T.C.

DOKUZ EYLÜL
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

KOLOREKTAL KANSERLERDE METASTATİK FENOTİPİN GÖSTERGESİ OLARAK SİALİLTRANSFERAZLARIN ROLÜ VE KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ

SEZEN KORKUT

TEMEL ONKOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2017

DEU.HSI.MSC.2012970158

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLOREKTAL KANSERLERDE METASTATİK FENOTİPİN GÖSTERGESİ OLARAK SİALİLTRANSFERAZLARIN ROLÜ VE KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ

TEMEL ONKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEZEN KORKUT

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. İlhan Öztop

DEU.HSI.MSC.2012970158

(Bu arastırma DEÜ Bilimsel Arastırma Projeleri Sube Müdürlüğü tarafından 2015.KB.SAG.017 sayılı proje ile desteklenmiştir.)

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Yüksek Lisans Programı öğrencisi Sezen Korkut'un "Kolorektal Kanserlerde Metastatik Fenotipin Göstergesi Olarak Sialiltransferazların Rolü ve Klinikopatolojik Özellikleri" isimli yüksek lisans tezi ...14.07.2017..... tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

JÜRİ BASKANI

Prof.Dr.İlhan ÖZTOP

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Nur Olgun

Prof.Dr. Hülya Ellidokuz

Prof. Dr. Yasemin Baskın

Prof.Dr. Kemal ERGİN

(Yedek Üye: Prof.Dr. Işıl Somalı)

(Yedek Üye: Prof.Dr. Erdem Göker)

İÇİNDEKİLER

1 GİRİŞ ..... - 4 -
1.1 Problemin Tanımı Ve Önemi ..... - 4 -
1.2 Araştırmanın Amacı ..... - 5 -
1.3 Araştırmanın Hipotezi ..... - 6 -
2 GENEL BİLGİLER ..... - 7 -
2.1 Kolorektal Kanserlerin Epidemiyolojisi Ve İnsidansı: ..... - 7 -
2.2 Kolorektal Kanser İlişkili Gen Değişimleri ..... - 9 -
2.2.1 Adenoma-Karsinoma Düzeni ..... - 10 -
2.3 SİALİK ASİT ..... - 13 -
2.3.1 Glikokaliks ve Glikan Yapılar: ..... - 13 -
2.3.2 Sialik Asit ..... - 20 -
2.3.3 Sialil Transferazlar ..... - 24 -
2.3.4 Kolon ve Rektum Kanserlerinde Glikozilasyon Değişimleri ..... - 34 -
2.4 KANSER HÜCRESİNİN METASTAZI ..... - 37 -
2.4.1 Kolorektal Kanser ve Metastaz ..... - 38 -
3 GEREÇ VE YÖNTEM ..... - 43 -
3.1 Araştırmanın Tipi ..... - 43 -
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı ..... - 43 -
3.3 Araştırmanın Evreni Ve Örneklemi/ Çalışma Grupları ..... - 43 -
3.4 Çalışma Materyali ..... - 43 -
3.4.1 Parafine Gömülü Doku Örneklerinden Total RNA İzolasyonu ..... - 44 -
3.4.2 RNA İzolasyon Protokolü ..... - 44 -
3.4.3 RNA'nın Miktarının Belirlenmesi ..... - 45 -
3.4.4 cDNA Elde Edilmesi ..... - 46 -
3.4.5 Multiplex PCR ARRAY ..... - 46 -
3.4.6 Q-RT-PCR Uygulaması ..... - 47 -
3.5 Araştımanın Değişkenleri ..... - 48 -
3.6 Veri Toplama Araçları ..... - 48 -
3.7 Araştırma Planı Ve Takvimi ..... - 49 -
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi ..... - 49 -
3.9 Çalışmadaki Güçlük Ve Sınırlıklar ..... - 49 -
4 BULGULAR ..... - 51 -
4.1 Demografik Veriler ..... - 51 -
4.2 Sağ Kalım Analizleri ..... - 53 -
4.3 Total RNA Eldesi ve Değerlendirilmesi ..... - 54 -
4.4 Sialil Transferaz Ekspresyon Sonuçları ..... - 57 -
4.5 Normal Kolon Mukozası Ve Primer Tümör Dokusunun Karşılaştırılması ..... - 60 -
4.6 Karaciğer Metastaz Dokusu İle Normal Mukoza Karşılaştırılması ..... - 60 -
4.7 Peritonel Karsinamatoz Metastazları Normal Mukozaya Göre Karşılaştırılması ..... - 60 -
4.8 Karaciğer Metastazlarının Primer Tümörle Karşılaştırılması ..... - 60 -
4.9 Peritoneal Karsinamatoz Metastaz Dokusunun Primer Tümörle Karşılaştırılması ..... - 61 -

