirilmesine dayanır:

T – birincil tümörün boyutu

N – bölgesel lenf nodunun varlığı veya yokluğu ve boyutu

M – uzak metastaz durumu

Bu bileşenlere sayıların dahil edilmesi ile habislik derecesi alt evrelere ayrılarak gösterilmektedir (sırasıyla TX, T0, T1, T2, T3, T4, NX, N0, N1, N2, N3, MX, M0, M1). TNM evrelemesi ayrıca evre I, II, III ve IV olarak da düzenlenmektedir ve her alt evre a, b ve c şeklinde tekrar üçe ayrılmaktadır. Evreleme sırasında kullanılan X harfi ise T, N, ve M hakkında herhangi bir bilgi bulunmadığını ve kanserin sınıflandırılamayacağını göstermektedir (39).

AJCC'nin evreleme için hazırladığı kılavuzu birkaç yılda bir güncellenmektedir (41). Son 8. güncellemeye göre T, N, ve M tanımları Tablo 2-1'de karşılık gelen evreler (I, II, III ve IV) Tablo 2-2 ve 2-3'te gösterilmiştir (42).

Tablo 2-1: Papiller, foliküler, kötü diferansiye, hürtle hücreli ve anaplastik tiroid karsinomu için birincil tümör (T), bölgesel lenf nodu (N) ve uzak metastaz (M) tanımı (42)

T Kategorisi	T Kriteri
TX	Birincil tümör değerlendirilemez
T0	Birincil tümör kanıtı yok
T1	Sadece tiroid ile sınırlı olmak üzere tümör boyutunun ≤2 cm'ye kadar olan tümörler
T1a	Sadece tiroid ile sınırlı olmak üzere tümör boyutunun ≤1 cm'ye kadar olan tümörler
T1b	Sadece tiroid ile sınırlı olmak üzere tümör boyutunun <1 cm'den büyük fakat ≤2 cm'ye kadar olan tümörler
T2	Sadece tiroid ile sınırlı olmak üzere tümör boyutunun <2 cm'den büyük fakat ≤4 cm'ye kadar olan tümörler
T3	Sadece tiroid ile sınırlı veya sadece strep kaslarına invaze olan ekstratiroidal uzantılara sahip <4 cm'den büyük tümörler
T3a	Sadece tiroid ile sınırlı olmak üzere tümör boyutunun >4 cm'den büyük tümörler
T3b	Herhangi bir büyüklükte olan sadece strep kaslarına (sternohyoid, sternotiroid, tirohyoid veya omohyoid kaslar) invaze olan ekstratiroidal uzantılara sahip tümörler
T4	Büyük boyun yapılarındaki ekstratiroidal uzantılara sahip tümörler
T4a	Herhangi bir büyüklükteki subkutan yumuşak dokuları, larenks, trakea, özofagus veya larenks sinirlerine invaze olan ekstratiroidal uzantılara sahip tümörler
T4b	Herhangi bir büyüklükteki prevertebral fasyaya veya karotis arterine veya mediastinal damarlara invaze olan ekstratiroidal uzantılara sahip tümörler
N Kategorisi	**N Kriteri**
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez
N0	Bölgesel lenf nodu kanıtı yok
N0a	Bir ya da daha fazla sitolojik veya histolojik olarak doğrulanmış benign lenf nodu
N0b	Lokorejyonel lenf nodu metastazına dair radyolojik veya klinik kanıt yok
N1	Bölgesel nodlara metastaz
N1a	Seviye VI veya VII (pretrakeal,paratrakeal, prelarengial/Delpian veya üst mediastinal) lenf nodlarına metastaz (tek ya da çift taraflı olabilir)

N1b	Tek taraflı, iki taraflı veya kontralateral boyun lenf nodlarına (seviye I, II, III, IV veya V) veya retrofarengeal lenf nodlarına metastaz
M Kategorisi	M Kriteri
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Tablo 2-2: Farklılaşmış tiroid kanseri için kanser prognostik evre grupları (AJCC 8. Baskı) (42)

Tanı kaç yaşında kondu?	T	N	M	Evresi
<55 yaş	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M0	Evre I
	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1	Evre II
≥55 yaş	T1	N0/NX	M0	Evre I
	T1	N1	M0	Evre II
	T2	N0/NX	M0	Evre I
	T2	N1	M0	Evre II
	T3a/T3b	Herhangi bir N	M0	Evre II
	T4a	Herhangi bir N	M0	Evre III
	T4b	Herhangi bir N	M0	Evre IVA
	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1	Evre IVB

Tablo 2-3: Anaplastik tiroid kanseri için kanser prognostik evre grupları (AJCC 8. Baskı) (42)

T	N	M	Evresi
T1-T3a	N0/NX	M0	Evre IVA
T1-T3a	N1	M0	Evre IVB
T3b	Herhangi bir N	M0	Evre IVB
T4	Herhangi bir N	M0	Evre IVB
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1	Evre IVC

2.5. Tiroid Tümörlerinin Moleküler Genetiği

Tiroid tümörlerinin gelişiminde çeşitli moleküler ve genetik mekanizmalar rol almaktadır. Onkogenlerin etkinleşmesi, füzyon gen oluşumları, tümör baskılayıcı genlerin etkinliğini kaybetmesi, genlerin ifade düzeyi, proteinler ve microRNA'lar, epigenetik değişimler ve mitokondri DNA'sı değişiklikleri bu moleküler ve genetik değişimlere örnek verilebilir. Tiroid kanseri moleküler genetiğinin daha iyi anlaşılması tiroid tümör etiyolojisinin ve tümörijenezinin açıklanmasına katkıda bulunmaktadır (43).

Tiroid tümörlerinde sıklıkla onkogenlerde etkinleştirici mutasyon bulunduğu gösterilmiştir. Tiroid kanseri oluşumunda rol aldığı bilinen onkogenler RET, BRAF, H-RAS, K-RAS, N-RAS ve PIK3CA'dır (44).

Normal hücre bölünmesinin kontrolünden sorumlu olan genler tümör baskılayıcı genler olarak isimlendirilmektedir. Tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinin negatif düzenleyicileridir. Birçok çalışma bu genlerde görülen işlev kaybına neden olan mutasyonların tiroid kanserine neden olduğunu göstermektedir (45).

2.5.1. RET

10q11.2 kromozomal bölgede bulunan RET proto-onkogeni (46); tiroid, adrenal medulla, paratiroid ve enterik ganglion gibi farklı dokuların hücre zarında ifade edilen bir tirozin kinaz almacını kodlamaktadır (47). RET almaçları; bir hücre dışı, bir zar geçen ve iki hücre içi alandan oluşmaktadır (48). Glial hücre hattından türetilmiş nörotrofik faktör (GDNF) ligandı ve GDNF ailesi almaçları-α (GDNFα)'nin karmaşım oluşturması sonucu etkinleşir. Ligandın bağlanması, almacın dimerleşmesi, hücre içi alanda otofosforillenmesi ile uyarılır ve sonrasında yer alan sinyal molekülleri aracılığı ile etkisini gösterir (48,49). RET geni, tiroid kanserinin gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. MTC'de sıklıkla RET geninin 10, 11, 13, 14 ve 16. ekzonlarında mutasyon bulunduğu görülmektedir (47).

2.5.2. RET/PTC Gen Füzyonu

RET geninde meydana gelen mutasyonlar tiroid tümör gelişiminde işlev görmektedir. PTC'de ise bu durum RET geninde gerçekleşen translokasyon ve inversiyon gibi kromozomal değişiklikler ile gözlenmektedir. RET geninin 3' ucu ile diğer PTC genlerinin 5' ucu füzyon oluşturarak RET/PTC füzyon genleri oluşmaktadır. Xing'in yaptığı çalışmaya göre PTC vakalarında 11 farklı RET/PTC füzyon geni rapor edilmiştir (43). RET/PTC füzyon genleri yetişkin hastalara (%2-3,4) kıyasla pediatrik hastalarda (%80'e kadar) daha sık gözlenmektedir. Pediatrik hastalarda en sık görülen füzyon genlerinin RET/PTC1 ve RET/PTC3 radyasyona maruz kalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (50).

2.5.3. BRAF

7. kromozomda bulunan BRAF geni RAF serin-treonin kinaz ailesinin üyesi olan bir protein kodlar. BRAF normalde mitojen etkinleştirici protein kinaz (MAPK) yolağının bir efektörü olarak işlev görmektedir. Ras'ın bağlanması BRAF'ın ve hücre zarındaki MAPK sinyal yolağının elemanlarının fosforillenerek etkinleşmesine neden olmaktadır (51). En bilinen mutasyonu ekzon 15'te meydana gelen tek nükleotid değişimi (1799T/A)'dir. Bu mutasyon, 600. konumdaki valinin glutamik asite dönüşmesine neden olur (V600E) (52). V600E tiroid kanserinde görülen en yaygın mutasyon olmasına rağmen kodon 599 ve 601'de gerçekleşen mutasyonlar da bildirilmiştir (53,54). V600E mutasyonu PDTC'nin yaklaşık %10'unda ve ATC vakalarının üçte birinde görülmektedir (44).

2.5.4. BRAF Gen Füzyonu

BRAF hem mutasyonlar hem de gen füzyonları ile onkogenik özellik kazandığından RET ile benzerlik göstermektedir. A-kinaz çapa proteini 9 (AKAP9) geni ve BRAF arasında oluşan füzyon geninin PTC'de görev aldığı Clampi ve ark. tarafından bildirilmiştir (55). Böylece AKAP9'un N-ucunun, BRAF'ın C-ucunun füzyonu ile bir füzyon geni oluşmaktadır (55).

2.5.5. RAS

RAS ailesinin üyesi olan H-RAS, K-RAS ve N-RAS genlerindeki nokta mutasyonlar çeşitli kanserlerde yaygın olarak görülmektedir. Tümörlerin yaklaşık %30'unda bu genlerden birinde bir mutasyon gözlenmektedir (56). RAS mutasyonları PTC'ye göre FTC'de ve FTA'da daha yaygın görülmekle beraber ayrıca PDTC (%18-27) ve ATC (%20-60)'de de gözlenmektedir (44). RAS mutasyonlarını ekzon 1 ve 2'de gerçekleşen değişiklikler oluşturmaktadır. Bunlar; ekzon 1'de kodon 12/13'te veya ekzon 2'de kodon 61'de GTP bağlanma bölgelerinde işlev gören kodlanıcı bölgede oluşmaktadır. RAS geni mutasyona uğrayarak etkinleştiğinde genomik düzensizliğe apoptoza ve çoğalmaya neden olmaktadır (56).

2.5.6. PIK3CA

Hücre büyümesi, çoğalması ve sağkalımının düzenlenmesinde görev alan fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolağı tümör gelişiminde önemli bir role

sahiptir (57). Tiroid kanserinde FTC ve ATC'de PIK3CA mutasyonları ve ayrıca ATC'de kopya sayısı kazanımları gözlenmektedir (58-61). Wang ve ark. yapmış olduğu çalışmada PIK3CA kopya sayısı artış görülen örneklerde PIK3CA protein ifadesinin anlamlı düzeyde arttığı bildirilmiştir (60). PIK3CA, Ras tarafından etkinleştirilirken, tümör baskılayıcı PTEN, PI3K/Akt sinyal yolağını baskılayan bir fosfataz etkinliğine sahiptir. Hem PIK3CA hem de PTEN aracılığı ile PI3K/Akt/MAPK yolağı tiroid tümörijenezi ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu öne sürülmektedir (57).

2.5.7. p53

Tümör baskılayıcı TP53 geni, hücre döngüsü ve apoptozunu kontrol eden bir yazılım etmenidir ve p53 proteinini kodlamaktadır. TP53 mutasyonlarının %75'inden fazlası, proteinin işlevini ortadan kaldıran küçük nükleotid değişikliklerdir. Bu değişiklikler çoğunlukla DNA-bağlanma alanında (92-292 kalıntılarında) bulunmaktadır (62).

2.5.8. P27

CDK baskılayıcılarının (CDKI'ler) üyesi olan çekirdek yerleşimli bir proteini kodlayan p27 veya kinaz baskılayıcı protein 1 (KIP1) geni Park ve Lee'nin çalışmasına göre hücre döngüsünde G1 evresinden S evresine geçişi düzenler (63). Yapılan çalışmalarda tiroid tümörlerinde p27 düzeyleri normal tiroid dokularıyla karşılaştırılmış ve en düşük yoğunluğun PDTC'de olduğu saptanmıştır (64,65). Ayrıca; PTC'de p27'nin ifadesinin azalması lenf nodu metastazının bir belirteci olarak kabul edilmektedir (66).

2.5.9. PTEN

PTEN, tümör baskılayıcı görevini PI3K/Akt yolağına etki ederek gerçekleştiren çift işlevli bir lipid fosfatazdır (57,67). PTEN'deki somatik mutasyonlar, primer epitel kökenli tiroid tümörlerinde nadir olarak görülmektedir. Bununla birlikte FTA'ların ve tiroid karsinomların %10-20'sinde hemizigot delesyonlar olduğu gösterilmiştir (68). Tiroid kanserlerinde PTEN protein ifadesinde azalma ya da ifadesinin tamamen kaybolduğu bildirilmiştir (69,70). Alvarez-Nuñez ve ark. yaptığı çalışmada tiroid kanserlerinde PTEN geninde anormal promotor metillenmesi ile epigenetik olarak susturulduğu gösterilmiştir (69).

2.5.10. RASSF1A

3.kromozomun p21.3 bölgesinde bulunan (Ras ilişkili alan ailesi 1A) RASSF1A'nın birçok kanserde ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. RASSF1A apoptotik sinyallenme, mikrotübül stabilizasyonunda görev alan tümör baskılayıcı bir gendir (71). RASSF1A'nın heterozigotluk kaybı (LOH) ya da promotor metillenmesi sonucu etkinliğini kaybetmesinin yanında birçok kanserde mutasyona uğradığı da bildirilmiştir (72-74).

2.5.11. NTRK1 Füzyon Geni

PTC'deki bilinen gen füzyonları RET ile nörotrofik tirozin kinaz almaçı 1 (NTRK1)'in oluşturduğu füzyon gendir. 1q21-22 bölgesinde bulunan NTRK1 geni sinir büyüme faktörü almacı proteini kodlar. Özellikle radyasyonla ilişkili olan PTC'lerde NTRK1'in üç farklı gen füzyonu oluşturduğu bildirilmiştir (75). NTRK1 gen füzyonlarının görülme sıklığı %3-12 arasında olup RET/PTC'ye göre daha azdır (45,86,87).

2.5.12. PPARγ Gen Füzyonu

Füzyon onkogenlerin oluşmasına neden olan kromozomal translokasyonlar hem PTC'lerde hem de foliküler tiroid tümörlerinde görülmektedir. FTC'de tanımlanan ilk füzyon geni t (2;3) (q13; p25) translokasyonundan kaynaklanmaktadır. Kroll ve ark. kromozomun 2q13 bölgesinde bulunan eşleşmiş alan 8 (PAX8) ile 3p25 bölgesinde bulunan peroksizom proliferatör-etkinleştirici almaç γ (PPARγ) arasında füzyon olduğunu bildirmişlerdir (76). PAX8-PPARγ gen füzyonu, FTC'de tanımlanmış olmasına rağmen hastalarda görülme sıklığı değişmektedir (50). Foliküler tiroid tümörlerinde kromozomun 3p25 bölgesinde farklı translokasyonlar da bildirilmiştir (77,78). FTC'lerde RAS efektörü NORE1A (RASSF5A)'nın ifadesinin azalması PAX8-PPARγ ile ilişkilendirilmiştir ve RAS sinyal yolağı ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (78).

2.5.13. THADA Gen Füzyonu

FTA ile yapılan sitogenetik araştırmalar tiroid adenomu ile ilişkili (THADA) geni ile ilişkilendirilen 19q13 ve 2p21 kromozomal bölgelerindeki değişiklikleri ortaya çıkarmıştır. Sırasıyla t(2;20;3)(p21;q11.2;p25) ve t(2;7)(p21;p15) translokasyonlarını taşıyan iki FTA hücre hattının incelenmesiyle THADA tanımlanmıştır (79). FTA

hücrelerinde THADA, kromozom 3 ve 7'den gelen dizilerle kaynaşmıştır. Kromozomun 3p25 kırılma noktası PPARγ'nın konumu ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, olası ortak genlerin tanımlanmasında netlik kazanmamıştır (77). THADA proteinin işlevi büyük oranda bilinmemekle birlikte ölüm almaç yolağı ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (79).

2.5.14. Mitokondri DNA'sı

Mitokondri DNA'sı (mtDNA) çekirdek DNA'sına göre daha küçük olup mitokondri enerji üretiminde görev alan genleri kodlamaktadır. mtDNA'sının tiroid kanserindeki işlevi çekirdek DNA'sına kıyasla daha az araştırılmıştır. Fakat mevcut çalışmalar mtDNA'da da çeşitli delesyonlar ve/veya nokta mutasyonları bulunduğunu ortaya çıkartmıştır. Özellikle onkositik tiroid tümörleri yüksek mitokondri içerikleri ile tanımlanmaktadır (44).

2.5.15. miRNA'lar

miRNA'ların tiroid kanserleri gibi bir çok farklı kanser türünde onkogenler ve tümör baskılayıcı genler üzerinde düzenleyici işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir. He ve ark, normal tiroide kıyasla PTC'de miR-221, miR-222 ve miR-146'nın ifadesinin arttığını bildirmişlerdir(80). Pallante ve ark., miR-221 ve miR-222 ve miR-146'ya ek olarak miR-181b'nin tiroid kanseri oluşumunda görev aldığını ileri sürmüşlerdir. Aynı çalışmada miR-221, miR-222 ve miR-146 ifadelerinin artması KIT geni ifadesinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (81). Foliküler tiroid tümörlerinde miRNA profillendirme çalışmalar sonucunda FTA'lara ve normal tiroid dokularına kıyasla FTC'lerde miR-197 ve miR-346'nın ifadelerinin arttığı gözlemlenmiştir (82).

2.5.16. Gene-özgü Promotor Metillenmesi

RASS1A ve PTEN gibi bazı tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgesinde anormal metillenme yalnızca tiroid kanserinde değil, aynı zamanda adenomlarında da yaygın olarak gözlenmektedir. Örneğin; metaloproteinazın doku baskılayıcısı (TIMP3), sodyum çözünen simporter ailesini üyesi (SLC5A8) ve kalsiyum/kalmodüline bağımlı serin treonin kinaz (DAPK) genlerinin promotor metillenmesinin PTC ile ilişkili olduğu bildirmiştir (83). Hoque ve ark., tiroid tümörlerinde RASSF1A, DAPK ve TIMP3'ün dışında TSHR, RAR-β, CDH1 ve TGF-β genlerinde de aşırı metillenme olduğunu

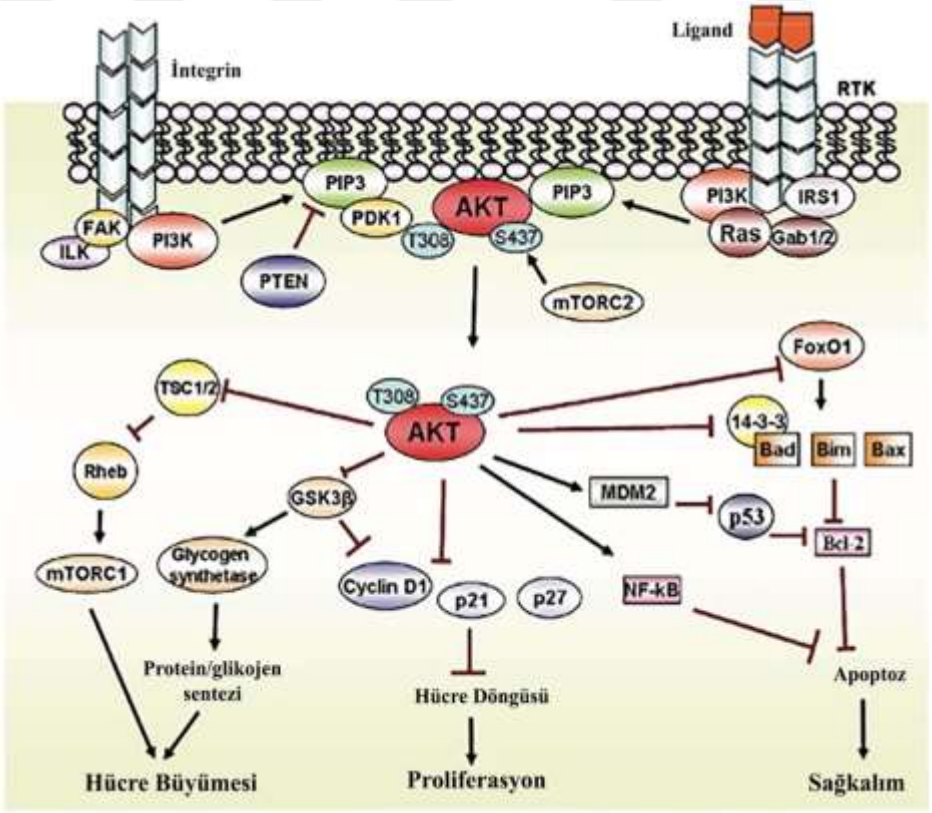
göstermişlerdir (84). TSHR-α ve TSHR-β'da aşırı promotor metillenmesi FTC'lerde, bazı PTC'lerde ve FTA'larda gözlenmektedir (85). Fibroblast büyüme faktörü 2 (FGFR2)' nin, neoplastik tiroid hücrelerinde DNA promotor metillenmesi nedeniyle ifadesinin azaldığı görülmüştür (86).

2.6. Tiroid Kanseri Sinyal Yolakları

Tiroid kanserinin gelişimi, ilerlemesi, invazyonu ve metastazı sinyal yolaklarının işlevleri ile yakından ilişkilidir. Sinyal yolaklarında gerçekleşen değişiklikler tiroid kanserinin teşhisinde ve prognozunun belirlenmesinde yardımcı olan biyobelirteçler olup potansiyel tedavi hedefi olarak görülmektedir (3).

2.6.1. PI3K/Akt Sinyal Yolağı

PI3K/Akt yolağı; metabolizma, büyüme, çoğalma, apoptoz ve göç gibi bir dizi hücresel süreci düzenlemektedir (Şekil 2-5) (87).



Şekil 2-5: PI3K/Akt Sinyal Yolağı (90).

Fosfatidilinozitol 3 kinazlar (PI3K)'lar, yapılarına ve substratlarına göre üç sınıfa ayrılmış hücre içi lipid kinazlardır ve sınıf I lipid kinazlar kanserde büyük oranda etki gösterir. Sınıf I PI3K'lar, reseptör tirozin kinazlar veya G-proteini kenetli reseptörler yoluyla fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PIP2), fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfata (PIP3) dönüştürmek için aktive edilir. (87,88).

PI3K'nın hedef molekülleri arasında serin/treonin kinaz Akt bulunmaktadır. Fosfatidilinositol 3-bağımlı kinaz 1 (PDK1) tarafından fosforillenerek aktive olan Akt'nin aşağı hücre sinyal yolağı efektörlerinden en önemlisi mTOR'dur (13). AKT, mTOR'u tüberoz skleroz 2 (TSC2)'nin doğrudan fosforilasyonu, AMPK'nın inhibisyonu veya tirozin kinaz reseptörlerinin aktivasyonu ve bunu izleyen PI3K/AKT fosforilasyonu ile de aktive olmaktadır (89).

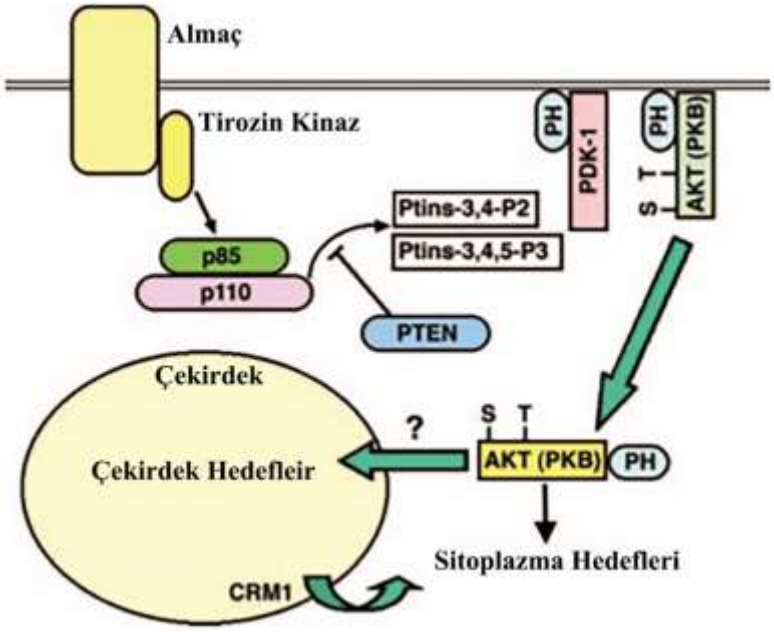
Etkinleşen Akt glikojen sentaz kinaz 3β (GSK-3β)'yı baskılayarak siklin D1'in yıkımını önler ve bu şekilde hücre döngüsünü düzenler (90-92).

PI3K/Akt yolağı, tümör baskılayıcı bir protein olan PTEN tarafından negatif olarak düzenlenmektedir (93). PTEN, PIP3'ün üzerindeki fosfatı uzaklaştıran bir protein fosfatazdır. PTEN'den yoksun hücrelerde PIP3 ve fosforillenmiş Akt düzeylerinin artmasıyla PI3K/Akt yolağı etkinleşmektedir. PTEN'in ayrıca, protein fosfataz etkinliğine bağlı olan hücre göçünü de durdurduğu ileri sürülmektedir (94).

2.6.1.1. Akt

PKB olarak da bilinen Akt, PI3K yolağında görev alan bir sinyal molekülüdür. Akt1, Akt2, Ak3 olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. Üç izoform da lipid bağlanmasında rol alan bir N-ucunda plekstrin homoloji (PH) alanına, bir kinaz alanına ve düzenleyici bir C-ucuna sahiptir (95). Şekil 2.6'da Akt'nin klasik etkinleşme yolu görülmektedir (96).

PTEN, Akt'nin sitozolik yerleşimini belirleyerek etkinliğini düzenleyen bir proteindir. Artan PI3K veya azalan PTEN ifadesi sonucunda Akt'nin etkinliği artmaktadır (96). Akt etkinleştikten sonra ısı şok proteini 90 (Hsp90) ve diğer şaperon proteinleri ile etkileşime girmektedir (97,98). Ringel ve ark'nın yaptığı çalışmada; normal tiroitte üç Akt izoformonun da ifade edildiğini ancak Akt1 ve Akt2'nin hem mRNA hem de protein düzeylerinde daha baskın olan izoformlar olduğu gösterilmektedir (99).



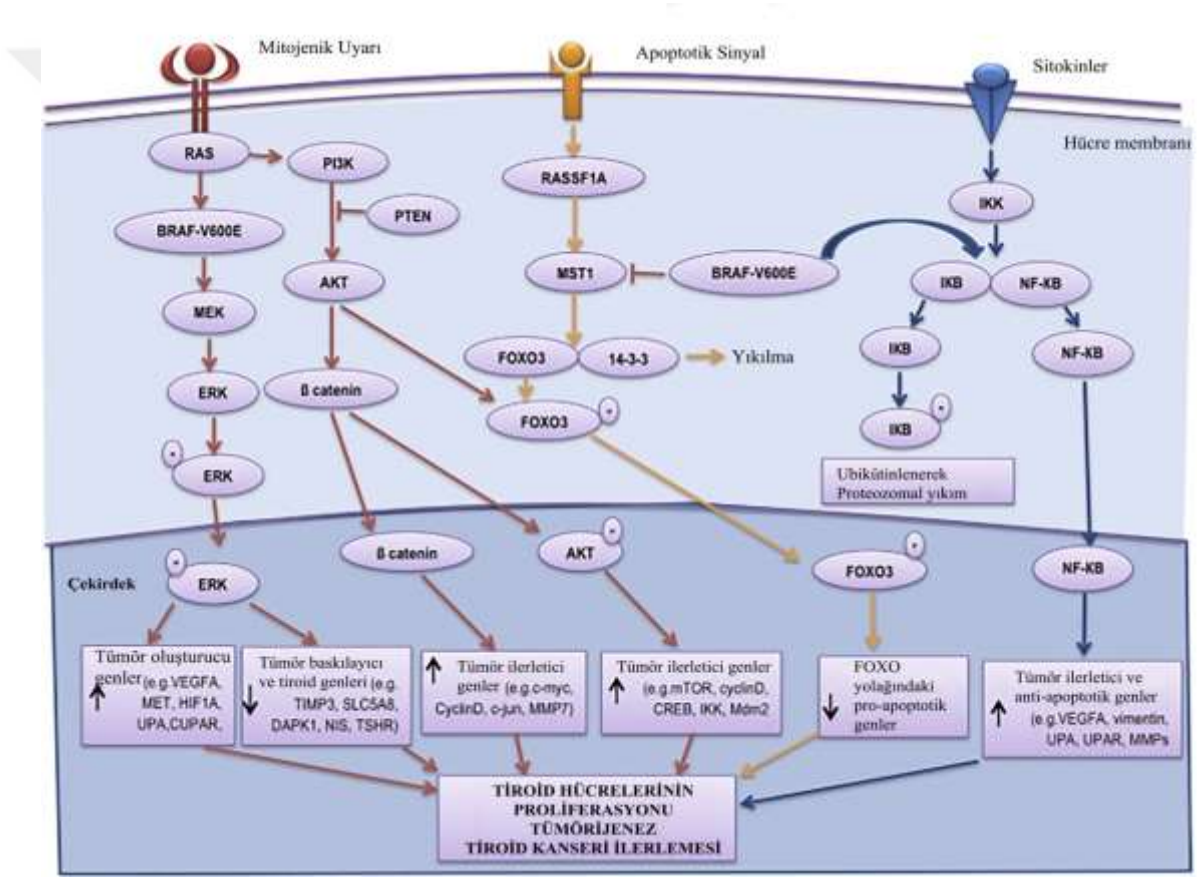
Şekil 2-6: Akt'nin Etkinleşmesi (99).

2.6.1.2. Tiroid Kanserinde PI3K/Akt Sinyal Yolağı

PI3K/Akt yolağının tiroid kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde etkinleştiği bildirilmiştir (Şekil 2-7) (100,101). PI3K/Akt yolağının tiroid tümör oluşumundaki rolü ilk olarak Cowden sendromunun FTA ve FTC ile ilişkili olduğu bulgusuyla ortaya çıkartılmıştır (102). Akt'nin ifade düzeyinin artması sonucunda PI3K/Akt yolağının etkinleşerek tiroid tümör oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir. FTC'ler, papiller karsinoma ve normal dokulara kıyasla daha yüksek düzeyde Akt etkinliğine sahiptir. Etkinleşmiş Akt, efektör moleküllerini fosforilleyerek sinyal iletisini uyarmaktadır. PI3K/Akt yolağının etkinliği ile hücre çoğalması uyarılırken apoptoz baskılanmaktadır. Akt1 ve Akt2'nin tiroid kanserinde en önemli genler olduğu gösterilmektedir (99). Bunun yanısıra PTEN'nin ifadesinin azalması ve RAS onkogenlerinin etkinleşmesi PI3K/Akt sinyal yolağının etkinleşmesi tiroid tümör oluşumunda da etkili olmaktadır (59,61,103). PI3K/Akt sinyal yolağındaki genetik değişikliklerin bazılarının BRAF mutasyonu ile eş zamanlı olarak görülmesi ATC'de daha agresif tiroid tümörlerine yol açmaktadır. Hem MAPK hem de PI3K/Akt yolaklarını

etkinleştiren genetik değişiklikler ATC vakalarının çoğunda (yaklaşık %81'inde) gözlenmektedir (61).

Mutant tiroid hormonu almacı β (TRβPV) geninin nakavt edildiği bir transgenik fare modelinde, PI3K/Akt yolağının, TRβPV'nin PI3K'nın p85α düzenleyici birimi ile etkileşiminin ardından etkinleştiği ve FTC'lerin kendiliğinden geliştiği gözlenmiştir (104,105). Vasko ve ark. yaptığı çalışmada FTC'de; Akt1'in etkinleşmesi ve çekirdeğe geçişi, PI3K/Akt yolağı tarafından uyarılan invazyonda ve metastazda rol oynadığı ileri sürülmektedir (106). Ayrıca bu durum, metastatik tiroid kanserlerinde Akt1 mutasyonlarının bulunmasıyla da desteklenmiştir (107).



Şekil 2-7: Tiroid kanserinde sinyal yolakları (111)

2.6.2. Wnt/β-katenin Sinyal Yolağı

Wnt'ler; hücre dışı almaçlara bağlanan, çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen bir dizi sinyal zincirini başlatan, evrim boyunca korunmuş büyüme faktörleri ailesidir. Wnt sinyali, çok hücreli farklılaşmış organizmaların gelişimi ve sürdürülmesi için önemlidir.

Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, Xenopus laevis ve farelerde yapılan çalışmalar Wnt sinyalinin; hücre büyümesini ve kaderini kontrol ederken ayrıca omurgalılarda asimetrik hücre bölünmesi, CNS modellemesi, segmentasyon ve eksen oluşumu gibi çeşitli gelişim süreçlerinde rol oynadığı bildirilmiştir (108-110). Wnt sinyal yolağı ayrıca, çeşitli sistemlerde kök hücre farklılaşması ve düzenlenmesi ile de ilişkilendirilmektedir (111). Wnt proteinleri, insanda 19 gen tarafından kodlanan, korunmuş, sistein açısından zengin bir glikoprotein ailesidir (112).

β-katenin, E-kaderin aracılı hücre adezyonunda önemli rol oynayan ve 3. kromozomun p22-21.3 bölgesindeki CTNNB1 geni tarafından kodlanan sitoplazmik bir proteindir. β-katenin, kaderinlerin sitoplazmik alanını bozulmadan korumaktadır. Wnt sinyal iletiminin temel bileşeni olan β-katenin Adheran bağlantılar, hücre gelişimini ve hücreler arası adhezyonu düzenleyerek epitel hücre tabakalarının oluşturulmasını ve devamlılığını sağlamaktadır (113-115). β-katenin/kaderin etkileşiminin bozulması, kanser gibi birçok hastalık durumlarını ortaya çıkarır (116,117).

β-katenin aynı zamanda siklin D1'i hedefleyen Wnt/β-katenin sinyal yolağının bir efektör molekülü olup embriyogenez sırasında hücre kaderinin ve farklılaşmasının düzenlenmesinde görev almaktadır. β-katenin normal tiroid foliküler hücrelerinde ifade edilir (118).

Wnt/β-katenin sinyal yolağı kanonik Wnt/β-katenin, Kanonik olmayan Wnt/Ca+2 ve Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) olmak üzere üç çeşite ayrılır (119).

2.6.2.1. Kanonik Olmayan Wnt/β-katenin Sinyal Yolağı

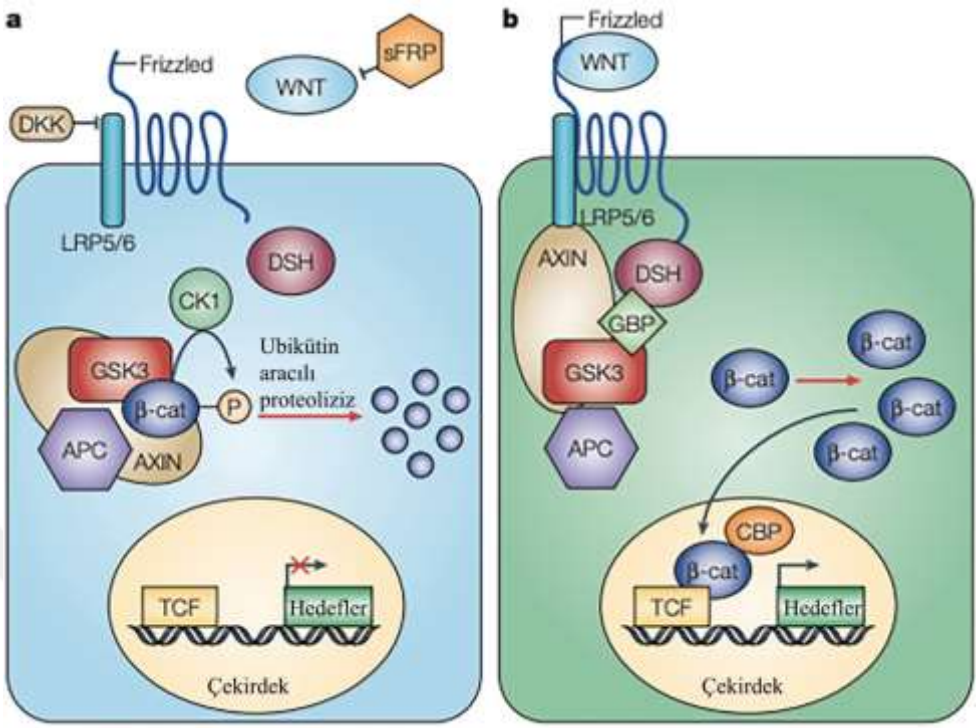
Bu yolakta Wnt4, Wnt11 ve Wnt5A gibi Wnt ailesi üyeleri görev almaktadır. Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) yolağı Fzd almaçı ile uyarılmaktadır ve küçük GTP-bağlayıcı proteinler Rho A, Rac ve bunların efektörleri Rho-kinaz ve JNK'yı etkinleştirmektedir. Kanonik olmayan bu yolak; doku polaritesi, hücre göçü ve hücre iskeletinin düzenlenmesi ile ilişkilidir (112).

Kanonik olmayan Wnt/Ca+2 yolak ise iki Fzd almaçı (Fzd 2 ve 7) veya Ror2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2) ile etkileşime girerek etkin hale geçebilen Ca^{+2} yolağıdır. Bu yolağın etkinleşmesi PKC'nin etkinleşerek hücre içi Ca^{+2} düzeyinin artmasına yol açmaktadır. Bu durum CaMKII ve kalsinörini (CaN) etkinleştirerek hücre göçünü ve çoğalmasını düzenlemektedir (120).

2.6.2.2. Kanonik Wnt/β-katenin Sinyal Yolağı

Kanonik yolakta: Wnt sinyal mekanizmasının başlatılabilmesinde gerekli olan Fz-Wnt-LRP5/6 yapısının birbirleriyle bağlantı kurabilmesi için Wnt ligandının Frizzled (Fz) almacına ve LRP5/6 proteinine bağlanması ile hücre içi sinyal iletisi başlar. Wnt'nin hücre dışı almaçlara bağlanması ile β-katenin sitoplazmada birikir. Sitoplazmada yoğunluğu artan çekirdekte düzeyi artan β-katenin T-hücre etmenleri (TCF'ler) ve lenfoid arttırıcı etmenler (LEF'ler) ile etkileşime girerek hedef genlerin yazılımını gerçekleştirir (Şekil 2-8) (121). Yazılımı etkilenen genlerin bazıları; C-MYC (122), BMP4 (123) ve siklin D1 (124) gibi onkogenlerdir (121).