4.10 Peritoneal karsinamatoz Metastazları İle Karaciğer Metastazlarının Karşılaştırılması ..... - 61 -
5 TARTIŞMA ..... - 63 -
6 SONUÇ VE ÖNERİLER ..... - 69 -
7 KAYNAKLAR ..... - 71 -
8 EKLER ..... - 84 -
8.1 Etik Kurul Onayı ..... - 84 -
8.2 Özgeçmiş ..... - 86 -
8.3 EK-3 ..... - 87 -
8.4 TEZ KODU: DEU.HSI.MSC.2012970158 ..... - 87 -

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Dünya Üzerinde Yaşa Bağlı(ASR) KRK İnsidansı[20] ..... - 8 -

Tablo 2: Kolorektal Kanserlerde Meydana Gelen Onkogen ve Tümör Süpresör Gen Değişimleri ..... - 11 -

Tablo 3:Sialil Transferazların Sembolleri, Enzim İsimleri, Kromozom Lokasyonları, Gen ID'leri ..... - 25 -

Tablo 4: Kolorektal Kanserlerin Karaciğer ve Peritoneal Karsinamotoz Metastazlarının Karşılaştırılması ..... - 42 -

Tablo 5: Çalışma Şeması ..... - 49 -

Tablo 6:Olguların Cinsiyete Göre Dağılımı ..... - 51 -

Tablo 7: Olguların 50 Yaş Üstü ve Altı Gruba Göre Dağılımı ..... - 52 -

Tablo 8: Primer Tümör Yerleşim Yerine Göre Dağılım ..... - 52 -

Tablo 9:Primer Kanser Hücre Tipine Göre Dağılım ..... - 53 -

Tablo 10: Olguların Metastaz Yerine Göre Dağılımı ..... - 53 -

Tablo 11: Tüm Grubun Sağ Kalım Eğrisi ..... - 54 -

Tablo 12: Karaciğer ve PK Metastazı Olan Hastaları Sağ Kalımının Karşılaştırılması .... - 54 -

Tablo 13: Total RNA Kalite Kontrolünün Spektro-Fotometrik Ölçümleri ..... - 55 -

Tablo 14: cDNA'ların kalite kontrolünün Spektro-Fotometrik Ölçümü ..... - 56 -

Tablo 15: β-aktin House Keeping Genine Göre Delta Ct değerleri ..... - 57 -

Tablo 16: ST3GAL2, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2'nin Q-RT-PCR ile Değerlendirilmesi ve β-aktin House Keeping Genle Karşılaştırılması ..... - 58 -

Tablo 17: Olgu Gruplarında; Normal Mukoza, Primer Doku, Karaciğer Metastaz Dokusu, Periton Metastaz Dokusu ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2 Sialil Transferazların Ekspresyon Düzeyleri(Ct Value) .....- 59 -

Tablo 18: Olguların Normal Mukoza Primer Tümör Dokusu Karaciğer Metastaz Dokusu Ve Periton Metastaz Dokusu Sialil Transferaz Düzeylerinin House Keepinb Beta Aktine Göre Düzeltilmiş Değerleri.....- 59 -

Tablo 19:Peritonel Karsinomatoz Metastaz Dokısu ile Karaciğer Metastaz Dokusunda ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2 Sialil Transferazların Karşılaştırılması ..- 61 -

Tablo 20: Kolon Primer Dokusunda Normal Mukozada Karaciğer Metastaz Dokusunda ve PK Dokusunda ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2'nin Ekspresyon Seviyelerinin Grafiği.....- 62 -

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1:Gen ve büyüme faktörleriyle etkileşen koloerektal karsinogenez .....- 10 -

Şekil 2: Sialik Asit Yapısı .....- 13 -

Şekil 3: Kolon Mikrovillüs Hücrelerinin Glikokaliksinin Elektron Mikroskobu İle Görüntülenmesi.....- 14 -

Şekil 4Hücre Yüzey Glikanlarının Modifiyesi.....- 16 -

Şekil 5: N-Bağlı Oligosakkaritlerin Sentezi.....- 17 -

Şekil 6:Mgat5 Gen Ürünleri.....- 18 -

Şekil 7Kanser Hücresinde Trunkat Sentezlenme .....- 19 -

Şekil 8:NANA, NAGA veKDN'nin Moleküler Yapısı ve Elde Edilişleri .....- 21 -

Şekil 9: Memelilerde Sialik Asit Metabolizması.....- 24 -

Şekil 10: ST6GAL1 ve ST6GAL2'nin Korunmuş Bölgeleri ve Ekzon Uzunlukları..- 30 -

Şekil 11: Multipleks Array PCR Kullanımı .....- 47 -

Şekil 12:RT-PCR Protokolü.....- 48 -

Şekil 13:Elde Edilen RNA'lar %1'lik Agaroz Jelde Yürütülmüştür(100V ve 1X TBE buffer içerisinde).....- 55 -

Şekil 14: Elde Edilen cDNA'lar %1'lik Agaroz Jelde yürütülmüştür(100V 1X TBE bufer içerisinde) .....- 56 -

KISALTMALAR

Sia: Sialik Asitler

Neu5Ac,NANA: N-asetilnöraminik asit

Neu5Gc, NAGA: N-glikolilnöraminik asit

KDN: Deaminonöraminik Asitin (; 2-keto-3-deoksi-D-glisero-D-galaktononurosonik asit)

Ser: Serin

Thr: Theronin

Asp: asparaginin

MGAT5: Transferaz Mannosidaz Asetil Glukozamin Transferaz 5 Geni

GnT-V: N-Acetylglucosaminyl Transferase V

NRSF: Neuron-Restrictive Silencer Factor

PK: Peritoneal Karsinmatoz

EKMT: Epidermal Mezenşimal Dönüşüm

MMR: Yanlış Eşleşme Tamir Sistemi

BER: Baz Çıkarma Tamir Sistemi

Gİ: Gastro İntestinal

KRK: Kolorektal Kanser

ST3GAL1: ST3 Beta-Galaktosidaz A2,3- Sialiltransferaz 1

ST3GAL2: ST3 Beta-Galaktosidaz A2,3- Sialiltransferaz 2

ST6GAL1: ST6 Beta-Galactoside Alpha-2,6-Sialyltransferase 1

ST6GAL2: ST6 Beta-Galactoside Alpha-2,6-Sialyltransferase 2

TEŞEKKÜRLER

Çalışmalarımız sırasında bizlere uygun ortamı sağlayıp, bilimsel bilgisini aktarmanın yanı sıra ilgi ve sevgisini de aktarmaktan çekinmeyen Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz Prof.Dr.Nur OLGUN'a

Tez projemin planlanması, yürütülmesi ve yazım aşamasında bilimsel görüşlerini esirgemeyip, eğitim süremde doğruyu öğrenmem için bana değerli vaktini ayıran Prof.Dr.İlhan ÖZTOP'a.

Tezimin en başından sonuna kadar her türlü desteği veren ve bu dönemdeki her sorunuma sabırla beni dinleyip, çözüm yolları bulmamda çok büyük destek olan Prof.Dr.Yasemin BASKIN'a,

Tezimin istatistiksel analizlerinin yapılmasındaki değerli katkılarının yanı sıra her zaman danışabileceğim ve her sıkıntımda yanımda olan Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ'a,

Çalışmanın en başından beri bana destek veren ve her türlü bilimsel yardımı esirgemeyen Prof.Dr. Mehmet FÜZÜN'e, Prof.Dr. Selman SÖKMEN'e, Prof.Dr. Cem TERZİ'ye ve Doç.Dr.Emre CANDA'ya,

Olguların seçimi sırasında kişisel arşivlerini açıp olgu örneklerinin alınmasında gösterdiği yardımlarından dolayı Prof.Dr.Özgül SAĞOL ve Doç.Dr.Şadiye Mehtat ÜNLÜ'ye,