Etkin olmayan durumda β-katenin; Axin, Adenomatöz Polipoz Koli (APC), Kazein Kinaz 1 α (CK1α) ve Glikojen Sentaz Kinaz 3 β (GSK3β) dahil olmak üzere birçok proteinle birlikte bir yıkım karmaşımı oluşturur (111,125,126). Bu karmaşım içinde β-katenin, CK1α ve GSK3β (126) tarafından ardışık olarak fosforillenir ve fosforillenen β-kateninin übikitin aracılığı ile proteozomal yıkımı gerçekleşir (127). Bu sırada da çekirdekteki TCF'ler ve LEF'ler yazılımsal baskılayıcılara bağlanır (Şekil 2-8) (128).



Şekil 2-8: Kanonikal Wnt/β-kateninin Sinyallenmesi. a) β-kateninin übikitinlenip proteozomal yıkımı ile hedef genlerin yazılımı bastırılmış durumdadır. b) Wnt sinyali etkin olduğunda çekirdeğe geçen β-katenin hedef genlerin yazılımını gerçekleştirir (121).

Wnt ligandının hücre dışı almaçlarına düşük yoğunluklu lipoprotein almacı ile ilişkili protein (LRP5/6) ve Frizzled bağlanması, Dishevelled proteinlerini etkinleştirir ve axin'in LRP almacının sitoplazmik alanına bağlanmasına neden olur. (129,130). Bu durum, yıkım kompleksinin bozulmasına yol açarak β-katenin'in fosforillenmesini önler ve çekirdeğe geçişi sağlanır. Böylece Wnt hedef genlerinin TCF'ye bağlı yazılımını gerçekleştirir (131).

C-MYC ve siklin D1 Wnt/ β-kateninin hedef molekülleridir (132,133). C-MYC; hücre çoğalmasında, hücre metabolizmasında, protein sentezinde, hücre iskeletinin düzenlenmesininde ve apoptozda görev alan bir yazılım etmenidir (134-137).

C-MYC etkinliğinin düzenlenmesi insan kanserlerinde bildirilen en yaygın değişikliklerden biridir (138). Yakın dönemde yapılan çalışmalar, C-MYC'in hem normal hem de kanser hücrelerinde uzun kodlanmayan RNA'ların ifadesini düzenlediğini

göstermektedir. Bu da C-MYC'in hem normal hem de kanserli dokunun çoğalması üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir (139,140).

CCND1, hücre döngüsünün G0/G1'den S evresine ilerlemesi için gerekli bir çekirdek protein olan siklin D1'i kodlamaktadır (124,141,142). Siklin D1, siklin bağımlı kinaz-4 ve -6'nın (CDK4 ve CDK6) düzenleyici bir alt birimi olarak işlev görmektedir. Siklin D1 bağlandığında, CDK-4 ve CDK -6 fosforillenir ve hücre döngüsü baskılayıcısı olan retinoblastoma proteini (pRB)'nin etkinliğini ortadan kaldırarak hücre döngüsünün ilerlemesini sağlar (143). Siklin D1, G1 evresi sırasında hızlı bir şekilde sentezlenir ve S evresinde bozunarak etkinliği ortadan kalkar (141).

2.6.2.3. Tiroid Kanserinde Wnt/β-katenin Sinyal Yolağı

Wnt/ β-katenin sinyal yolağının anormal şekilde etkinleşmesi, epitel kökenli tümörlerin gelişmesine yol açmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda tiroid kanserinin oluşumunda Wnt/β-katenin yolağının da görev aldığı gösterilmiştir. Tiroid tümörlerinde en sık mutasyon scaffold proteinleri APC, Axin ve β-katenini kodlayan genlerde gözlenmektedir (Şekil 2-7) (144).

PDTC ve ATC'ler, WDTC'lerde bulunmayan genetik değişiklikler göstermektedir. Bu değişiklikler, tümör farklılaşmasının oluşumunda rol oynamaktadır (145,146). β-kateninin 3.ekzonunda meydana gelen nokta mutasyonları ATC vakalarının %66'sında PDTC vakalarının ise %25'inde gözlenmektedir (147,148).

Wnt/β-katenin sinyal ileti yolunun aşırı etkinleşmesi anormal etkinliği, genellikle tiroid kanserlerinde PI3K/Akt yolağının etkinliğinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (112,149). Bu durum, doğrudan fosforillenen ve dolayısıyla Akt tarafından etkinliği ortadan kaldıran GSK3β ile gerçekleşmektedir (150).

2.7. Kanserde Yazılım Etmenleri

Onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin büyük bir kısmı genlerin ifade şeklini ve sinyal yolaklarını kontrol eden yazılım etmenlerini kodlar (151). Yazılım etmeninin anormal etkinliği; gen ifadelerindeki değişikliklere, protein kararlılığını, protein-protein etkileşimleri ve çevirim sonrası değişikliklere neden olur (152). Böylece kanser hücresinin hayatta kalmasına, tümör anjiyogenezi ve dolayısıyla metastazına neden olan çeşitli genlerin anormal etkinliği ile sonuçlanır (151,152).

Tümör oluşumu ve kanserde rol oynayan önemli bir yazılım etmeni grubu Sox ailesidir. Yüksek oranda korunmuş bir mobilite grubu (HMG) alanı ile DNA bağlanmasına aracılık eden bir dizi yazılımsal düzenleyici içerir (153).

2.7.1. Sox Ailesi

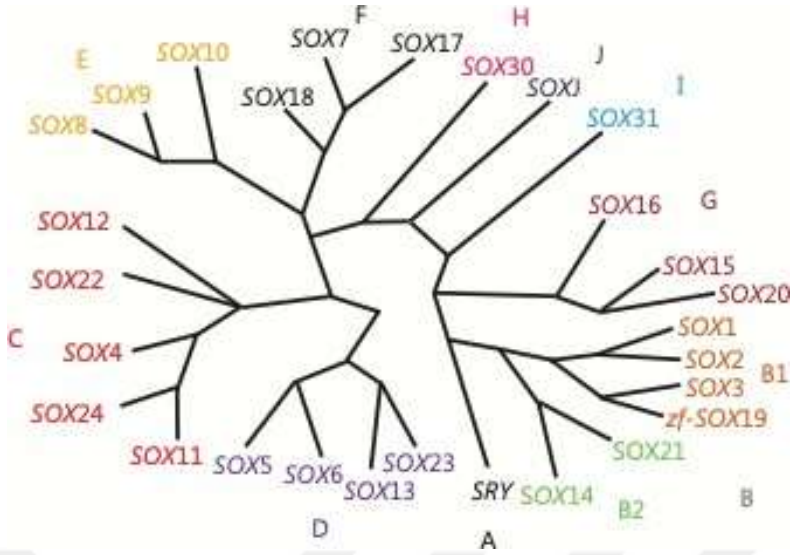
SOX genleri ve proteinleri, iki alt aileden oluşan HMG süper ailesine aittir: SOX ailesi ve T-hücre faktörü (TCF)/lenfoid güçlendirici bağlanma faktörü (LEDF-1) ailesi (154-157). Erkek cinsiyet belirleme geni Sry (cinsiyet belirleyici bölge Y), SOX gen ailesinin ilk tanımlanan üyesidir. Sry, histon olmayan kromozomal proteinler HMG-1 ve HMG-2'nin DNA bağlanma alanına benzer bir alan içerir (158,159).

Sox ailesi tümör oluşumunda yazılım etmeni olarak da görev almaktadır. Korunmuş bir yüksek mobilite grup (HMG) alanı ile DNA'ya bağlanarak yazılımsal düzenleyici olarak işlev görmektedir. SOX yazılım etmenleri, kanserde hücre kaderini ve farklılaşmayı kontrol etmektedir. Ayrıca birçok SOX ailesi üyesi ilerleme ve metastazda rol oynamaktadır (4).

HMG kutusu 70-80 amino asit uzunluğunda birkaç pozisyonda bulunabilen korunmuş bir alan içermektedir (155). HMG alanı içeren proteinler SRY kutusu olarak da bilinen Sox ailesinde gruplandırılmıştır. Sox protein ailesi de adını buradan almaktadır (Şekil 2-9) (160,161).

Sox proteinleri özgün DNA dizisine bağlanmaktadır. HMG kutu proteinleri arasında belirli DNA dizisini tanınması Sox proteinlerine özgüdür. Sox proteinleri için uzlaşı dizisi 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-'3'dür (162).

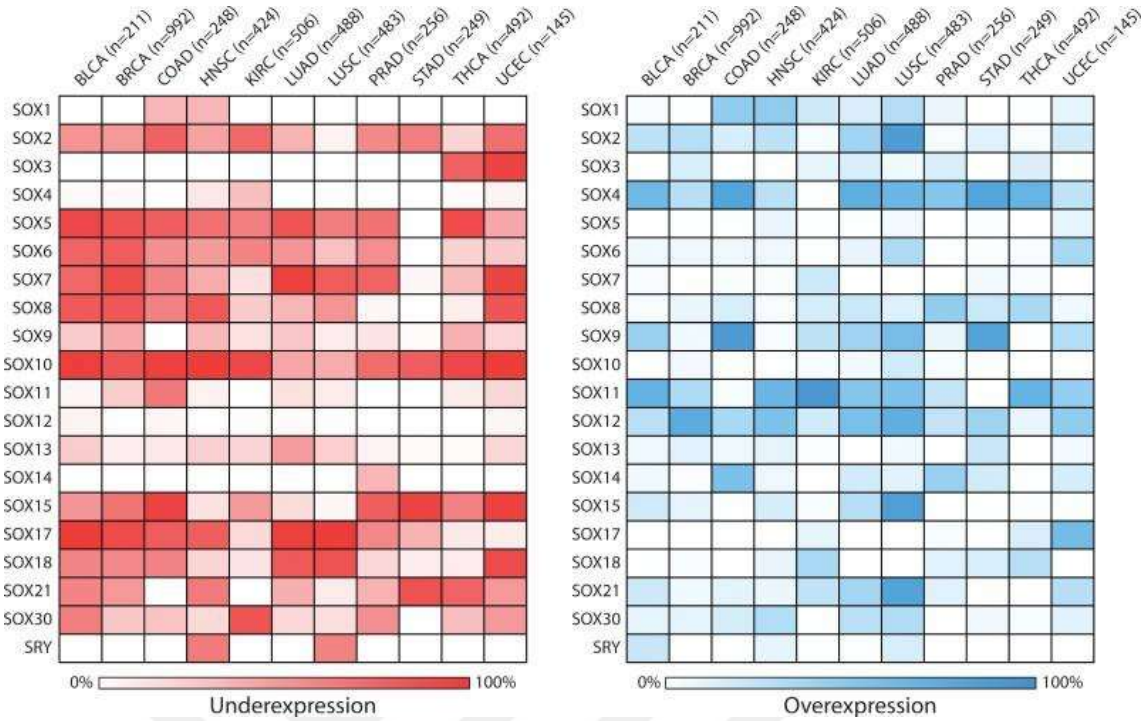
Günümüzde memeli genomlarının HMG alanı amino asit dizisinin homolojisine göre 10 alt gruba ayrılan (A-J) 30 farklı SOX geni bulunmuştur (163).



Şekil 2-9: SOX ailesinin sınıflandırılması (163).

2.7.2. SOX Ailesinin Tümörijenezde Onkogenik Ve Tümör Baskılayıcı Rolleri

SOX ailesi üyeleri; onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak işlev görebilir ve DNA kopya sayısı değişiklikleri, DNA metillenmesi ve miRNA'ların etkisi gibi çeşitli genetik ve epigenetik mekanizmalar ile etkinleşebilir veya ifadeleri azalabilir. The Cancer Genom Atlas'ta bulunan 11 kanser türüne ait erişime açık RNA-dizileme verileri kullanılarak oluşturulan SOX ailesi üyelerinin gen ifadelerinin analizi SOX genlerinin birçok kanser türünde değiştiğini göstermektedir (Şekil 2-10) (164).



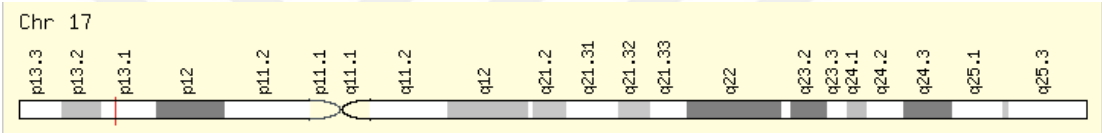
Şekil 2-10: SOX ailesinin gen ifade düzeylerinin pan-kanser analizi (164).

Örneğin; skuamöz özafagus, küçük hücreli olmayan ve küçük hücreli akciğer kanserlerinde SOX2 bir onkogen görevi görür ve DNA amplifikasyonu ile etkinleşir. SOX2 hücre çoğalmasında, büyümesinde ve hücre farklılaşmasında görev alır (165,166). SOX9; kolorektal, glioma ve pankreas kanserli dahil olmak üzere birçok kanser türünde aşırı ifade edilen onkogenik SOX proteinlerinden biridir (164). Buna karşılık SOX7; DNA delesyonu ve metilasyonu ile baskılanarak prostat, kolon, akciğer ve meme kanserlerinde tümör baskılayıcı gen olarak işlev gösterir (167,168). SOX4'ün ise lösemi, kolorektal, akciğer ve meme kanserlerinde ifadesinin arttığı, mesane ve hepatoselüler karsinoma da ise ifadesinin azaldığı gözlenir ve doku tipine göre onkogen veya tümör baskılayıcı olarak görev yapar. SOX4'ün ifadesindeki bu değişiklikler DNA kopya kazanımları, DNA metillenmesi miRNA'lar ile çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler ile gözlenir (157). SOX4, apoptozun baskılanması, metastazın tetiklenmesi ve kanser başlatıcı hücrelerin korunması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar aracılığıyla onkogenik işlev gösterir (169,170).

2.7.3. SOX15 Geni Ve Proteini

Memelilerde SOX15 (Cinsiyet belirleyici bölge Y-kutusu 15 geni), SOX G alt grubunun tek üyesidir. SOX yazılım faktörleri ailesinin bir üyesi olan SOX15, DNA bağlanmasını kolaylaştıran yüksek mobilite grup alanına sahiptir (5).

SOX15 geni embriyonik gelişimin düzenlenmesinde ve hücre kaderinin belirlenmesinde rol alır. İnsan SOX15 geni, SOX gen ailesinin 3' ucunda HMG kutusunu kesintiye uğratmayan bir introna sahip olan ilk üyesidir Protein, diğer proteinlerle birlikte karmaşım oluşturduktan sonra yazılım düzenleyici olarak işlev görür. SOX15 geni, 17. kromozomun p13.1 bölgesinde 7,588,178-7,590,094 bazları arasında ters zincir üzerinde bulunmaktadır (Şekil 2-11) (171).



Şekil 2-11: SOX15 geninin kromozom üzerindeki yeri (51).

SOX15 geni; SOX15-201, SOX15-202, SOX15-203, olmak üzere üç farklı mRNA kodlamaktadır (Şekil 2-12). SOX15-201 mRNA'sı 2 ekzondan, SOX15-202 mRNA'sı 3 ekzondan oluşur ve uzunluğu sırasıyla 1320 ve 1050 baz çiftidir. Buna karşılık SOX15-203 transkripti ise 1 ekzondan oluşur ve uzunluğu 1093 baz çiftidir (Ensembl GRCh38.p13) (172).

Show/hide columns (1 hidden) Filter

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt Match	RefSeq Match	Flags
SOX15-201	ENST00000250055.3	1320	233aa	Protein coding	CCDS32549	O60248-1	NM_006942.2	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P2 MANE Select v0.92
SOX15-202	ENST00000538513.6	1050	233aa	Protein coding	CCDS32549	O60248-1	-	TSL:1 GENCODE basic APPRIS P2
SOX15-203	ENST00000570788.1	1093	178aa	Protein coding	-	O60248-2	-	TSL:NA GENCODE basic APPRIS ALT2

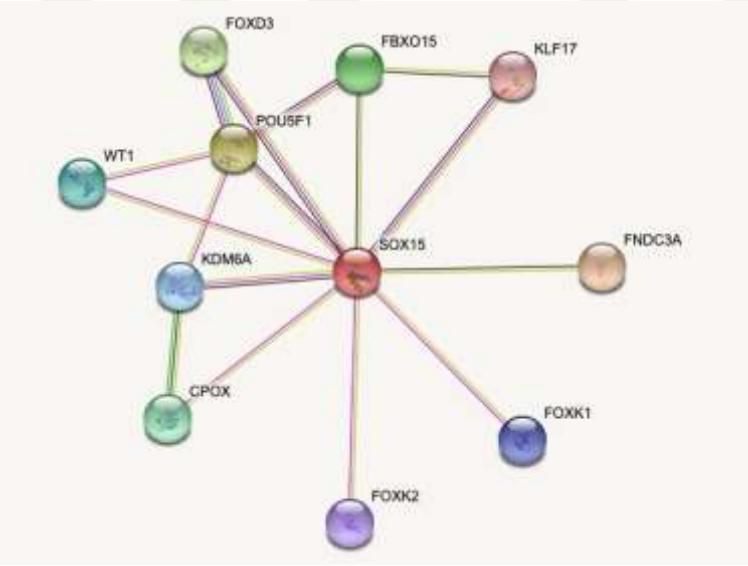
Şekil 2-12: SOX15 geninin transkriptleri.

SOX15 proteini, insanlarda *SOX15* geni tarafından kodlanan bir protein olup diğer proteinlerle birlikte karmaşım oluşturduktan sonra yazılım düzenleyici olarak işlev görür. *SOX15* geni tarafından kodlanan protein özellikle prolin (%13,7), serin (%11,1), alanin (%10,3) ve glisin (%9,4) açısından zengindir. Proteinin N-uc alanı senin açısından

zengindir ve protein işlevinin düzenlenmesinde rol alan kazein kinaz ve protein kinaz C fosforillenme bölgeleri içermektedir (173).

SOX15'in iki izoformu bulunmaktadır. Birinci izoformu 233 amino asiten oluşur, ağırlığı 25,251 Da'dır. İkinci izoformu 178 amino asiten oluşur, 19,393 Da ağırlığındadır (174).

SOX15 proteini, 5'-AACAATG-3' uzlaşı dizisi aracılığı ile DNA'ya bağlanan yazılım etmenidir. Yazılımsal etkinleştirici ve baskılayıcı olarak görev yapar. POU5F1 (OCT3/4) ile gen promotörlerine sinerjistik olarak bağlanır, FHL3'ü ile de karmaşım oluşturarak FOXK1 promotörüne ve FOXK1'in yazılımsal etkinliğini uyarır. Bu durum da miyoblast proliferasyonuna yol açar. HAND1'in yazılımsal etkinliğini arttırarak kasa özgü MYOD ve MYOG genlerinin ifadelerinin azalmasına neden olur ve miyoblast farklılaşmasının bir baskılayıcısı olarak görev yapar, trofoblast dev hücre farklılaşmasında yer alır. HRC'nin promoter bölgesine bağlanarak yazılımını düzenler. İskelet kası yenilenmesinde görev alır. Ayrıca miyojenik öncü hücrelerin gelişiminde rol oynar (Şekil 2-13) (174).



Şekil 2-13: SOX15 proteininin etkileşimde olduğu proteinler (175).

2.7.4. *SOX15*'in Gelişim Ve Kanser Biyolojisindeki Rolü

Özellikle plasentadaki trofoblastik hücrelerde ifade edilen *SOX15* plasental gelişim ve kas yenilenmesinden sorumludur (176). *SOX15*'in 300bç'lik bir bölgesi

sırasıyla plasentaya, miyoblasta ve ortak bazal genlere özgü olmak üzere bu genlerin ifadelerini kontrol eden üç farklı cis-elementi içermektedir. Memelilerde korunmuş olan bu düzenleyici promotor dizileri (177) *SOX15*'in dokuya özgü gen ifadesini düzenleme, hücre farklılaşması, cinsiyet belirleme ve organogenez gibi birçok farklı görevden sorumludur.