Çalışmalarımda ve eğitimimde, gösterdikleri yakın ilgi ve destekleri için Temel Onkoloji ABD öğretim üyelerine,

Tezim sırasında benden önce aynı basamaklardan geçmiş, hem bir arkadaş hem de bir destek olarak Phd.Gizem ÇALIBAŞI'na

Her türlü sorumda bilgilerini ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen Onkoloji Enstitüsü İdari Personeline,

Yüksek Lisans Eğitim süremde bana idari olarak her olanağı sunan Suzan GÖÇEREN'e

Tüm çalışmalarım ve sıkıntılarım boyunca her şekilde yanımda olduklarını hissettiren Aileme ve arkadaşlarıma

Teşekkürlerimi bir borç biliyorum

Sezen KORKUT

KOLOREKTAL KANSERLERDE METASTATİK FENOTİPİN GÖSTERGESİ OLARAK SİALİLTRANSFERAZLARIN ROLÜ VE KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Sezen KORKUT
Onkoloji Enstitüsü
sezen.korkut@deu.edu.tr

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda, hücrenin biyolojik kimliklenmesinin önemli moleküllerinden biri olan ve hücre yüzeyinde bulunan sialik asitlerin metabolizmasını yöneten sialil transferazların kolon ve rektum kanserli olgularda metastatik fenotipin belirlenmesindeki rolü ve metastaz hedefi organın seçilmesindeki fonksiyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda; 2004-2014 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi'nde kolon ve rektum kanseri tanıları ile ameliyat edilmiş, peritoneal karsinomatoz ve/veya karaciğer metastazı bulunan olgular değerlendirildi, olguların parafine gömülü patolojik doku örneklerinin RNA izolasyonu yapıldıktan sonra sialil transferaz ekspresyonu *Multipleks PCR Array* yöntemi ile belirlendi ve *RT-PCR* yöntemi ile doğrulandı.

Bulgular: Karşılaştırmalı analizlerde ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2'gen ekspresyonları peritoneal karsinomatozda artmış olarak bulunurken, aynı enzimler karaciğer metastazında azalmıştır. Primer tümörde normal mukoza ile karşılaştırıldığında ST6GAL1, ST3GAL1 ve ST3GAL2 ekspresyon seviyeleri artmıştır (fold change 1.65; p=0.038 Mann Whitney U Test). PK metastazlarında normal mukozaya göre (fold change1.87; p=0.028) ST3G2 ekspresyon artışı istatistiksel olarak anlamlıdır. Hastanın primer tümörüyle karşılaştırıldığında ST6GAL1 artışı (fold change 12.48; p=0.016) istatistiksel olarak anlamlıdır. Olguların karaciğer ve peritonel metastazları karşılaştırıldığında, peritonel karsinomatozada karaciğer metastazına göre ST3GAL1 (fold change 12,53; p=0.029), ST6GAL1 (fold change 4.52; p=0.029) istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. ST3GAL2 (p=0.057) artışı için örnek azlığı nedeniyle sınırda anlamlılık bulunmaktadır.

Sonuç: Kolorektal kanserlerde peritoneal metastazda ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2 ekspresyon seviyeleri artış gösterir. Kolorektal kanserlerin karaciğer metastazında ST3GAL1, ST3GAL2 ve ST6GAL1 ekspresyon seviyeleri azalır.

Anahtar Sözcükler: Kolorektal kanser, peritoneal karsinomatoza metastazı, karaciğer metastazı, sialik asit, sialil transferaz, ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1, ST6GAL2, glikobiyoloji

.

THE ROLE OF SIALYL TRANSFERASES AS INDICATOR OF METASTATIC PHENOTYPE AND CLINICOPATHOLOGIC PROPERTIES IN COLORECTAL CANCER

Objective: In our study we aimed to evaluate the role of sialyl transferases which are important molecules to maintain of sialic acid metabolism, in the determination of metastatic phenotype and determination of the function of selecting the metastasis target organ.