Daha yeni çalışmalarda, *SOX15* geninin indüklenmiş pluripotent ve embriyonik kök hücrelerde ve mezodermal progenitör hücrelerde fazla ifade edilmesi nedeniyle potansiyel bir pluripotens olduğu ileri sürülmüştür (178,179).

Ayrıca *SOX15*, pankreas hücrelerinde tümör baskılanması ile ilgili güçlü bir düzenleyici olarak da tanımlanmıştır (180). Bu bulgular *SOX15*'in gelişim ve karsinogenezde etkili olduğunu göstermektedir (177). *SOX15*'in aşırı ifadesinin, testiküler embriyonal hücre karsinomundan türetilen NT2/D1 hücrelerinde hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca *SOX15*'in, CRC hücrelerinde Wnt/β-katenin yolağını bozma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (177).

Son çalışmalar, *SOX15*'in çeşitli kanser türlerinde tümör baskılayıcı olarak hareket edebileceğini göstermektedir. *SOX15*'in moleküler etki mekanizması henüz tam olarak belirlenmemiş olsa da *SOX15*, β-katenin-T-hücre faktörü/lenfosit geliştirme faktörü (TCF/LEF) karmaşımı ile etkileşime girer ve CD44, C-MYC ve Axin2 dahil olmak üzere Wingless (Wnt) hedef genlerinin etkinleşmesini engeller. Wnt/β-katenin sinyal ileti yolunun yumurtalık, meme ve kolon kanserleri dahil olmak üzere birçok insan kanserinin oluşumunda ve gelişiminde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir.

SOX15 geninin tiroid kanserinde etki mekanizmasını belirlemek için kanserle ilişkili hücresel mekanizmaları düzenleyen iki önemli yolak olan Wnt/β-katenin ve PI3K/AKT ile etkileşimi araştırmak için bu çalışma tasarlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Materyal

Tez çalışmasında yer alan hücre soylarının (MDA-T32 tiroid kanseri hücre hattı, Nthy-ori 3-1 tiroid normal hücre hattı) büyütülmesi, pasajlanması İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi. Uygulamaya alınan hücrelerin diğer deneysel aşamaları İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Toplanan hücrelerin, hücresel materyallerin kısa süreli saklanması -80°C'de, uzun zamanlı saklanması sıvı azot tankı içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

ß-Merkaptoetanol (Applichem-ABD)

Bisakrilamid (Sigma-Almanya)

Bovin Serum Albumin (Santa Cruz-ABD)

Bromofenol Mavisi (Sigma-Almanya)

Coomassie Brillant Blue (Sigma-Almanya)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Thermo Fisher Scientic, Almanya)

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Thermo Fisher Scientific-Almanya)

Etanol Absolut (Merck-Almanya)

Fosfat Tamponlu Salin (FBS) (Thermo Fisher Scientific-Almanya)

Gliserol (Sigma-Almanya)

Glisin (Santa Cruz-ABD)

Hidroklorik Asit (Merck-Almanya)

Hidrokortizon (Sigma-Almanya)

İsopropanol (Merck-Almanya)

PBS (Santa Cruz-ABD)

Penisilin-Streptomisin (Thermo Fisher Scientific)

Potasyum Klorur (Santa Cruz-ABD)

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma-Almanya)

TEMED (Applichem-ABD)

Tripan Mavisi (Thermo Fisher Scientific, Almanya)

Tris Bazı (Santa Cruz-ABD)

Tween20 (Thermo Fisher Scientific, Almanya)

Yağsız Süttozu (Santa Cruz-ABD)

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Thermo Fisher Scientific-Almanya)

MES SDS yürütme tamponu (Novex,ABD)

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen deneysel işlemlerde kullanılan cihazlar aşağıda listelenmiştir.

-20°C Derin Dondurucu (Beko/Türkiye)

-80°C Derin Donducuru (Sanyo/Japonya)

Distile Su Cihazı (Nüve/TÜRKİYE)

Hassas Terazi (Shimadzu/JAPONYA)

Soğutmalı Santrifüj (Hettich/ALMANYA)

Vorteks (Velp Scientifica/ABD)

Etüv (Hybaid/İNGİLTERE)

Otoklav (Hirayama/JAPONYA)

Otomatik Pipetler (Gilson/ABD)

Nanodrop Spektrofotometre (Thermofisher Scientific/ABD)

LightCycler 480-II Gerçek Zamanlı PZR Cihazı (Roche/İSVİÇRE)

Blotlama cihazı iBlot2 (Thermofisher Scientific/ABD)

Xcell SureLock (Thermofisher Scientific/ABD)

PowerEase500 (Thermofisher Scientific/ABD)

Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı (Micro Chemi 4.2- DNR Bio-Imaging System) (Thermo Fisher Scientific, Almanya)

Azot Tankı (Thermo Fisher Scientific, Almanya)

Çalkalayıcı (Janke&Kunkel)

Dikey Elektroforez Sistemi (Thermo Fisher Scientific, Almanya)

Gerçek Zamanlı Termal Döngü Cihazı (Roche)

Işık Mikroskobu ((Olympus, Almanya)

pH Metre (Mettler Toledo)

Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica)

CO_2'li İnkübator (HeraCell, Almanya)

Laminar Akış Kabini Sınıf II (ESCO, Almanya)

Rocker-300 Vakum Pompası (Rocker, Tayvan)

3.1.4. Çalışmalarda Kullanılan Besiyeri ve Tamponların Hazırlanması

3.1.4.1. MDA-T32 ve Nthy-ori 3-1 Hücre Hatları için Besiyeri

RPMI 1640: 500 ml RPMİ 1640 büyüme besiyerinin hazırlanması için 450 ml besiyerine 50 ml (10X) FBS (Fetal Sığır Serumu), 5ml penisilin-streptomisin ve 5 ml NEAA ilave edildi. Büyüme besiyeri hazırlandıktan sonra 0,22 um çaplı vakumlu filtreden geçirildi, +4°C saklanıldı.

1X Antibiyotiksiz Kültür Ortamı: 1X antibiyotiksiz besiyerin hazırlanması için 50 ml santrifüj tüpüne 45 ml RPMI 1640, 5ml FBS, 500µl NEAA (Esansiyel Olmayan Amino Asitler) ilave edildi. Büyüme besiyeri hazırlandıktan sonra 0,22 µm çaplı filtreden geçirildi, +4°C saklanıldı.

2X Antibiyotikli Kültür Ortamı: 2X antibiyotikli besiyerin hazırlanması için 50 ml santrifüj tüpüne 45 ml RPMİ 1640, 5ml FBS, 500µl penisilin-streptomisin, 500µl

NEAA ilave edildi. Büyüme besiyeri hazırlandıktan sonra 0,22 µm çaplı filtreden geçirildi, +4°C saklanıldı.

3.1.4.2. Western Blot Çözeltileri

Bloklama Çözeltisi: 0,5 gr %5'lik süt tozu 10 ml 1X PBS içerisinde çözdürülerek hazırlandı.
Yıkama Çözeltisi: 1X PBS'ten 50 ml + %1 Tween 20'den 500 µl alınarak distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.
Yürütme Çözeltisi: 20X MES'ten 25 ml alınarak 500 ml'ye distile su ile tamamlandı.
Yükleme Çözeltisi: 1M Tris + Gliserin + %10 SDS + %0,1 Bromofenol Mavisi+ Beta Merkaptoetanol ve distile su ile 2 ml'ye tamamlandı.

3.1.4.3. MTT Çözeltisi

2 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisinde MTT tuzu 5 mg/ml PBS ile hazırlanarak vortekslendi. 0,22 µl'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Hazırlanan MTT çözeltisi ışıktan korunması amacıyla alüminyum folyoya sarılarak daha sonra kullanılmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı.

3.1.5. Kullanılan Antikorlar ve Protein Standartları

pAkt1- Fare monoklonal antikor (Santa Cruz)

Akt1- Fare monoklonal antikor (Santa Cruz)

Beta aktin-Fare monoklonal antikor (Santa Cruz)

Cyclin D1- Tavşan monoklonal antikor (İnvitrogen)

C- myc- Fare monoklonal antikor (İnvitrogen)

Sox15- Tavşan monoklonal antikor (abcam)

Keçi anti-tavşan ikincil antikor (ABCAM)

Keçi anti-fare ikincil antikor (Santa Cruz)

MagicMark™ XP Western Protein Standart – Novex (Thermo Fisher Scientific)

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standart- Novex (Thermo Fisher Scientific)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, deneysel çalışmalara olanak sağlayan, hızlı sonuç alınabilen yapay bir çevrede hücrelerin yaşaması ve çoğalmasının sağlanmasıdır. Hücre bakımı, pasajlama, çoğaltma, dondurma ve çözdürme işlemleri hücre kültürü çalışmalarının aşamalarıdır. Hücreler kendilerine özgü temel besin maddelerini içeren ortamlar içerisinde çoğaltılır ve pasajlanır. Hücre kültürü çalışmamızda tiroid kanseri hücre hattı olan MDA-T32, normal tiroid hücre hattı olan Nthy-ori 3-1 hücre hatları kullanıldı. Bu çalışma için %95 nem, 37°C ve %5 CO_2'li ortam içeren inkübatör hücrelerin çoğalmaları ve yaşamlarını devam ettirebilmeleri için oluşturulmuş yapay bir çevredir.

3.2.1.1. Stok Hücre Hatlarının Çözdürülmesi:

Her çalışmaya başlamadan önce laminar akış kabinin UV ışığı açılarak kabin sterilize edildi. Kabin ve kullanılacak pipetler önce %1'lik çamaşır suyu ve ardından %70'lik etanol ile temizlendi. Sıvı azot tankında (-196°C) dondurulmuş halde kriyotüplerde bulunan MDA-T32, Nthy-ori 3-1 hücreleri sıvı azottan alınarak bekletmeksizin 37°C'deki su banyosunda çözdürüldü.

- Bir gün önceden ekim yapılacak flasklara kaplama (1ml besiyeri+100 µl kollajen+0,4 µl BSA) yapıldı ve inkübatöre bırakıldı.
- Kriyotüpün dış yüzeyi %70'lik etanol ile iyice temizlenerek laminar hava akışlı kabine alındı.
- Çözünen hücreler içerisinde 6ml büyüme besiyeri olan santrifüj tüpüne alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonucunda süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 1 ml büyüme besiyeri (%10 FBS'li RPMİ 1640) eklenerek hafifçe pipetaj yapıldı.
- Kaplama yapılan flasklar inkübatörden çıkarılarak içerisindeki kaplama karışımı boşaltıldı ve 9 ml büyüme besiyeri eklendi.
- Daha sonra hücreler 9 ml büyüme besiyeri eklenen flasklara aktarıldı. 37°C ve %5 CO2 içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

- Ekimden sonra hücrelerin flask yüzeyine tutunması mikroskopla kontrol edildi ve tutunup büyüyen hücrelerin besiyeri değiştirildi. Hücrelerin yoğunluğu %70-80'e ulaştığında hücrelerin sayılarak pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.2.1.2. Besiyeri Değişimi

- Büyüme besiyeri 37°C'de ısıtıldı.
- Ekim yapılmış flasktaki kullanılmış besiyeri uzaklaştırıldı.
- 10 ml yeni büyüme besiyeri eklenerek 37°C, %5 CO_2 içeren inkübatöre konuldu.

3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması:

- Yoğunluğu %70-80'e ulaşan flasktaki hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirildi.
- Flasktaki kullanılmış besiyeri hücrelerin bulunmadığı yüzey üzerinden dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Besiyeri kalıntılarının yıkanması için flaska Ca^{+2}, Mg^{+2} içermeyen PBS eklendi (3 ml/25 cm^2) ve hücreler üzerinde dikkatlice 2-3 kez dolaştırıldıktan sonra boşaltıldı.
- Flaska hücre bulunmayan yüzeyden tripsin+EDTA çözeltisi eklendi (3 ml/25 cm^2) ve hücrelerin yüzeyden kalkmasına göre yaklaşık 3-5 dakika 37°C inkübatörde bekletildi.
- Flasktaki tripsinin etkinliğini kaldırmak için eklenen tripsinin miktarı kadar (1:1 oranında) büyüme besiyeri eklenerek yıkama yapıldı ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı.
- Hücrelerin 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmesi sağlandı.
- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılırken, pellet üzerine uygun miktarda büyüme besiyeri eklenerek (1 ml/25 cm^2) homojenize edildi ve flasklara dağıtılarak inkubasyona bırakıldı.

3.2.1.4. Hücre Stoklarının Oluşturulması (Hücrelerin Dondurulması):

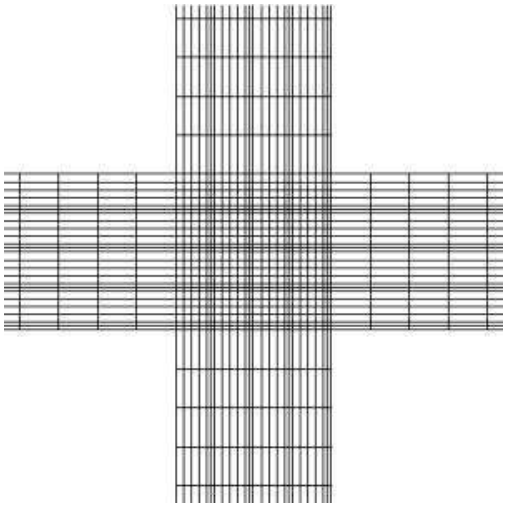
MDA-T32, Nthy-ori 3-1 sırasıyla insan tiroid kanseri ve normal hücre hatlarının bir kısmı deneylerde kullanılmak üzere pasajlanarak çoğaltılırken bir kısmı da başka çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu.

- PBS ile yıkama işleminden sonra tripsin/EDTA uygulanarak hücrelerin flasktan kaldırılması sağlandı.
- Kaldırılan hücrelerin santrifüj edilmesi ile elde edilen hücre pelleti 10^6/ml hücre olacak şekilde sayıldı ve %95 büyüme besiyeri ve %5 DMSO içeren kriyotüpler içerisinde çözdürüldü.
- Son olarak kriyotüpler +4°C'de 30 dakika, -20°C'de 1 saat ve -80°C'de gece boyu bekletildi. Ertesi gün -196°C sıvı azot tankına geçirilerek dondurulma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.1.5. Hücre Sayımı

- Yukarıda belirtildiği gibi flasktan kaldırılan yeterli sayıya ulaşan hücreler büyüme besiyerinde çözündürüldü.
- Süspanse edilmiş hücrelerden 10 µL alınarak 10 µl tripan mavisi çözeltisi ile karıştırıldı
- Boyanmış hücre süspensiyonu %70 alkol ile temizlenen Thoma lamının iki tarafına lamın kenarı boyunca yüklendi.
- Inverted mikroskobu kullanılarak Thoma lamının ortasında bulunan 16 büyük kare içindeki hücrelerin sayımı gerçekleştirildi ve 1 milimetrede bulunan hücre sayısı aşağıda belirtildiği gibi hesaplandı (Şekil 3-1).

$$1\text{ml'de hücre sayısı} = \frac{\text{Hücre sayısı} \times 10^4 \times 1000}{2}$$



Şekil 3-1: Thoma lamı üzerinde hücre sayımı için kullanılan alanların şematik gösterimi.

3.2.2. SOX15 Geninin Tiroid Hücre Hattında siRNA İle Susturulması

3.2.2.1. siRNA'ların Hazırlanması

Proje kapsamında Stealth RNAi siRNA (Thermo Fisher Scientific, Kat.No:) kullanıldı. Liyofilize halde gelen siRNA'lar üreticinin talimatlarına göre deiyonize su ile sulandırıldı. siRNA'lar 100 µM olacak şekilde -20°C derecede muhafaza edildi.

3.2.2.2. Hücrelere siRNA'ların Transfeksiyonu

Çalışmamız üç tekrarlı yapıldı. Hücreler (Nthy-ori 3-1 insan tiroid normal hücre hattı, MDAT32- kanser hücre hattı) öncelikle, kültürden sonra RNA ve protein izolasyonu için, 1x antibiyotiksiz besiyerde $13x10^4$ hücre olacak şekilde ekildi. Ekimden 24 saat sonra transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Hücre sayıları 24 saat sonra %60-80 doluluğa ulaşacak şekilde ayarlandı. Hücreler son derişimi 30 pmol olacak şekilde üç farklı SOX15 siRNA ve 25 pmol kontrol siRNA ile transfekte edildi.

1. Transfeksiyon için bir gün önceden 6 kuyulu tabaklara hücre ekimi işlemi için kaplama yapıldı.
2. A ve B çözeltileri tabloda belirtilen miktarlarda mikrosantifüj tüplerine konularak santrifüjlendi (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Transfeksiyon için karışımın hazırlanması

Karışım	SOX15 siRNA		Kontrol siRNA	
	Çözelti A	Çözelti B	Çözelti A	Çözelti B
Opti-MEM	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
SOX15 siRNA (3 adet)	1+1+1 µl			
Lipofektamin		3 µl		2,5 µl
Kontrol siRNA			2,5 µl	

3. Transfeksiyon karışımı SOX15 siRNA 15 dk, Kontrol siRNA 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübatörden hücreler çıkartıldı ve 6 kuyulu tabağın içerisindeki besiyeri pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
5. İnkübasyonu tamamlanan transfeksiyon karışımı, her biri 1000 µl olacak şekilde son hacim 1 ml'ye tamamlandı.
6. 37°C %5 CO_2 içeren inkübatöre koyuldu.
7. 6 saat sonra her kuyuya 1ml 2x büyüme besiyeri eklenerek transfeksiyon durduruldu.
8. 18.saatte hücreler toplanarak hem mRNA hem de protein eldeleri gerçekleştirildi.

3.2.3. MTT Testi

SOX15 siRNA susturulma işleminin tiroid hücre hattı canlılığına/proliferasyonuna etkisini saptanmak üzere için hücre canlılığını gösteren MTT analizi yapıldı.

1. siRNA uygulama işlemi MTT testi için 96 kuyuluk tabakta tekrar edildi.
2. 18. Satin sonunda hücrelerin toplaması yerine tüm kuyucuklara 10µl MTT solüsyonu eklendi.
3. 37°C' lik CO2' li inkübatörde 4 saat inkübe edildi.
4. Bütün kuyucuklara 50 µl DMSO eklendi ve pipetle karıştırıldı.
5. 37°C' lik CO2' li inkübatörde 4 saat inkübe edildi.
6. Sonra 570 nm dalga boyunda Eliza Reader' da ölçüm yapıldı.

7. Elde edilen değerlerden kör değerleri çıkartıldı, sonra yüzde değerleri hesaplandı.
8. Deney 4 kez tekrar edildi.

3.2.4. Hücre Lizatından RNA Eldesi

Hücre kültüründe normal ve kanser tiroid hücre hattı ekilerek çoğaltıldı ve pasajlandı. Pasajlardan toplanan hücrelerden PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak RNA elde edildi. Aynı zamanda normal tiroid hücre hattında SOX15 siRNA susturma işlemi sonrası 18. saatte toplanan hücrelerden de RNA eldesi yapıldı. Hücre lizatından RNA eldesi yönteminin akış şeması Tablo 3-2'te gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Hücre lizatından RNA eldesi yöntemi

Hücre lizatı + 500µl parçalama tamponu + 5µl β-merkaptoetanol

↓ Homojenleştirme

Lizat

26000 x g'de 5 dk. Santrifüj

↓ Üst sıvı + %70'lik soğuk etanol

Filtreli tüpe aktarma

↓ 12 000 x g'de 30 sn. santrifüj

700µl Birinci Yıkama Tamponu

↓ 12 000 x g 'de 30 sn. santrifüj

500µl İkinci Yıkama Tamponu (Bu işlem iki kez gerçekleştirildi)

↓ 12 000 x g'de 30 sn. santrifüj

12 000 x g'de 2 dk. santrifüj



80µl RNAaz içermeyen su eklenip 5 dk. oda ısısında bekletildi



12 000 x g'de 2 dk. santrifüj

Elde edilen RNAlar -80°C' de saklandı.

Elde edilen toplam RNA'nın Nanodrop Spektrofotometre (Thermofisher Scientific, ABD)'de saflık ve yoğunluk ölçümü yapılarak cDNA sentezi yapıldı.

3.2.5. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örnekleri saflık ve yoğunluklarına göre 200 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı ve High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermofisher Scientific, ABD) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezinde kullanılan çözeltilerin hacimleri ve tepkime koşulları Tablo 3-3'te gösterilmiştir.

Tablo 3-3: cDNA sentezinde kullanılan çözeltilerin hacimleri ve tepkime koşulları

Çözeltiler	Hacim	Son derişim
Toplam hacim 10 µl olacak şekilde		
10X Tepkime Tamponu	2µl	1X
25X (10mM) dNTP	0,8µl	1mM
10X Rastgele Primer	2µl	5µM

Ters Transkriptaz	1µl	10U/µl
Nükleaz İçermeyen Su	4,2 µl	
Kalıp RNA	200 ng'a göre ayarlandı	
Karışım ısı döngü cihazında 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk, 4°C'de ∞. inkübe edildi.		

3.2.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (GZ-PZR)

Gen ifade düzeyindeki değişimleri değerlendirmek için gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (GZ-PZR) yöntemi kullanıldı. Tiroid hücre hattında siRNA uygulaması öncesi ve sonrası toplanan hücrelerden elde ettiğimiz mRNA'dan ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar GZ-PZR için kalıp DNA olarak kullanıldı.

SOX15, AKT1, CTNNB1 genleri için SYBR Green (Biorad-ABD), *CCND1, C-MYC* genleri için de Evrensel Prob Kütüphanesi (sırasıyla UPL Prob #17 ve #66) (Roche) ve her bir gene ait tasarladığımız primerleri kullanarak GZ-PZR yöntemi gerçekleştirildi. Normalizasyon için için GAPDH ve B2M genleri kullanıldı. Tepkime, 96 kuyuluk plaka içerisinde çalışılarak gerçekleştirildi. Kullandığımız GZ-PZT yönteminin karışım içeriği ve koşulları Tablo 3-4 ve Tablo 3-5'te gösterilmiştir.

Tablo 3-4: SYBR® Green Master Mix'li GZ-PZT yönteminin karışım içeriği

İçerik	Hacim
SYBR Green	7,5µl
İleri Primer	0,5µl
Geri Primer	0,5µl
RNAse içermeyen su	3,5µl
cDNA	3µl

Toplam Hacim	15µl

SOX15, AKT1, CTNNB1 genlerinin ifade düzeyleri Lightcycler 480-II (Roche, İSVİÇRE) cihazı kullanılarak GZ-PZR yöntemi ile analiz edildi.

Çift Zincir Ayrılması: 95 °C'de 15 dk 1 döngü.

Çoğalma: Bozunma 95^{o}C 15sn, Bağlanma 61^{o}C 30 sn 40 döngü, Uzama 72^{o}C.

Tablo 3-5: Evrensel Prob Kütüphanesi kullanılarak hazırlanan GZ-PZT yönteminin karışım içeriği

İçerik	Hacim
UPL Prob #17/ #66	0,4µl
Master mix	10µl
İleri Primer	0,4µl
Geri Primer	0,4µl
RNAse içermeyen su	5µl
cDNA	3µl
Toplam Hacim	19,2µl

CCND1, C-MYC genlerinin ifade düzeyleri Lightcycler 480-II (Roche, İSVİÇRE) cihazı kullanılarak GZ-PZR yöntemi ile analiz edildi.

Çift Zincir Ayrılması: 95 °C'de 10 dk 1 döngü.

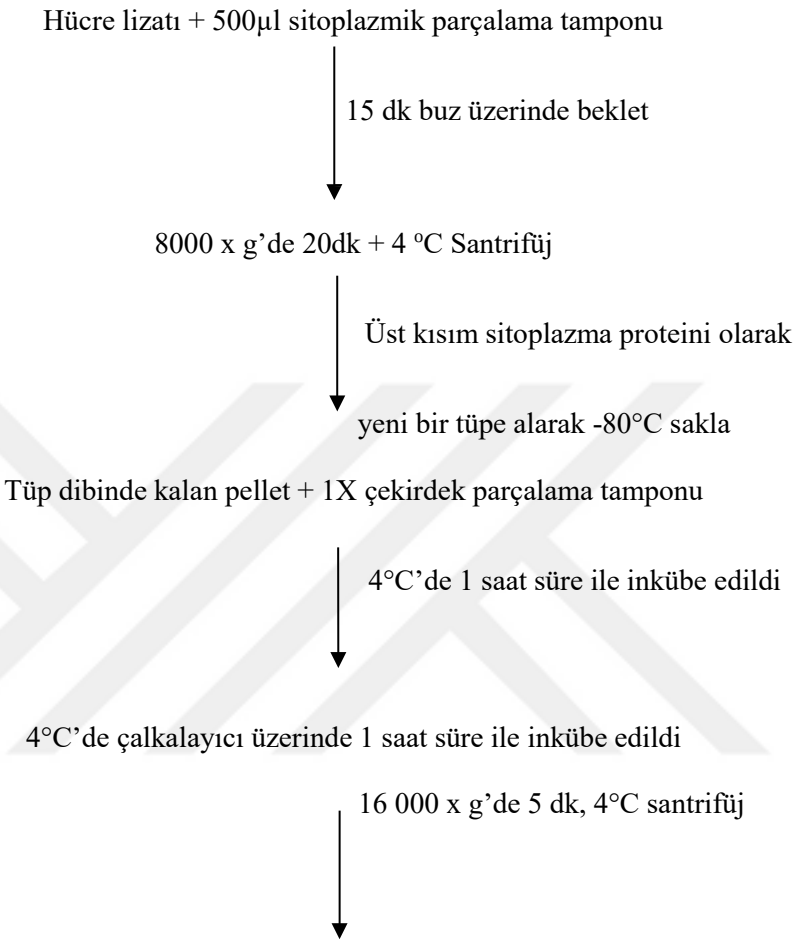
Çoğalma: Bozunma 95^{o}C 10sn, Bağlanma 65^{o}C 30 sn 45 döngü, Uzama 72^{o}C.

3.2.7. Hücre Lizatından Protein Eldesi

Hücre kültüründe normal ve kanser tiroid hücre hattı ekilerek çoğaltıldı ve pasajlandı. Pasajlardan toplanan hücrelerde Millipore Nuclear Extractionkit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak Protein elde edildi. Aynı zamanda normal tiroid hücre hattında siRNA susturma işlemi sonrası 18. saatte toplanan hücrelerde de protein

eldesi yapıldı. Hücre lizatından protein elde etmenin akış şeması Tablo 3-7'de gösterilmiştir.

Tablo 3-6: Hücre lizatından protein eldesi yönteminin akış şeması



3.2.8. Western Blotlama

Western Blotlama yönteminde proteinler moleküler ağırlıklarına göre dikey jel elektroforezi ile ayrılır ve bir membrana aktarılır.

Çalışmamızda SOX15 geninin tiroid kanserinde etki mekanizmasını belirlemek için; tiroid kanserli ve sağlıklı hücre hatlarında, kanserle ilişkili hücresel mekanizmaları düzenleyen iki önemli yolak olan Wnt/β-katenin ve PI3K/AKT ile etkileşimi araştırılması amaçlandı. Hücre hatlarında SOX15 geninin siRNA ile susturulması ardından Wnt/β-

katenin yolağında rol alan CTNNB1, hedef genleri olan CCND1 ve C-MYC'in protein düzeyleri; PI3K/AKT yolağı genlerinden AKT1 ile p-AKT1'in protein düzeyine bakıldı.

siRNA ile *SOX15* geninin susturulması işleminden sonra hücreler toplanarak protein elde edildi ve western blot analizi yapıldı.

3.2.8.1. Proteinlerin Jele Yüklenmesi ve Elektroforezi

Her bir örnek için proteinler 75mg/mL' a sabitlendi (Birinci normalizasyon)

1. Sulandırılmış proteinler yükleme tamponu ile karıştırılarak 70°C'ta ısıttığımız etüvde 10 dakika boyunca inkübe edildi.
2. Denatüre edilen örnekler buz üzerine alınarak 10 dakika + 4°C buzdolabında bekletildi.
3. Proteinlerin yükleneceği Jel tanka yerleştirildi ve tankın içerisine 1x MES yürütme tamponu eklendi.
4. İlk kuyuya Protein standartı (Thermo Scientific) ve sırasıyla protein örnekleri jele yüklendi.
5. Örnekler 165 Volt 120mA'de 35 dakika yürütüldü ve jeller düzenekten çıkarılarak distille su içerisine alındı.

3.2.8.2. Jeldeki Proteinlerin Membrana Aktarılması

Membrana aktarılma işlemi iBlotTM Gel Transfer Stacks Nitrocellulose (Thermo Fisher Scientific) ile iBlotTM Dry Blotting System (Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanıldı.

1. Kasetten dikkatlice ayrılan jeller önce metanolda sonra ise distile suda bekletildi.
2. iBlot cihazı hazırlanarak en alt kısmına bottom membranıve üzerine jel yerleştirildi.
3. Son olarak üzerine distile su ile ıslatılmış filtre kağıdı konuldu.
4. Üzerine Cathode Stack Tap Regular konularak üzerinden rulo ile geçildi.
5. Üzerine sünger yerleştirildi ve kapak kapatıldı.

6. Cihaz güç kaynağına bağlanıp, aktarım 20 Voltta 1 dakika, 23Voltta 4 dakika ve 25Voltta 2 dakika olmak üzere toplam 7 dakikada gerçekleştirildi.
7. Aktarım bittikten sonra membranlar cihazdan alınarak +4°C' de PBST içerisine alındı.

3.2.8.3. Blokaj Aşaması

Membran %5'lik süt tozu + PBST karışımından oluşan çözelti içerisine konularak oda ısısında yatay çalkalayıcıda 1 saat bloke edildi. Sonra membranlar 3 kez 10' ar dakika PBST solüsyonu ile yıkandı.

3.2.8.4. Membrandaki Proteinlerin Görüntülenmesi

1. Hedefe yönelik proteinlerin ifade düzeylerini belirlemek için, uygun primer antikorlar %5'lik süt tozu + PBST karışımı ile sulandırılarak membranlarla muamele edildi.
2. Membranlar +4 °C' de yatay çalkalayıcıda bir gece boyunca bekletildi.
3. Primer antikorlar membrandan uzaklaştırılarak 3 kez 5' er dakika PBST karışımı ile yıkandı.
4. Daha sonra %5'lik süt tozu + PBST karışımına sekonder antikor eklenerek membranlar bir saat boyunca oda ısısında yatay çalkalayıcıda bir saat bekletildi.
5. 3 kez 5' er dakika PBST solüsyonu ile yıkanan membranlar ECL (Thermo Fisher Scientific) ile muamele edilerek görüntüleme cihazında (Micro Chemi 4.2- DNR Bio-Imaging System) görüntülendi.

3.2.8.5. Stripping

Aynı membran daha fazla antikora bakmak için kullanılabilir. Bu durumunda membranlardaki antikor yıkama çözeltisi (Thermo Fisher Scientific, USA) ile işleme alınır. Yıkama çözeltisi membranın yüzeyini kaplayacak şekilde eklenerek yatay çalkalayıcıda oda ısısında 10 dakika bekletilir. Ardından membranlar 3 kez 5' er dakika PBST solüsyonu ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirilir.

3.2.9. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

GZ-PZT yöntemi ile elde edilen eşit değerler (Ct – Cycle Threshold) LightCycler Software ile analiz edildi. Tiroid hücre hattındandaki SOX15, AKT1, CTNNB1, C-MYC

ve CCND1 gen ifadelerinin B2M ve G6PD referans geni ile karşılaştırılması $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile yapıldı (181). Yöntemin formülü aşağıda gösterilmiştir.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\text{Tümör hücre (Hedef Gen Ct – Kontrol Gen Ct)-Normal hücre (Hedef Gen Ct – Kontrol Gen Ct)}]}$$

Verilerin istatistiksel olarak hesaplanması IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp. Released 2012.IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY:IBM Corp.) yazılımı ile yapıldı. İstatistiksel analiz sırasında elde ettiğimiz verilerin ilk önce normal dağılım gösterip göstermediğini anlamak amacıyla Shapiro-Wilk Normalite Testi yapılmıştır. Normalite testi sonucunda $p>0,05$ olan veri setlerinin normal dağılım gösterdiği, p'nin 0,05'ten küçük olduğu verilerin ise normal dağılım göstermediği kabul edilerek istatistiksel testleri geçilmiştir. Normal dağılım gösteren verilerde Paired Sample T-Test ve Pearson Correlation kullanılmış olup, normal dağılım göstermeyen verilerde sırasıyla bu iki testin parametrik olmayan alternatifleri olan Wilcoxon Signed Rank Test ve Spearman Correlation testleri uygulanmıştır.

4. BULGULAR

SOX15, AKT1, CTNNB1, C-MYC ve CCND1 ifade düzeyleri ve protein ifade çalışmaları MDA-T32 tiroid kanseri hücre hattı ve Nthy-ori 3-1 tiroid normal hücre hattında araştırılmıştır.

4.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

4.1.1. SOX15 Gen Ifade Ve Sirna İfade Sonuçları

MDA-T32 tiroid hücre hattında SOX15 geninin ifadesinin Nthy-ori 3-1 normal hücre hatına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu görüldü (p=0,020). Çalışmaya dahil edilen normal ve tiroid kanser hücre hattındaki SOX15 gen ifade sonuçları Tablo 4-1'de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Tümör ve normal tiroid hücre hatlarında SOX15 mRNA ifade sonuçları (SS: Standart Sapma)

	SOX15 Ct Ortalama ± SS	**B2M Ct Ortalama ± SS**	**ΔCt Ortalama ± SS**	**ΔΔCt**	**$2^{-\Delta\Delta Ct}$**	***p**
MDA-T32	31,87±0,18	18,59±0,00	13,28±0,18	0,91	0,54	0,020
NTHY-ORI-3-1	30,34±0,69	17,97±0,83	12,37±0,14	0	1	

*İstatistiksel değerlendirme Paired Sample T-Test kullanılarak yapılmıştır.

Sağlıklı hücre hattında SOX15 geninin siRNA ile susturulması sonrası ifade düzeyinin %86 oranında azaldığı görüldü (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: SOX15 siRNA uygulaması sonrası Nthy-ori 3-1 hücre hattında SOX15 mRNA ifade düzeyi (SS: Standart Sapma)

	SOX15 Ct Ortalama ± SS	**B2M Ct Ortalama ± SS**	**ΔCt Ortalama ± SS**	**ΔΔCt**	**$2^{-\Delta\Delta Ct}$**	***p**
SOX15+siRNA	32,86±0,51	19,73±0,31	13,13±0,39	2,96	0,14	0,109
Kontrol+siRNA	29,98±0,12	25,63±9,66	10,17±0,29	0	1	

*İstatistiksel değerlendirme Wilcoxon Signed Ranks Test kullanılarak yapılmıştır

4.1.2. SOX15 Sirna Susturmasının C-MYC Gen Ifade Düzeyine Etkisi

MDA-T32 tiroid hücre hattında C-MYC geninin ifadesinin Nthy-ori 3-1 normal hücre hatına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu görüldü (p=0,031). Çalışmaya dahil edilen normal ve tiroid kanser hücre hattındaki C-MYC gen ifade sonuçları Tablo 4-3'te gösterilmiştir.

Tablo 4-3: Tümör ve normal tiroid hücre hatlarında C-MYC mRNA ifade sonuçları (SS: Standart Sapma)

	C-MYC Ct Ortalama ± SS	**G6PD Ct Ortalama ± SS**	**ΔCt Ortalama ± SS**	**ΔΔCt**	**$2^{-\Delta\Delta Ct}$**	***p**
MDA-T32	23,83±1,92	21,23±0,61	2,60±2,45	3,28	0,12	0,031
NTHY-ORI-3-1	20,92±1,01	21,59±0,75	-0,68±1,48	0	1	

*İstatistiksel değerlendirme Paired Sample T-Test kullanılarak yapılmıştır.

Sağlıklı hücre hattında SOX15 geninin siRNA ile susturulması sonrası C-MYC ifade düzeyinin değişim göstermediği belirlendi (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: SOX15 siRNA uygulaması sonrası Nthy-ori 3-1 hücre hattında C-MYC mRNA ifade düzeyi (SS: Standart Sapma)

	C-MYC Ct Ortalama ± SS	**G6PD Ct Ortalama ± SS**	**ΔCt Ortalama ± SS**	**ΔΔCt**	**$2^{-\Delta\Delta Ct}$**	***p**
SOX15+siRNA	22,59±2,70	23,56±2,37	-0,97±0,78	0,20	0,90	0,126
Kontrol+siRNA	20,93±0,43	22,10±0,64	-1,17±0,75	0	1	

*İstatistiksel değerlendirme Paired Sample T-Test kullanılarak yapılmıştır.

4.1.3. SOX15 Sirna Susturmasının CCND1 Gen Ifade Düzeyine Etkisi

MDA-T32 tiroid hücre hattında CCND1 geninin ifadesinin Nthy-ori 3-1 normal hücre hatına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü (p=0,013). Analiz edilen sonuçları Tablo 4-5'te gösterilmiştir.

Tablo 4-5: Tümör ve normal tiroid hücre hatlarında CCND1 mRNA ifade sonuçları (SS: Standart Sapma)

	CCND1 Ct Ortalama ± SS	**G6PD Ct Ortalama ± SS**	**ΔCt Ortalama ± SS**	**ΔΔCt**	**$2^{-\Delta\Delta Ct}$**	***p**
MDA-T32	21,01±0,11	21,38±0,24	-0,37±0,13	-0,53	1,45	0,013
NTHY-ORI-3-1	22,43±0,56	22,27±0,53	0,16±0,06	0	1	

*İstatistiksel değerlendirme Paired Sample T-Test kullanılarak yapılmıştır.

Sağlıklı hücre hattında SOX15 geninin siRNA ile susturulması sonrası CCND1 geninin ifade düzeyinin 3,44 kat artmış olduğu görüldü (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: SOX15 siRNA uygulaması sonrası Nthy-ori 3-1 hücre hattında CCND1 mRNA ifade düzeyi (SS: Standart Sapma)

	CCND1 Ct Ortalama ± SS	**G6PD Ct Ortalama ± SS**	**ΔCt Ortalama ± SS**	**ΔΔCt**	**$2^{-\Delta\Delta Ct}$**	***p**
SOX15+siRNA	21,63±0,40	22,77±0,24	-1,14±0,59	-1,70	3,44	0,109
Kontrol+siRNA	22,81±0,00	22,25±0,00	0,56±0,00	0	1	

*İstatistiksel değerlendirme Wilcoxon Signed Ranks Test kullanılarak yapılmıştır

4.1.4. SOX15 Sirna Susturmasının CTNNB1 Gen Ifade Düzeyine Etkisi

MDA-T32 tiroid hücre hattında CTNNB1 geninin ifadesinin Nthy-ori 3-1 normal hücre hatına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış olduğu görüldü (p=0,003). Çalışmaya dahil edilen normal ve tiroid kanser hücre hattındaki CTNNB1 gen ifade sonuçları Tablo 4-4'te gösterilmiştir.