Method: In this study, the expression of sialyl transferases was analyzed with multiplex PCR array methods in paraffine embedded pathological tissue samples of 26 colon and rectal cancer patients with peritoneal carcinomatosis and/or liver metastases and who had undergone surgery in Dokuz Eylul University Hospital between 2004 and 2014 years.

Results: In comparative analysis the expression levels of ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 and ST6GAL2 enzymes were upregulated at peritoneal carcinomatosis while those were down regulated at liver metastases. Compared with normal mucosa the expression levels of ST6GAL1, ST3GAL1 and ST3GAL2 leves were upregulated in primary tumor (fold change 1.65; p=0.038 Mann Whitney U Test), and ST3GAL2 level was upregulated in peritoneal carcinomatosis (fold change1.87; p=0.028). While peritoneal carcinomatosis and liver metastases were compared, the expression levels of ST6GAL1 (fold change 4.52; p=0.029) and ST3GAL1 (fold change 12,53; p=0.029) were upregulated in peritoneal carcinomatosis statistically significant, but the increase of ST3GAL2 (p=0.057) upregulation was not statistically significant due to limited number of cases.

Conclusion: ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 and ST6GAL2 expression levels increase in peritoneal metastases in colorectal cancers. Expression levels of ST3GAL1, ST3GAL2 and ST6GAL1 are reduced in liver metastasis of colorectal cancers

Key words: Colorectal Cancer, Peritoneal Carcinomatosis, liver metastasis, sialic acid, sialyl transferase, ST6GAL1, ST6GAL2, ST3GAL1, ST3GAL2, glycobiology.

1 GİRİŞ

1.1 Problemin Tanımı Ve Önemi

Kanser yaşam boyunca her dört kadından birini ve her üç erkekten birini etkileyen dünya genelinde bir problemdir[1]. Günümüzde kanser dünyadaki sekiz ölümden birinin sebebidir. Global kanser oranı yirminci yüzyılın son otuz yılında ikiye katlanmıştır ve 2030 yılıyla birlikte üç katına çıkarak yirmi milyon üç yüz bin insanın kanser tanısı alacağı ve on üç milyon iki yüz bininin bu hastalık sebebiyle öleceği ön görülmüştür[2]. Kolorektal kanserler (KRK) kanser sebepli ölümlerin ikinci en yaygın nedeni olması nedeniyle başta Orta Avrupa olmak üzere tüm Avrupa'da ciddi bir sağlık riski ortaya çıkarmaktadır[3].

KRK hastalarının yaklaşık olarak % 20'sinde, uzak metastaz görülmektedir[4]. KRK, genellikle hematojenik ve lenfatik yolla yayıldığı için metastaz yerleri çoğunlukla, bölgesel lenf nodları, karaciğer, akciğer ve peritondur. İntestinal venöz drenajın portal sistem ile bağlantısı nedeniyle hematolojik olarak ilk yayılım yeri karaciğer daha sonra akciğer, kemik ve beyin gibi diğer organlardır[5].

Kanser ilişkili ölümlerin yaklaşık olarak % 90'nından sorumlu olan metastaz kanser patogenezinin en az bilinen unsurlarından biridir[6]. Hastaların temel ölüm nedeni metastazla birlikte tümör progresyonudur. Tümör metastazında hücreler, prekursör lezyonlardan histopatolojik olarak özellikte invaziv ve metastatik hastalık meydana getirirler ve bu süreçte epiteliyal mezenşimal dönüşüm (EMT) önemli bir yer teşkil eder[7].

Biyolojik seviyede metastazı anlayabilmek için "invazyon-metastaz kaskadı" nı da kapsayan birbirinden farklı bir seri adımı incelemek büyük bir avantaj sağlayabilir[8, 9]. Bu metastatik kaskad kavramsal olarak düzenlenip basitçe anlatılmak istenirse iki temel basmağa indirgenebilir:

i. Kanser hücresinin primer tümörden fiziksel olarak translokasyonu ve farklı bir dokunun mikroçevresine yerleşmesi
ii. Kolonizasyon[10].