Tablo 4-7: Tümör ve normal tiroid hücre hatlarında CTNNB1 mRNA ifade sonuçları (SS: Standart Sapma)

	CTNNB1 Ct Ortalama ± SS	**G6PD Ct Ortalama ± SS**	**ΔCt Ortalama ± SS**	**ΔΔCt**	**$2^{-\Delta\Delta Ct}$**	***p**
MDA-T32	21,6±3,08	20,0±1,36	1,57±1,73	-0,59	1,51	0,003
NTHY-ORI-3-1	21,2±2,26	19,0±0,45	2,16±1,81	0	1	

*İstatistiksel değerlendirme Paired Sample T-Test kullanılarak yapılmıştır.

Sağlıklı hücre hattında SOX15 geninin siRNA ile susturulması sonrası CTNNB1 gen ifade düzeyinin %14 oranında azaldığı görüldü (Tablo 4-8).

Tablo 4-8: SOX15 siRNA uygulaması sonrası Nthy-ori 3-1 hücre hattında CTNNB1 mRNA ifade düzeyi (SS: Standart Sapma)

	CTNNB1 Ct Ortalama ± SS	**G6PD Ct Ortalama ± SS**	**ΔCt Ortalama ± SS**	**ΔΔCt**	**$2^{-\Delta\Delta Ct}$**	***p**
SOX15+siRNA	24,03±5,53	20,59±2,85	3,45±2,72	0,60	0,86	0,345
Kontrol+siRNA	22,13±3,01	19,28±1,36	2,85±1,65	0	1	

*İstatistiksel değerlendirme Wilcoxon Signed Ranks Test kullanılarak yapılmıştır

4.1.5. SOX15 Sirna Susturmasının AKT1 Gen Ifade Düzeyine Etkisi

MDA-T32 tiroid hücre hattında AKT1 geninin ifadesinin Nthy-ori 3-1 normal hücre hatına göre düşük olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p=0,199). Çalışmaya dahil edilen normal ve tiroid kanser hücre hattındaki AKT1 gen ifade sonuçları Tablo 4-9'da gösterilmiştir.

Tablo 4-9: Tümör ve normal tiroid hücre hatlarında AKT1 mRNA ifade sonuçları (SS: Standart Sapma)

	AKT1 Ct Ortalama ± SS	G6PD Ct Ortalama ± SS	ΔCt Ortalama ± SS	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	*p
MDA-T32	22,2±0,20	19,8±1,05	2,41±0,91	0,98	0,57	0,199
NTHY-ORI-3-1	20,6±0,50	19,1±1,44	1,44±1,18	0	1	

*İstatistiksel değerlendirme Paired Sample T-Test kullanılarak yapılmıştır.

Sağlıklı hücre hattında SOX15 geninin siRNA ile susturulması sonrası AKT1 geninin ifade düzeyinin 1,28 kat arttığı görüldü (Tablo 4-19).

Tablo 4-10: SOX15 siRNA uygulaması sonrası Nthy-ori 3-1 hücre hattında AKT1 mRNA ifade düzeyi (SS: Standart Sapma)

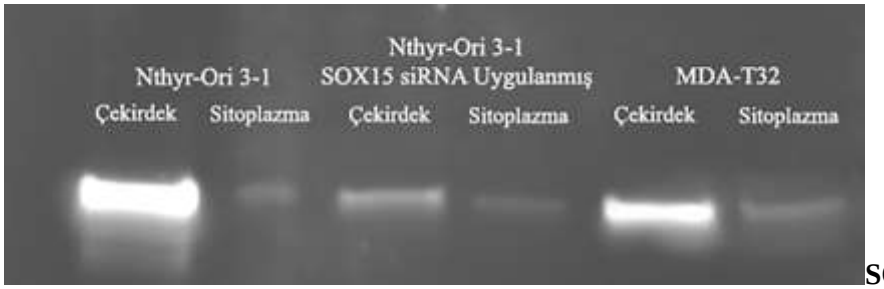
	AKT1 Ct Ortalama ± SS	G6PD Ct Ortalama ± SS	ΔCt Ortalama ± SS	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	*p
SOX15+siRNA	20,84±0,27	19,22±1,62	1,61±1,35	-0,35	1,28	0,068
Kontrol+siRNA	20,53±0,28	18,57±1,41	1,96±1,13	0	1	

*İstatistiksel değerlendirme Wilcoxon Signed Ranks Test kullanılarak yapılmıştır

4.2. SOX15, AKT1, PAKT1, CTNNB1, CCND1 Protein Ifade Sonuçları.

Western blot ile Tiroid hücre hattında SOX15, AKT1, pAKT1, CTNNB1, CCND1 proteinlerinin sitoplazma ve çekirdek düzeyleri incelendi.

Nthy-ori 3-1 tiroid normal hücre hattında SOX15 proteini %92,48 çekirdek, %7,52 sitoplazma yerleşimlidir. Nthy-ori 3-1 tiroid hücre hattı SOX15 siRNA susturması sonrası ise SOX15 proteini %76,75 çekirdek, %53,42 sitoplazmada saptandı. MDA-T32 tiroid kanseri hücre hattında ise SOX15 proteini %87,23 çekirdek, %12,77 sitoplazma yerleşimlidir (Şekil 4-1) (Tablo 4-11).



SOX15 - 28KDA

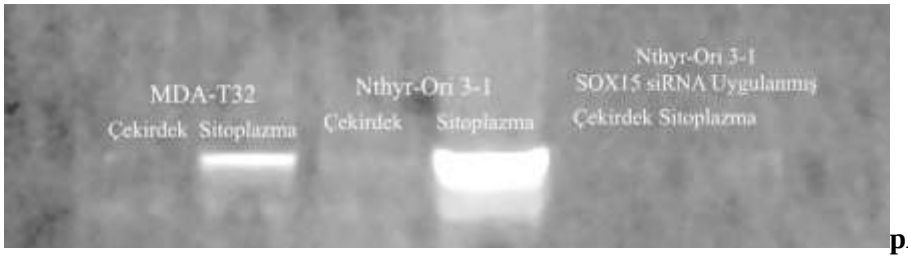
Şekil 4-1:MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattına ait Sox15 western blot görüntüsü.

AKT1 protein ifade sonuçlarını analiz ettiğimizde Nthy-ori 3-1 tiroid normal hücre hattında protein %1,99'u çekirdekte, %98,01'i sitoplazmada saptandı. Hücre hattı SOX15 siRNA susturması sonrası ise AKT1 proteini çekirdekte gözlemlenmezken, %100 sitoplazmada saptandı.MDA-T32 tiroid kanseri hücre hattında ise AKT1 proteini çekirdekte saptanmazken, %100 sitoplazma saptandı. pAKT1 proteini Nthy-ori 3-1 tiroid normal hücre hattında %15,25 çekirdek, %84,75 sitoplazma yerleşimli olup, MDA-T32 tiroid kanseri hücre hattında ise çekirdekte gözlenmezken, %100 sitoplazma yerleşimliydi. Sonuçlar Şekil 4-2 ve Şekil 4-3'te gösterilmiştir (Tablo 4-11).



AKT1 62kDA

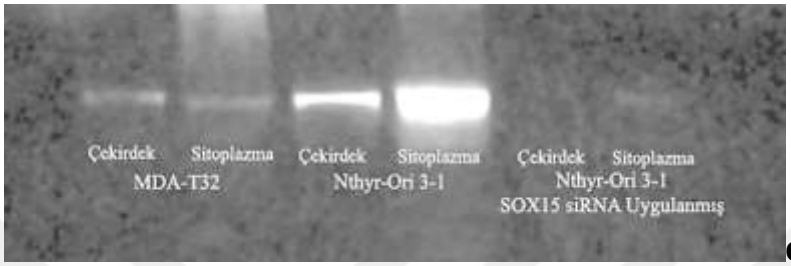
Şekil 4-2:MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattına ait AKT1 western blot görüntüsü.



pAKT1- 62kDA

Şekil 4-3: MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattına ait pAKT1 western blot görüntüsü.

Nthy-ori 3-1 tiroid normal hücre hattında CTNNB1 proteinini incelediğimizde %26,05 çekirdekte, %73,95 sitoplazmada belirlendi. SOX15 siRNA susturması sonrası ise CTNNB1 proteini çekirdekte bulunmazken, %100 sitoplazmada görüldü. MDA-T32 tiroid kanseri hücre hattında ise CTNNB1 proteini %43,69 çekirdek, %56,31 sitoplazma yerleşimlidir (Şekil 4-4) (Tablo 4-11).



CTNNB1- 92kDA

Şekil 4-4: MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattına ait CTNNB1 western blot görüntüsü.

Çalışmamızdaki bir diğer protein olan CCND1 Nthy-ori 3-1 tiroid normal hücre hattında bakıldığında çekirdekte görülmezken, %100 sitoplazmada saptandı. MDA-T32 tiroid kanseri hücre hattında ise CCND1 proteini %20,19 çekirdek, %79,81 sitoplazma yerleşimlidir (Şekil 4-5) (Tablo 4-11).



CCND1- 33kDA

Şekil 4-5: MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattına ait CCND1 western blot görüntüsü.

Tablo 4-11: MDA-T32 tiroid kanseri ve Nthy-ori 3-1 normal hücre hattlarında çekirdekte ve sitoplazmada SOX15, AKT1, pAKT1, CTNNB1, CCND1 protein düzeyleri

	MDA-T32		Nthy-ori 3-1		SOX15 siRNA	
	Çekirdek alan (%)	Sitoplazma alan (%)	Çekirdek alan (%)	Sitoplazma alan (%)	Çekirdek alan (%)	Sitoplazma alan (%)
SOX15	11103,42 (87,23)	1624,79 (12,77)	19438,37 (92,48)	1579,74 (7,52)	2838.740 (76,75)	860.033 (23,25)
AKT1	0,00	11902,37 (100)	512,083 (1,99)	25201,44 (98,01)	0,00	2712,28 (100)
pAKT1	0,00	7547,10 (100)	3049,37 (15,25)	16947,25 (84,75)	0,00	0,00
CTNNB1	3949,58 (43,69)	5091,05 (56,31)	5931,56 (26,05)	16837,95 (73,95)	0,00	1955,54 (100)
CCND1	6326,794 (20,19)	25006,73 (79,81)	0,00	2581,22 (100)	0,00	0,00

5. TARTIŞMA

Birçok alt tipi olan tiroid kanseri, endokrin kanserler içinde en çok görülen kanser türüdür. Onkogenlerin etkinleşmesi, füzyon gen oluşumları, tümör baskılayıcı genlerin etkinliğini kaybetmesi, genlerin ifade düzeyi, proteinler ve microRNA'lar, epigenetik değişimler ve mitokondri DNA'sı değişiklikleri tiroid tümör gelişimine yol açar. Tiroid kanseri moleküler genetiğinin daha iyi anlaşılması tiroid tümör etiyolojisinin ve tümörijenezinin açıklanmasına katkıda bulunmaktadır (43).

Memelilerde *SOX15* (Cinsiyet belirleyici bölge Y-kutusu 15 geni), SOX G alt grubunun tek üyesi olup embriyonik gelişimin düzenlenmesinde ve hücre kaderinin belirlenmesinde rol alır. SOX ailesi üyeleri; onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak işlev görebilir ve DNA kopya sayısı değişiklikleri, DNA metillenmesi ve miRNA'ların etkisi gibi çeşitli genetik ve epigenetik mekanizmalar ile etkinleşebilir veya ifadeleri azalabilir. *SOX15*'in hücre biyolojisi ve gelişimindeki rolü, diğer SOX ailesi üyelerine kıyasla nispeten az çalışılmıştır(4).

Yapılan çalışmamız kapsamında *SOX15* geninin tiroid kanserinde etki mekanizmasını belirlemek için; tiroid kanserli ve sağlıklı hücre hatlarında, kanserle ilişkili hücresel mekanizmaları düzenleyen iki önemli yolak olan Wnt/β-katenin ve PI3K/AKT ile etkileşimi araştırıldı. *SOX15* geninin sağlıklı tiroid hücre hattında siRNA ile susturma işlemi sonrası WNT/ β-katenin sinyal yolağı genlerinden *CTNNB1, CCND1* ve *C-MYC*'in mRNA ve protein düzeyleri; PI3K/AKT sinyal yolağı genlerinden *AKT1*'in mRNA ve protein düzeyi, p-AKT1 protein düzeyi ile hücresel yerleşimlerinin etkilenip etkilenmediği araştırıldı.

Akciğer adenokarsinomunda ile skuamöz hücreli akciğer ve özofagus kanserinde SOX15'in onkogenik işlevi olduğunu göstermiştir (164,182). Ancak testis embriyonal hücre kanseri (183), pankreas kanseri (184) ve kolorektal kanserde (185) *SOX15*'in tümör baskılayıcı bir etki gösterdiği bildirilmiştir. Xi ve ark'nın endometriyal kanser dokularında ve Zang ve ark'nın gliomada yaptığı çalışmalar da *SOX15*'in tümör baskılayıcı etkisinin olduğunu göstermişler (186,187). Thu ve ark'nın SOX15 geninin pankreas kanserinde etkisini araştırmak üzere hücre hatları kullanılarak yaptıkları çalışma sonucunda, SOX15 geninin Wnt/β-katenin yolağını engelleyerek tümör baskılayıcı işlev görebileceğini öne sürmüşlerdir (180). Özaydın ve ark. İnsan tiroid tümör örnekleri ile

yaptıkları çalışma sonucunda SOX15'in tiroid kanserinde de tümör baskılayıcı olarak işlev gösterdiğini bildirmişlerdir (188).

Hücre hatları ile yaptığımız çalışma sonucu SOX15'in tiroid kanserinde tümör baskılayıcı işlev gösterdiğini destekler niteliktedir. Protein yerleşimi ile ilgili yaptığımız çalışma sonucunda SOX15 proteininin daha çok çekirdek yerleşimli olduğunu, kanserleşmede ise çekirdeğe göçünün artmış olduğunu gördük. SOX15'in çekirdeğe geçişi, yazılım etmeni olarak işlev gördüğünü düşündürmektedir.

Wnt/β-katenin sinyal yolağının, SOX ailesi genleri tarafından düzenlendiği ve bu yolağın birçok habis oluşumunda işlev gösterdiği bildirilmiştir (158,164,183,189). Yapılan çalışmalarda *SOX17, SOX6* ve *SOX9*'un Wnt sinyal yolağının antagonisti olduğu gösterilmiştir (193). Ayrıca SOX15 Wnt sinyal yolu üzerine tümör baskılayıcı etkisi aracılığı ile pankreas ve yemek borusu kanserlerinde de yer aldığı gösterilmiştir. Bu nedenle SOX15 geninin tiroid kanserinde etki mekanizmasını araştırmak amacı ile yaptığımız çalışmada Wnt/β-katenin yolağının anahtar moleküllerinden CTNNB1, CCND1 ve C-MYC genleri ve bu genlerin ürünü olan proteinlerin de hücre hatlarında SOX15'in siRNA ile susturulması sonucunda ifade düzeyi ve yerleşimi araştırıldı.

Yaptığımız çalışma sonucunda CTNNB1 mRNA düzeyinin tümör hücre hattında normal hücre hattına göre arttığını saptadık. Ancak bu mRNA ifade artışının protein düzeyine yansımadığını hatta protein düzeyinde bir azalma olduğunu saptadık. Ayrıca siRNA ile susturma deneyleri sonucunda CTNNB1 mRNA düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmaması SOX15'in doğrudan CTNNB1 üzerinden WNT/ β-katenin yolağını etkilemediğini göstermektedir.

C-MYC hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, aniyogenezi ve apoptozu düzenler (194,195). Bu nedenle C-MYC'in nöroblastoma, glioblastoma ve bazı mezenkimal tümörlerin oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. PTC dokularında lef-7a aracılığı ile C-MYC geninin baskılanmasının hücre çoğalma, göç ve invazyonunun önlediği gösterilmiştir. Bunun dışında yapılan birçok çalışma PTC'de C-MYC geninin gerek aşırı ifade edilmesi gerekse çekirdekte artışı bu kanser türünde rolü olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada *C-MYC* mRNA ifade düzeyinin tümör dokularında normale göre istatiksel olarak anlamlı şekilde azalmış bulduk. *SOX15*'in tiroid normal hücre hattında susturulması sonrası *C-MYC* ifade düzeyinde değişim izlenmedi. Bu da bize SOX15'in C-MYC ifade düzeyi üzerine bir etkisi olmadığını göstermektedir.

Siklin ifadesi düzensizleştiğinde, normal hücre büyümesinin kontrolü kaybolur ve bu durum da hücre döngüsünde bozulmalara ve habis tümör gelişimine veya ilerlemesine neden olabilir (200).

Siklin D1'in aşırı ifadesi, bazı meme kanseri formları, hepatoselüler karsinom, özofagus kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli kanser ve ayrıca tiroid kanseri gibi birçok habis tümörde gösterilmiştir (201). Bazı çalışmalar *CCND1*'in aşırı ifadesinin, tiroid kanserinin klinik evresi ile belirgin bir şekilde ilişkili olduğunu ve bunun klinik ortamlarda bir biyobelirteç olarak kabul edilebileceğini göstermiştir (200,202-205). Lee ve arkadaşları da benzer şekilde siklin D1 ifade artışını lenf nodülü metastazıyla ilişkili bulmuşlardır (206). Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada agresif seyreden tiroid karsinomlarında daha yüksek oranlarda siklin D1 ifadesi saptadıklarını belirtmişlerdir (207). Papiler tiroid mikrokanserinde Lantsov D ve ark. siklin D1 aşırı ifadesini ve anormal beta-katenin ekspresyonu ile korelasyon gösterdiyini buldular. Aynı zamanda siklin D1 ifadesinin, PMC'de tümör boyutu ve lenf nodu metastazları ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu gösterdiler.

Yaptığımız çalışma sonucunda literatürdeki verileri destekleyici nitelikte *CCND1* geninin normal ve tiroid kanser hücre hattında mRNA ifade düzeyine baktığımızda, tiroid kanser hücre hattında tiroid normal hücre hattına göre istatiksel olarak anlamlı şekilde artmış olduğunu bulduk.

Seçtiğimiz *SOX15* geninin *CCND1* üzerine olası etkisini incelediğimizde sağlıklı hücre hattında *SOX15* geninin siRNA ile susturulması sonrası *CCND1* ifade düzeyinin 3,44 kat arttığı görüldü. Tümör baskılayıcı olarak görev yapan *SOX15* geninin susturulması sonrası *CCND1* ifadesindeki bu artış, normal koşullarda *SOX15* geninin *CCND1* ifadesini baskıladığını göstermektedir.

PI3K-AKT sinyal yolağının etkinliği tiroid kanserinin başlaması ve ilerlemesinde önemli yolaklardan biri olup (211), bu yolağın etkinleşmesi tedavi ajanlarına karşı dirence yol açar (212). Normal tiroidde, üç *AKT* izoformunun tümü ifade edilmesine rağmen *AKT1* hem mRNA hem de protein düzeyinde baskın izoformdur (96). *AKT1* izoformun etkinliği, foliküler ve papiller kanserlerde tümör invazyonu ve metastazı ile ilişkili bulunmuştur (99,106). Vasco ve ark. (106) AKT etkinliğini ve lokalizasyonunun tiroid kanserinde tümör invazyonu ve onkogenik ifadesi ile ilişkili olduğunu gösterdi. İmmünoaktif pAKT, kapsüler invazyon bölgelerinde sıklıkla gözlenir ve foliküler

kanserlerde çekirdekte ve papiller kanserlerde ise invaziv bölgeler hariç sitoplazmada olduğu bulunmuştur (106).

Çalışmamızın *AKT1* geninin mRNA ifade düzeyine baktığımızda tiroid kanser hücre hattında normal hücre hatına göre düşük bulmamıza rağmen bu farklılığı istatistiksel olarak anlamlı olmadığı anlaşılmıştır. Ancak sağlıklı hücre hattında *SOX15* geninin siRNA ile susturulması sonrası *AKT1* geninin ifade düzeyinin istatiksel olarak anlamlı şekilde 1,28 kat arttığı saptandı. Bu da bize *SOX15*'in *AKT1* geninin ifadesini baskıladığını göstermektedir.

Anna ve ark. (213) AKT1 proteininin selim ve habis tiroid örneğinde esas olarak sitoplazmada yerleşik olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, AKT1'in çekirdekte yer almasının sadece çok agresif kanserlerin özelliği olduğunu düşündürmektedir (213). Yaptığımız çalışma protein düzeyinde incelendiğinde hem AKT1 hem de etkin hali olan pAKT1'in proteini normal ve tiroid kanseri hücre hattında sitoplazma yerleşimli bulundu. Öngörülen bu ilişkileri belirlemek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tiroid kanseri hücre hattı ile yaptığımız bu çalışma tümör baskılayıcı bir yazılım etmeni olan SOX15'in doğrudan WNT/ β-katenin yolağının kilit molekülleri olan CTNNB1 ve C-MYC üzerine anlamlı bir etkisi olmadığını ancak CCND1 aracılığı ile işlev gösterebileceğini göstermektedir.

Ancak bu mekanizmaların tam olarak aydınlatabilmesi için daha ileri düzeyde protein–protein etkileşim çalışmaları ve ChIP deneylerinin yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development* 2017; **144**(12), 2123-2140. doi:10.1242/dev.145615
2. Dermody S, Walls A, Harley EH, Jr. Pediatric thyroid cancer: An update from the SEER database 2007-2012. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2016; **89**, 121-126. doi:10.1016/j.ijporl.2016.08.005
3. Jin S, Borkhuu O, Bao W, Yang YT. Signaling Pathways in Thyroid Cancer and Their Therapeutic Implications. *J Clin Med Res* 2016; **8**(4), 284-296. doi:10.14740/jocmr2480w
4. Sacks D, Baxter B, Campbell BCV, Carpenter JS, Cognard C, Dippel D ve ark. Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke. *Int J Stroke* 2018; **13**(6), 612-632. doi:10.1177/1747493018778713
5. Ito M. Function and molecular evolution of mammalian Sox15, a singleton in the SoxG group of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; **42**(3), 449-452. doi:10.1016/j.biocel.2009.10.023
6. Boron WaEB. *Synthesis of thyroid hormones, Medical Physiology : A Cellular and Molecular Approach*. Philadelphia. 2003
7. Khan YS, Farhana A. *Histology, Thyroid Gland* İçinde, editor. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020. pp.
8. Durante C, Costante G, Lucisano G, Bruno R, Meringolo D, Paciaroni A ve ark. The natural history of benign thyroid nodules. *Jama* 2015; **313**(9), 926-935. doi:10.1001/jama.2015.0956
9. Popoveniuc G, Jonklaas J. Thyroid nodules. *Med Clin North Am* 2012; **96**(2), 329-349. doi:10.1016/j.mcna.2012.02.002
10. Lebastchi AH, Callender GG. Thyroid cancer. *Curr Probl Cancer* 2014; **38**(2), 48-74. doi:10.1016/j.currproblcancer.2014.04.001
11. DeLellis R. (2004). Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Paper presented at the.
12. Al Afif A, Williams BA, Rigby MH, Bullock MJ, Taylor SM, Trites J ve ark. Multifocal Papillary Thyroid Cancer Increases the Risk of Central Lymph Node Metastasis. *Thyroid* 2015; **25**(9), 1008-1012. doi:10.1089/thy.2015.0130
13. LiVolsi VA. Papillary thyroid carcinoma: an update. *Mod Pathol* 2011; **24 Suppl 2**, S1-9. doi:10.1038/modpathol.2010.129
14. Lloyd RV, Buehler D, Khanafshar E. Papillary thyroid carcinoma variants. *Head Neck Pathol* 2011; **5**(1), 51-56. doi:10.1007/s12105-010-0236-9
15. Sobrinho-Simões M, Eloy C, Magalhães J, Lobo C, Amaro T. Follicular thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2011; **24 Suppl 2**, S10-18. doi:10.1038/modpathol.2010.133
16. Baloch ZW, LiVolsi VA. Our approach to follicular-patterned lesions of the thyroid. *J Clin Pathol* 2007; **60**(3), 244-250. doi:10.1136/jcp.2006.038604
17. McHenry CR, Phitayakorn R. Follicular adenoma and carcinoma of the thyroid gland. *Oncologist* 2011; **16**(5), 585-593. doi:10.1634/theoncologist.2010-0405
18. Montone KT, Baloch ZW, LiVolsi VA. The thyroid Hürthle (oncocytic) cell and its associated pathologic conditions: a surgical pathology and cytopathology review. *Arch Pathol Lab Med* 2008; **132**(8), 1241-1250. doi:10.1043/1543-2165(2008)132[1241:Tthoca]2.0.Co;2

19. Dettmer MS, Schmitt A, Komminoth P, Perren A. Poorly differentiated thyroid carcinoma : An underdiagnosed entity. *Pathologe* 2020; **41**(Suppl 1), 1-8. doi:10.1007/s00292-019-0600-9
20. Volante M, Collini P, Nikiforov YE, Sakamoto A, Kakudo K, Katoh R ve ark. Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *Am J Surg Pathol* 2007; **31**(8), 1256-1264. doi:10.1097/PAS.0b013e3180309e6a
21. Sanders EM, Jr., LiVolsi VA, Brierley J, Shin J, Randolph GW. An evidence-based review of poorly differentiated thyroid cancer. *World J Surg* 2007; **31**(5), 934-945. doi:10.1007/s00268-007-9033-3
22. Cabanillas ME, Zafereo M, Gunn GB, Ferrarotto R. Anaplastic Thyroid Carcinoma: Treatment in the Age of Molecular Targeted Therapy. *J Oncol Pract* 2016; **12**(6), 511-518. doi:10.1200/jop.2016.012013
23. Molinaro E, Romei C, Biagini A, Sabini E, Agate L, Mazzeo S ve ark. Anaplastic thyroid carcinoma: from clinicopathology to genetics and advanced therapies. *Nat Rev Endocrinol* 2017; **13**(11), 644-660. doi:10.1038/nrendo.2017.76
24. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H ve ark. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2009; **19**(6), 565-612. doi:10.1089/thy.2008.0403
25. Pacini F, Castagna MG, Cipri C, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010; **22**(6), 475-485. doi:10.1016/j.clon.2010.05.002
26. DeLellis RA. *Pathology and genetics of tumours of endocrine organs*. IARC. 2004
27. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol* 2013; **2013**, 965212. doi:10.1155/2013/965212
28. Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014; **140**(4), 317-322. doi:10.1001/jamaoto.2014.1
29. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010; **22**(6), 395-404. doi:10.1016/j.clon.2010.05.004
30. *Cancer Statistics Center*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 28.04.2021, Erişim site adı: https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2020.html
31. Grubbs EG, Rich TA, Li G, Sturgis EM, Younes MN, Myers JN ve ark. Recent advances in thyroid cancer. *Curr Probl Surg* 2008; **45**(3), 156-250. doi:10.1067/j.cpsurg.2007.12.010
32. Nagataki S, Nyström E. Epidemiology and primary prevention of thyroid cancer. *Thyroid* 2002; **12**(10), 889-896. doi:10.1089/105072502761016511
33. Marcello MA, Cunha LL, Batista FA, Ward LS. Obesity and thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2014; **21**(5), T255-271. doi:10.1530/erc-14-0070
34. Braganza MZ, de González AB, Schonfeld SJ, Wentzensen N, Brenner AV, Kitahara CM. Benign breast and gynecologic conditions, reproductive and hormonal factors, and risk of thyroid cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2014; **7**(4), 418-425. doi:10.1158/1940-6207.Capr-13-0367
35. Wu L, Zhu J. Linear reduction in thyroid cancer risk by oral contraceptive use: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Hum Reprod* 2015; **30**(9), 2234-2240. doi:10.1093/humrep/dev160
36. Schneider DF, Chen H. New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. *CA Cancer J Clin* 2013; **63**(6), 374-394. doi:10.3322/caac.21195

37. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL ve ark. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; **64**(4), 252-271. doi:10.3322/caac.21235
38. Asif F, Ahmad MR, Majid A. Risk Factors for Thyroid Cancer in Females Using a Logit Model in Lahore, Pakistan. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; **16**(15), 6243-6247. doi:10.7314/apjcp.2015.16.15.6243
39. Brierley JD, Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. . *TNM Classification of Malignant Tumours.*: Academin Legal Writing. 2003
40. Shaha AR. TNM Classification of Thyroid Carcinoma. *World Journal of Surgery* 2007; **31**(5), 879-887. doi:10.1007/s00268-006-0864-0
41. Schmid KW, Synoracki S, Dralle H, Wittekind C. [Proposal for an extended pTNM classification of thyroid carcinoma : Commentary on deficits of the 8th edition of the TNM classification (German version)]. *Pathologe* 2018; **39**(1), 49-56. doi:10.1007/s00292-017-0410-x
42. Tuttle RM, Haugen B, Perrier ND. Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? *Thyroid* 2017; **27**(6), 751-756. doi:10.1089/thy.2017.0102
43. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**(3), 184-199. doi:10.1038/nrc3431
44. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**(4), 292-306. doi:10.1038/nrc1836
45. Lee NK. Tumor suppressor genes. *Head Neck* 1992; **14**(5), 407-414. doi:10.1002/hed.2880140513
46. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 1985; **42**(2), 581-588. doi:10.1016/0092-8674(85)90115-1
47. Machens A, Dralle H. Multiple endocrine neoplasia type 2 and the RET protooncogene: from bedside to bench to bedside. *Mol Cell Endocrinol* 2006; **247**(1-2), 34-40. doi:10.1016/j.mce.2005.10.028
48. Runeberg-Roos P, Saarma M. Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases. *Ann Med* 2007; **39**(8), 572-580. doi:10.1080/07853890701646256
49. Ciampi R, Nikiforov YE. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* 2007; **148**(3), 936-941. doi:10.1210/en.2006-0921
50. Patel KN, Singh B. Genetic considerations in thyroid cancer. *Cancer Control* 2006; **13**(2), 111-118. doi:10.1177/107327480601300205
51. Dhomen N, Marais R. New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; **17**(1), 31-39. doi:10.1016/j.gde.2006.12.005
52. Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, Peeper DS. BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene* 2008; **27**(7), 877-895. doi:10.1038/sj.onc.1210704
53. Moretti S, Macchiarulo A, De Falco V, Avenia N, Barbi F, Carta C ve ark. Biochemical and molecular characterization of the novel BRAF(V599Ins) mutation detected in a classic papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 2006; **25**(30), 4235-4240. doi:10.1038/sj.onc.1209448
54. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Máximo V, Silva P, Magalhães J ve ark. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 2004; **202**(2), 247-251. doi:10.1002/path.1511

55. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN ve ark. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 2005; **115**(1), 94-101. doi:10.1172/jci23237
56. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**(4), 295-308. doi:10.1038/nrc2109
57. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**(7), 489-501. doi:10.1038/nrc839
58. García-Rostán G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ ve ark. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res* 2005; **65**(22), 10199-10207. doi:10.1158/0008-5472.Can-04-4259
59. Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S ve ark. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 2007; **13**(4), 1161-1170. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-06-1125
60. Wang Y, Hou P, Yu H, Wang W, Ji M, Zhao S ve ark. High prevalence and mutual exclusivity of genetic alterations in the phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**(6), 2387-2390. doi:10.1210/jc.2006-2019
61. Wu G, Mambo E, Guo Z, Hu S, Huang X, Gollin SM ve ark. Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**(8), 4688-4693. doi:10.1210/jc.2004-2281
62. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**(10), 749-758. doi:10.1038/nrc2723
63. Park MT LS. Cell cycle and cancer. . *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 2003 Jan, 36(31):60-65. . doi:DOI: 10.5483/bmbrep
64. Resnick MB, Schacter P, Finkelstein Y, Kellner Y, Cohen O. Immunohistochemical analysis of p27/kip1 expression in thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 1998; **11**(8), 735-739.
65. Tallini G, Garcia-Rostan G, Herrero A, Zelterman D, Viale G, Bosari S ve ark. Downregulation of p27KIP1 and Ki67/Mib1 labeling index support the classification of thyroid carcinoma into prognostically relevant categories. *Am J Surg Pathol* 1999; **23**(6), 678-685. doi:10.1097/00000478-199906000-00007
66. Khoo ML, Freeman JL, Witterick IJ, Irish JC, Rotstein LE, Gullane PJ ve ark. Underexpression of p27/Kip in thyroid papillary microcarcinomas with gross metastatic disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; **128**(3), 253-257. doi:10.1001/archotol.128.3.253
67. Davies MA, Lu Y, Sano T, Fang X, Tang P, LaPushin R ve ark. Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res* 1998; **58**(23), 5285-5290.
68. Segev DL, Umbricht C, Zeiger MA. Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg Oncol* 2003; **12**(2), 69-90. doi:10.1016/s0960-7404(03)00037-9
69. Alvarez-Nuñez F, Bussaglia E, Mauricio D, Ybarra J, Vilar M, Lerma E ve ark. PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid* 2006; **16**(1), 17-23. doi:10.1089/thy.2006.16.17
70. Frisk T, Foukakis T, Dwight T, Lundberg J, Höög A, Wallin G ve ark. Silencing of the PTEN tumor-suppressor gene in anaplastic thyroid cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; **35**(1), 74-80. doi:10.1002/gcc.10098
71. Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, Strunnikova M, Rastetter M, Baier K ve ark. The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update. *Histol Histopathol* 2005; **20**(2), 645-663. doi:10.14670/hh-20.645

72. Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M, Rastetter M, Seidel C, Liu L ve ark. Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2003; **18**(2), 665-677. doi:10.14670/hh-18.665
73. Schagdarsurengin U, Gimm O, Hoang-Vu C, Dralle H, Pfeifer GP, Dammann R. Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2002; **62**(13), 3698-3701.
74. Xing M, Cohen Y, Mambo E, Tallini G, Udelsman R, Ladenson PW ve ark. Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res* 2004; **64**(5), 1664-1668. doi:10.1158/0008-5472.can-03-3242
75. Alberti L, Carniti C, Miranda C, Roccato E, Pierotti MA. RET and NTRK1 proto-oncogenes in human diseases. *J Cell Physiol* 2003; **195**(2), 168-186. doi:10.1002/jcp.10252
76. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM ve ark. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 2000; **289**(5483), 1357-1360. doi:10.1126/science.289.5483.1357
77. Drieschner N, Belge G, Rippe V, Meiboom M, Loeschke S, Bullerdiek J. Evidence for a 3p25 breakpoint hot spot region in thyroid tumors of follicular origin. *Thyroid* 2006; **16**(11), 1091-1096. doi:10.1089/thy.2006.16.1091
78. Foukakis T, Au AY, Wallin G, Geli J, Forsberg L, Clifton-Bligh R ve ark. The Ras effector NORE1A is suppressed in follicular thyroid carcinomas with a PAX8-PPARgamma fusion. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**(3), 1143-1149. doi:10.1210/jc.2005-1372
79. Rippe V, Drieschner N, Meiboom M, Murua Escobar H, Bonk U, Belge G ve ark. Identification of a gene rearranged by 2p21 aberrations in thyroid adenomas. *Oncogene* 2003; **22**, 6111-6114. doi:10.1038/sj.onc.1206867
80. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S ve ark. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; **102**(52), 19075-19080. doi:10.1073/pnas.0509603102
81. Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G ve ark. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2006; **13**(2), 497-508. doi:10.1677/erc.1.01209
82. Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**(9), 3584-3591. doi:10.1210/jc.2006-0693
83. Hu S, Liu D, Tufano RP, Carson KA, Rosenbaum E, Cohen Y ve ark. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *International Journal of Cancer* 2006; **119**(10), 2322-2329. doi:https://doi.org/10.1002/ijc.22110
84. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Jeronimo C, Mambo E, Westra WH ve ark. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer Res* 2004; **64**(15), 5511-5517. doi:10.1158/0008-5472.Can-04-0799
85. Joseph B, Ji M, Liu D, Hou P, Xing M. Lack of mutations in the thyroid hormone receptor (TR) alpha and beta genes but frequent hypermethylation of the TRbeta gene in differentiated thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**(12), 4766-4770. doi:10.1210/jc.2007-0812

86. Kondo T, Zheng L, Liu W, Kurebayashi J, Asa SL, Ezzat S. Epigenetically controlled fibroblast growth factor receptor 2 signaling imposes on the RAS/BRAF/mitogen-activated protein kinase pathway to modulate thyroid cancer progression. *Cancer Res* 2007; **67**(11), 5461-5470. doi:10.1158/0008-5472.Can-06-4477
87. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006; **7**(8), 606-619. doi:10.1038/nrg1879
88. Stokoe D. The phosphoinositide 3-kinase pathway and cancer. *Expert Rev Mol Med* 2005; **7**(10), 1-22. doi:10.1017/s1462399405009361
89. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; **307**(5712), 1098-1101. doi:10.1126/science.1106148
90. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998; **12**(22), 3499-3511. doi:10.1101/gad.12.22.3499
91. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K ve ark. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002; **8**(10), 1153-1160. doi:10.1038/nm761
92. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001; **3**(3), 245-252. doi:10.1038/35060032
93. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; **273**(22), 13375-13378. doi:10.1074/jbc.273.22.13375
94. Zhou M, Gu L, Findley HW, Jiang R, Woods WG. PTEN reverses MDM2-mediated chemotherapy resistance by interacting with p53 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res* 2003; **63**(19), 6357-6362.
95. Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 2004; **29**(5), 233-242. doi:10.1016/j.tibs.2004.03.006
96. Shinohara M, Chung YJ, Saji M, Ringel MD. AKT in thyroid tumorigenesis and progression. *Endocrinology* 2007; **148**(3), 942-947. doi:10.1210/en.2006-0937
97. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsichlis P, Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* 2002; **277**(42), 39858-39866. doi:10.1074/jbc.M206322200
98. Mitsuuchi Y, Johnson SW, Sonoda G, Tanno S, Golemis EA, Testa JR. Identification of a chromosome 3p14.3-21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2. *Oncogene* 1999; **18**(35), 4891-4898. doi:10.1038/sj.onc.1203080
99. Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, Burch H ve ark. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2001; **61**(16), 6105-6111.
100. Saji M, Ringel MD. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2010; **321**(1), 20-28. doi:10.1016/j.mce.2009.10.016
101. Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid* 2010; **20**(7), 697-706. doi:10.1089/thy.2010.1646

102. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z ve ark. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 1997; **16**(1), 64-67. doi:10.1038/ng0597-64
103. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004; **30**(2), 193-204. doi:10.1016/j.ctrv.2003.07.007
104. Furuya F, Hanover JA, Cheng SY. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone beta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(6), 1780-1785. doi:10.1073/pnas.0510849103
105. Suzuki H, Willingham MC, Cheng SY. Mice with a mutation in the thyroid hormone receptor beta gene spontaneously develop thyroid carcinoma: a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Thyroid* 2002; **12**(11), 963-969. doi:10.1089/105072502320908295
106. Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V ve ark. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet* 2004; **41**(3), 161-170. doi:10.1136/jmg.2003.015339
107. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M ve ark. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res* 2009; **69**(11), 4885-4893. doi:10.1158/0008-5472.Can-09-0727
108. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997; **11**(24), 3286-3305. doi:10.1101/gad.11.24.3286
109. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; **127**(3), 469-480. doi:10.1016/j.cell.2006.10.018
110. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005; **15**(1), 28-32. doi:10.1038/sj.cr.7290260
111. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; **434**(7035), 843-850. doi:10.1038/nature03319
112. Sastre-Perona A, Santisteban P. Role of the wnt pathway in thyroid cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; **3**, 31. doi:10.3389/fendo.2012.00031
113. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 2007; **22**, 303-309. doi:10.1152/physiol.00020.2007
114. Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 2005; **123**(5), 903-915. doi:10.1016/j.cell.2005.09.021
115. Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ, Weis WI. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* 2001; **276**(15), 12301-12309. doi:10.1074/jbc.M010377200
116. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 2008; **27**(55), 6920-6929. doi:10.1038/onc.2008.343
117. Pierceall WE, Woodard AS, Morrow JS, Rimm D, Fearon ER. Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 1995; **11**(7), 1319-1326.
118. Dierick H, Bejsovec A. Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction. *Curr Top Dev Biol* 1999; **43**, 153-190. doi:10.1016/s0070-2153(08)60381-6
119. Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors* 2005; **23**(2), 111-116. doi:10.1080/08977190500125746