Bu ana hatlar temel alındığında erken dönem teşhis edilen hastalarda dahil olmak üzere var olan kanser hücrelerinin EMT'ye girdiklerinde bulundukları bölgeden translokasyonlarının nasıl gerçekleştiği, fiziksel ayrılmayı nasıl sağladıkları, yeni mikro-

çevrenin belirlenmesinin ön koşullarının neler olduğu, başarılı kolonizasyonun nasıl sağlanabildiği gibi sorulara yanıt bulunması prognostik, prediktif ve terapötik biyobelirteçlerin açığa çıkarılması ile yeni terapötik hedeflere ulaşılmasını sağlama açısından büyük önem taşımaktadır.

Sağlıklı hücrenin kanser hücresine dönüşürken geçirdiği değişimlerden biri de hücre yüzeyinde bulunan proteinlerin glikozilasyon seviyelerindeki değişimdir[11]. Memeli hücrelerinin yüzeylerinde sunulan oligosakkarit yapılar yüksek özgüllükte tanıma olaylarının içinde yer alırlar. Bu oligosakkarit yapılar genellikle sialik asitle sonlanırlar[12]. Farklılaşmış glikozilasyon kanser hücrelerinin karakteristik bir özelliğidir. Sialik asitler primer olarak hücrenin dış membranına yerleşen glikolipid ve glikoproteinlerin indirgenmemiş ucunda bulunurlar. Bu yerleşim diğer hücrelere ve dışsal sinyal moleküllerine kolaylıkla erişebilmeyi ve çevresel değişimlerle karşılaşıldığında çabuk cevap verebilmelerini sağlar. 1960'ların sonlarında kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan sialik asitlerin hücre yüzeyini negatif yükleyerek elektroforetik mobilizasyon sağladığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Özellikle değişmiş sialilasyon invazivlik ve metastazı da içeren malign özelliklerle yakından ilişkilidir[13, 14].

Kolorektal kanser biyolojisini daha iyi anlamak için tümör karakterizasyonunun ve metastazda ortaya çıkan özelliklerinin erken belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Kolorektal kanseri anlamak için genomik ve proteomik deneyler oldukça fazla yapılmakta ve bu deneylerin sonuçlarından oldukça yüksek miktarda veri alınmaktadır. Fakat şu ana kadar klinik kullanılabilir ve doğrulanmış biyobelirteçler yeterli seviyede değildir[15].

Genomik ve proteomik çalışmalara ek olarak yeni geliştirilen alan olarak glikomik kanser araştırmalarında önem kazanmaktadır[16].

1.2 Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada 2004- 2014 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda primer kolorektal tümör tanısı almış ve karaciğer ya da peritoneal metastaz göstermiş olgulardan, olgunun patoloji arşiv materyali yeterli olan 26 olgu çalışmaya alınmıştır. Olguların sialilasyon seviyeleri bilgileri ile histopatolojik özellikleri, metastaz bölgeleri ve klinik bilgileri arasındaki olası ilişkiler tanımlanmaya çalışılmıştır.

1.3 Araştırmanın Hipotezi

Bu çalışmanın hipotezi:

“Kolorektal Kanserlerde sialilasyon seviyeleri ve şekilleri kanser hücresinin metastatik davranışını etkiler”

2 GENEL BİLGİLER

Kolorektal kanserler normal kolon epitelinde adenomdan karsinoma doğru ilerleyen dönüşümlerin sebebi olan genetik ve epigenetik mutasyonların progresif birikimi sonucu gelişir(25) .

Günümüzde kolorektal kanser gelişim sürecinde tanımlanan en önemli değişim, çeşitli mutasyonların yol açtığı kromozomal instabilitedir. Onkogenlerin aktivasyonu veya tümör supressör genlerin inaktivasyonu ile başlayan bu durum adenom-karsinom gelişimiyle tanımlanır.