120. Nishita M, Enomoto M, Yamagata K, Minami Y. Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. *Trends Cell Biol* 2010; **20**(6), 346-354. doi:10.1016/j.tcb.2010.03.001
121. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 2004; **5**(9), 691-701. doi:10.1038/nrg1427
122. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT ve ark. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; **281**(5382), 1509-1512. doi:10.1126/science.281.5382.1509
123. Kim JS, Crooks H, Dracheva T, Nishanian TG, Singh B, Jen J ve ark. Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res* 2002; **62**(10), 2744-2748.
124. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; **398**(6726), 422-426. doi:10.1038/18884
125. Ha NC, Tonozuka T, Stamos JL, Choi HJ, Weis WI. Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation. *Mol Cell* 2004; **15**(4), 511-521. doi:10.1016/j.molcel.2004.08.010
126. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y ve ark. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; **108**(6), 837-847. doi:10.1016/s0092-8674(02)00685-2
127. Liu J, Bang AG, Kintner C, Orth AP, Chanda SK, Ding S ve ark. Identification of the Wnt signaling activator leucine-rich repeat in Flightless interaction protein 2 by a genome-wide functional analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(6), 1927-1932. doi:10.1073/pnas.0409472102
128. Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* 2005; **12**(4), 364-371. doi:10.1038/nsmb912
129. Cliffe A, Hamada F, Bienz M. A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr Biol* 2003; **13**(11), 960-966. doi:10.1016/s0960-9822(03)00370-1
130. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, 3rd, Flynn C ve ark. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 2001; **7**(4), 801-809. doi:10.1016/s1097-2765(01)00224-6
131. Cong F, Schweizer L, Chamorro M, Varmus H. Requirement for a nuclear function of beta-catenin in Wnt signaling. *Mol Cell Biol* 2003; **23**(23), 8462-8470. doi:10.1128/mcb.23.23.8462-8470.2003
132. van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J ve ark. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell* 1997; **88**(6), 789-799. doi:10.1016/s0092-8674(00)81925-x
133. van de Wetering M, Oosterwegel M, Dooijes D, Clevers H. Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *Embo j* 1991; **10**(1), 123-132.
134. Boxer LM, Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 2001; **20**(40), 5595-5610. doi:10.1038/sj.onc.1204595
135. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; **19**(1), 1-11. doi:10.1128/mcb.19.1.1
136. Sheiness D, Fanshier L, Bishop JM. Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol* 1978; **28**(2), 600-610. doi:10.1128/jvi.28.2.600-610.1978

137. Yang J, Zhang W, Evans PM, Chen X, He X, Liu C. Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2006; **281**(26), 17751-17757. doi:10.1074/jbc.M600831200
138. Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 2006; **16**(4), 253-264. doi:10.1016/j.semcancer.2006.07.014
139. Kim T, Jeon YJ, Cui R, Lee JH, Peng Y, Kim SH ve ark. Role of MYC-regulated long noncoding RNAs in cell cycle regulation and tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* 2015; **107**(4). doi:10.1093/jnci/dju505
140. Xiang JF, Yang L, Chen LL. The long noncoding RNA regulation at the MYC locus. *Curr Opin Genet Dev* 2015; **33**, 41-48. doi:10.1016/j.gde.2015.07.001
141. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993; **7**(5), 812-821. doi:10.1101/gad.7.5.812
142. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R ve ark. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(10), 5522-5527. doi:10.1073/pnas.96.10.5522
143. Bates S, Bonetta L, MacAllan D, Parry D, Holder A, Dickson C ve ark. CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* 1994; **9**(1), 71-79.
144. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; **17**(1), 45-51. doi:10.1016/j.gde.2006.12.007
145. Kraus C, Liehr T, Hülsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH ve ark. Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* 1994; **23**(1), 272-274. doi:10.1006/geno.1994.1493
146. van Hengel J, Nollet F, Berx G, van Roy N, Speleman F, van Roy F. Assignment of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p22-->p21.3 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1995; **70**(1-2), 68-70. doi:10.1159/000133994
147. Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol* 2001; **158**(3), 987-996. doi:10.1016/s0002-9440(10)64045-x
148. Miyake N, Maeta H, Horie S, Kitamura Y, Nanba E, Kobayashi K ve ark. Absence of mutations in the beta-catenin and adenomatous polyposis coli genes in papillary and follicular thyroid carcinomas. *Pathol Int* 2001; **51**(9), 680-685. doi:10.1046/j.1440-1827.2001.01269.x
149. Lu C, Zhu X, Willingham MC, Cheng SY. Activation of tumor cell proliferation by thyroid hormone in a mouse model of follicular thyroid carcinoma. *Oncogene* 2012; **31**(16), 2007-2016. doi:10.1038/onc.2011.390
150. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995; **378**(6559), 785-789. doi:10.1038/378785a0
151. Darnell JE, Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**(10), 740-749. doi:10.1038/nrc906
152. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; **411**(6835), 355-365. doi:10.1038/35077225

153. Grimm D, Bauer J, Wise P, Krüger M, Simonsen U, Wehland M ve ark. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 2020; **67**, 122-153. doi:https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.03.004
154. Grosschedl R, Giese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet* 1994; **10**(3), 94-100. doi:10.1016/0168-9525(94)90232-1
155. Laudet V, Stehelin D, Clevers H. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**(10), 2493-2501. doi:10.1093/nar/21.10.2493
156. Soullier S, Jay P, Poulat F, Vanacker JM, Berta P, Laudet V. Diversification pattern of the HMG and SOX family members during evolution. *J Mol Evol* 1999; **48**(5), 517-527. doi:10.1007/pl00006495
157. Zhu Y, Li Y, Jun Wei JW, Liu X. The role of Sox genes in lung morphogenesis and cancer. *Int J Mol Sci* 2012; **13**(12), 15767-15783. doi:10.3390/ijms131215767
158. Castillo SD, Sanchez-Cespedes M. The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012; **16**(9), 903-919. doi:10.1517/14728222.2012.709239
159. Koopman P. Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci* 1999; **55**(6-7), 839-856. doi:10.1007/pl00013200
160. Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 2000; **227**(2), 239-255. doi:10.1006/dbio.2000.9883
161. Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**(6), 1409-1420. doi:10.1093/nar/27.6.1409
162. Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**(8), 1500-1501. doi:10.1093/nar/22.8.1500
163. Hu J, Li K, Li Z, Gao C, Guo F, Wang Y ve ark. Sex-determining region Y box-containing genes: regulators and biomarkers in gynecological cancers. *Cancer Biol Med* 2019; **16**(3), 462-474. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0062
164. Thu KL, Becker-Santos DD, Radulovich N, Pikor LA, Lam WL, Tsao MS. SOX15 and other SOX family members are important mediators of tumorigenesis in multiple cancer types. *Oncoscience* 2014; **1**(5), 326-335. doi:10.18632/oncoscience.46
165. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG ve ark. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 2009; **41**(11), 1238-1242. doi:10.1038/ng.465
166. Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS ve ark. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet* 2012; **44**(10), 1111-1116. doi:10.1038/ng.2405
167. Stovall DB, Cao P, Sui G. SOX7: from a developmental regulator to an emerging tumor suppressor. *Histol Histopathol* 2014; **29**(4), 439-445. doi:10.14670/hh-29.10.439
168. Stovall DB, Wan M, Miller LD, Cao P, Maglic D, Zhang Q ve ark. The regulation of SOX7 and its tumor suppressive role in breast cancer. *Am J Pathol* 2013; **183**(5), 1645-1653. doi:10.1016/j.ajpath.2013.07.025
169. Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y. SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer* 2008; **98**(4), 824-831. doi:10.1038/sj.bjc.6604193
170. Passeron T, Valencia JC, Namiki T, Vieira WD, Passeron H, Miyamura Y ve ark. Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores

their sensitivity to retinoic acid. *J Clin Invest* 2009; **119**(4), 954-963. doi:10.1172/jci34015
171. *GeneCards®: The Human Gene Database*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 24.02.2021, Erişim site adı: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOX15&keywords=sox15
172. *Ensembl*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 26.04.2021, Erişim site adı: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/TranscriptComparison?db=core;g=ENSG00000129194;r=17:7588178-7590094
173. Vujić M, Rajić T, Goodfellow PN, Stevanović M. cDNA characterization and high resolution mapping of the human SOX20 gene. *Mammalian Genome* 1998; **9**(12), 1059-1061. doi:10.1007/s003359900925
174. *UniProt Consortium* [web page on the internet] Erişim Tarihi 26.04.2021, Erişim site adı: https://www.uniprot.org/uniprot/O60248
175. *STRING CONSORTIUM 2020*. [web page on the internet] Erişim Tarihi 26.04.2021, Erişim site adı: https://string-db.org/cgi/network?taskId=bnvL3TJdrAcQ&sessionId=bUjvDwABLQK4
176. Yamada K, Kanda H, Tanaka S, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. Sox15 enhances trophoblast giant cell differentiation induced by Hand1 in mouse placenta. *Differentiation* 2006; **74**(5), 212-221. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00070.x
177. Kumar P, Mistri TK. Transcription factors in SOX family: Potent regulators for cancer initiation and development in the human body. *Semin Cancer Biol* 2020; **67**(Pt 1), 105-113. doi:10.1016/j.semcancer.2019.06.016
178. Pacini S, Carnicelli V, Trombi L, Montali M, Fazzi R, Lazzarini E ve ark. Constitutive expression of pluripotency-associated genes in mesodermal progenitor cells (MPCs). *PLoS One* 2010; **5**(3), e9861. doi:10.1371/journal.pone.0009861
179. Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E ve ark. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One* 2010; **5**(9), e13017. doi:10.1371/journal.pone.0013017
180. Thu KL, Radulovich N, Becker-Santos DD, Pikor LA, Pusic A, Lockwood WW ve ark. SOX15 is a candidate tumor suppressor in pancreatic cancer with a potential role in Wnt/β-catenin signaling. *Oncogene* 2014; **33**(3), 279-288. doi:10.1038/onc.2012.595
181. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; **3**(6), 1101-1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
182. Zhang M, Wang J, Gao T, Chen X, Xu Y, Yu X ve ark. Inhibition of SOX15 Sensitizes Esophageal Squamous Carcinoma Cells to Paclitaxel. *Curr Mol Med* 2019; **19**(5), 349-356. doi:10.2174/1566524019666190405121139
183. Yan HT, Shinka T, Sato Y, Yang XJ, Chen G, Sakamoto K ve ark. Overexpression of SOX15 inhibits proliferation of NT2/D1 cells derived from a testicular embryonal cell carcinoma. *Mol Cells* 2007; **24**(3), 323-328.
184. Thu KL, Radulovich N, Becker-Santos DD, Pikor LA, Pusic A, Lockwood WW ve ark. SOX15 is a candidate tumor suppressor in pancreatic cancer with a potential role in Wnt/β-catenin signaling. *Oncogene* 2014; **33**(3), 279-288. doi:10.1038/onc.2012.595
185. Wang S, Yang H, Chen X, Jiang Z. Effects of SOX15 on the colorectal cancer cells via downregulation of the Wnt/β-catenin signaling pathway. *Future Oncol* 2018; **14**(19), 1921-1932. doi:10.2217/fon-2017-0688
186. Rui X, Xu Y, Jiang X, Guo C, Jiang J. SOX15 regulates proliferation and migration of endometrial cancer cells. *Biosci Rep* 2017; **37**(5). doi:10.1042/bsr20171045

187. Zhang D, Guo S, Wang H, Hu Y. SOX15 exerts antitumor function in glioma by inhibiting cell proliferation and invasion via downregulation of Wnt/β-catenin signaling. *Life Sci* 2020; **255**, 117792. doi:10.1016/j.lfs.2020.117792
188. Xu C, Liu J, Yao X, Bai Y, Zhao Q, Zhao R ve ark. Downregulation of microR-147b represses the proliferation and invasion of thyroid carcinoma cells by inhibiting Wnt/β-catenin signaling via targeting SOX15. *Mol Cell Endocrinol* 2020; **501**, 110662. doi:10.1016/j.mce.2019.110662
189. Dong C, Wilhelm D, Koopman P. Sox genes and cancer. *Cytogenet Genome Res* 2004; **105**(2-4), 442-447. doi:10.1159/000078217
190. Dickinson ME, McMahon AP. The role of Wnt genes in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 1992; **2**(4), 562-566. doi:10.1016/s0959-437x(05)80172-8
191. Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol* 2007; **19**(2), 150-158. doi:10.1016/j.ceb.2007.02.007
192. Gough NR. Focus issue: Wnt and β-catenin signaling in development and disease. *Sci Signal* 2012; **5**(206), eg2. doi:10.1126/scisignal.2002806
193. Bernard P, Harley VR. Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; **42**(3), 400-410. doi:10.1016/j.biocel.2009.10.017
194. Baudino TA, McKay C, Pendeville-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL ve ark. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* 2002; **16**(19), 2530-2543. doi:10.1101/gad.1024602
195. Qu A, Jiang C, Cai Y, Kim JH, Tanaka N, Ward JM ve ark. Role of Myc in hepatocellular proliferation and hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2014; **60**(2), 331-338. doi:10.1016/j.jhep.2013.09.024
196. Gamberi G, Benassi MS, Böhling T, Ragazzini P, Molendini L, Sollazzo MR ve ark. Prognostic relevance of C-myc gene expression in giant-cell tumor of bone. *J Orthop Res* 1998; **16**(1), 1-7. doi:10.1002/jor.1100160102
197. Guo Y, Li H, Guan H, Ke W, Liang W, Xiao H ve ark. Dermatopontin inhibits papillary thyroid cancer cell proliferation through MYC repression. *Mol Cell Endocrinol* 2019; **480**, 122-132. doi:10.1016/j.mce.2018.10.021
198. Sakr HI, Chute DJ, Nasr C, Sturgis CD. cMYC expression in thyroid follicular cell-derived carcinomas: a role in thyroid tumorigenesis. *Diagn Pathol* 2017; **12**(1), 71. doi:10.1186/s13000-017-0661-0
199. Sanjari M, Kordestani Z, Safavi M, Mashrouteh M, FekriSoofiAbadi M, Ghaseminejad Tafreshi A. Enhanced expression of Cyclin D1 and C-myc, a prognostic factor and possible mechanism for recurrence of papillary thyroid carcinoma. *Sci Rep* 2020; **10**(1), 5100. doi:10.1038/s41598-020-61985-1
200. Seybt TP, Ramalingam P, Huang J, Looney SW, Reid MD. Cyclin D1 expression in benign and differentiated malignant tumors of the thyroid gland: diagnostic and biologic implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; **20**(2), 124-130. doi:10.1097/pai.0b013e31822d4783
201. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996; **68**, 67-108. doi:10.1016/s0065-230x(08)60352-8
202. Bièche I, Franc B, Vidaud D, Vidaud M, Lidereau R. Analyses of MYC, ERBB2, and CCND1 genes in benign and malignant thyroid follicular cell tumors by real-time polymerase chain reaction. *Thyroid* 2001; **11**(2), 147-152. doi:10.1089/105072501300042802

203. Jeon S, Kim Y, Jeong YM, Bae JS, Jung CK. CCND1 Splice Variant as A Novel Diagnostic and Predictive Biomarker for Thyroid Cancer. *Cancers (Basel)* 2018; **10**(11). doi:10.3390/cancers10110437
204. Lamba Saini M, Weynand B, Rahier J, Mourad M, Hamoir M, Marbaix E. Cyclin D1 in well differentiated thyroid tumour of uncertain malignant potential. *Diagn Pathol* 2015; **10**, 32. doi:10.1186/s13000-015-0262-8
205. Liang W, Sun F. Identification of key genes of papillary thyroid cancer using integrated bioinformatics analysis. *J Endocrinol Invest* 2018; **41**(10), 1237-1245. doi:10.1007/s40618-018-0859-3
206. Lee SH, Lee JK, Jin SM, Lee KC, Sohn JH, Chae SW ve ark. Expression of cell-cycle regulators (cyclin D1, cyclin E, p27kip1, p57kip2) in papillary thyroid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; **142**(3), 332-337. doi:10.1016/j.otohns.2009.10.050
207. Wang S, Lloyd RV, Hutzler MJ, Safran MS, Patwardhan NA, Khan A. The role of cell cycle regulatory protein, cyclin D1, in the progression of thyroid cancer. *Mod Pathol* 2000; **13**(8), 882-887. doi:10.1038/modpathol.3880157
208. Body S, Esteve-Arenys A, Miloudi H, Recasens-Zorzo C, Tchakarska G, Moros A ve ark. Cytoplasmic cyclin D1 controls the migration and invasiveness of mantle lymphoma cells. *Sci Rep* 2017; **7**(1), 13946. doi:10.1038/s41598-017-14222-1
209. Fusté NP, Castelblanco E, Felip I, Santacana M, Fernández-Hernández R, Gatius S ve ark. Characterization of cytoplasmic cyclin D1 as a marker of invasiveness in cancer. *Oncotarget* 2016; **7**(19), 26979-26991. doi:10.18632/oncotarget.8876
210. Fusté NP, Fernández-Hernández R, Cemeli T, Mirantes C, Pedraza N, Rafel M ve ark. Cytoplasmic cyclin D1 regulates cell invasion and metastasis through the phosphorylation of paxillin. *Nat Commun* 2016; **7**, 11581. doi:10.1038/ncomms11581
211. Motti ML, Califano D, Troncone G, De Marco C, Migliaccio I, Palmieri E ve ark. Complex regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in thyroid cancer cells by the PI3K/AKT pathway: regulation of p27kip1 expression and localization. *Am J Pathol* 2005; **166**(3), 737-749. doi:10.1016/s0002-9440(10)62295-x
212. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med* 2014; **46**(6), 372-383. doi:10.3109/07853890.2014.912836
213. Krześlak A, Pomorski L, Lipińska A. Expression, localization, and phosphorylation of Akt1 in benign and malignant thyroid lesions. *Endocr Pathol* 2011; **22**(4), 206-211. doi:10.1007/s12022-011-9177-4

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SOX15'İN TİROİD KANSERİ HÜCRE HATTINDA WNT/B-KATENİN VE PI3K/AKT YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%11	%8	%3	%6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%2
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
5	Submitted to Istanbul Aydin University Öğrenci Ödevi	%1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
7	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Ataturk Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Koseoglu H, Celebi A, **Galamiyeva G**, Dalay N, Ozkardes H, Buyru N. No Tumor Suppressor Role for LKB1 in Prostate Cancer. DNA Cell Biol. 2021 Sep;40(9):1222-1229. doi: 10.1089/dna.2021.0274. Epub 2021 Aug 7. PMID: 34370601.

Orhan C, **Galamiyeva G**, Arıkan S, Buyru N. (2019), "Tiroid kanserli hastalarda VGLL3 geninin araştırılması" 16. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Uluslar arası Katılımlı, 27-30 Ekim 2019, Bodrum (Poster).