İlk genetik olay kolon adenomlarının % 80'inde bulunan adenomatöz polipozis koli (*APC*) gen mutasyonudur. Yine adenom-karsinom dönüşümünün başlangıç döneminde erken adenomdan geç adenoma dönüşümde Kristen rat sarkoma viral onkogen homoloğu (*K-ras*) onkogeni mutasyonu rol oynar. Kromozom 18q üzerinde bulunan *SMAD2* ve *SMAD4* bölge mutasyonları ve kromozom 17p üzerinde bulunan tümör protein *p53* geni(*TP53*) mutasyonları geç adenomdan karsinoma dönüşüme yol açmaktadır[17, 18]

2.1 Kolorektal Kanserlerin Epidemiyolojisi Ve İnsidansı:

KRK, prostat ve akciğer kanserlerinden sonra erkeklerde en sık rastlanan üçüncü kanser ve meme kanserinden sonra kadınlarda en çok görülen ikinci kanserdir. Ayrıca kadın ve erkeklerde dünya genelinde ölümlerin üçüncü sebebidir. Kanserle ilgili ölümler birlikte değerlendirildiğinde her iki cinsiyetti kapsayan en yaygın ikinci ölüm sebebidir. KRK kanser ilişkili ölümlerin yaklaşık olarak % 10'nunu temsil etmektedir. KRK insidansı günümüzde 45-50 yaşa düşmüştür. Progresyonu kadınlara göre erkeklerde yaşla birlikte artmaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde 2009 yılında yetmiş bin iki yüz yirmi üçü erkek, atmış altı bin dört yüz doksan dördü kadın olmak üzere yüz otuz altı bin yedi yüz on yedi kişi ve 2013 yılında yüz kırk iki bin sekiz yüz yirmi yetişkine KRK teşhisi konmuştur. Rakamsal verilerle Amerika 'da her yıl en az yüz iki bin dört yüz seksen kolon kanseri ve kırk bin üç yüz kırk rektal kanser teşhis edilmektedir (19). 2009 yılında Amerika'da yirmi altı bin sekiz yüz altı erkek yirmi beş bin kırk iki kadın olmak üzere elli bir bin sekiz yüz kırk sekiz kişi KRK sebebiyle ölmüştür. 2013 yılında bu rakamlar yirmi altı bin üç yüz erkek ve yirmi dört bin beş yüz otuz kadınla toplam olarak elli bin sekiz yüz otuz olarak tespit edilmiştir[19].

Tablo 1: Dünya Üzerinde Yaşa Bağlı(ASR) KRK İnsidansı[20]

	Male				Female			
Population	Incidence	ASR incidence	Mortality	ASR mortality	Incidence	ASR incidence	Mortality	ASR mortality
World	746 298	20.6	373 639	10	614 304	14.3	320 294	6.9
More developed regions	398 903	36.3	175 397	14.68	337 964	23.56	157 768	9.3
Less developed regions	347 395	13.65	198 242	7.77	276 340	9.84	162 526	5.61
WHO AFRO	15 505	6.84	11 315	5.01	15 037	5.66	11 029	4.21
WHO AMRO	125 079	22.3	57 095	9.8	120 564	17.57	55 097	7.38
WHO EMRO	18 105	8.27	11 768	5.35	14 664	6.56	9 523	4.34
WHO EURO	254 769	35.65	120 387	15.72	216 471	22.5	107 888	9.7
WHO SEARO	68 235	8.9	48 093	6.3	51 990	6.29	36 823	4.43
WHO WPRO	264 479	22.3	124 920	10.14	195 479	14.62	99 888	6.77
United States of America	69 045	28.6	28 740	11	65 304	22	26 519	7.7
China	146 528	16.9	79 074	9	106 899	11.6	60 342	6.1
India	36 917	7.2	27 814	5.4	27 415	5.1	20 789	3.8
European union	193 426	39.5	82 959	15.7	151 920	24.4	69 087	9

KRK ayrıca Avrupa'da da tüm kanser tipleri arasında hem kadınlarda hem de erkeklerde ölüm sebeplerinin ikincisidir. 2012 yılında dört yüz kırk yedi bin yeni KRK olgusu ve iki yüz on beş bin ölüm hesaplanmıştır[3].

Dünya'da Doğu Avrupa, Asya, Afrika ve Güney Amerika'da düşük olan KRK oranları, özellikle endüstrileşmiş ülkelerde artmaktadır. 2008 yılında Avustralya, Yeni Zellanda, Avrupa ve Kuzey Amerika'da en yüksek insidans görülmüş ve erkeklerde kadınlardan daha yüksek oranda KRK diagnozu belirlenmiştir(tablo:1)[21]

Mortalite kısmi olarak bu coğrafik insidansı takip etmiştir[3]. Çek ve Japon kadınların belirlenen oran ilginç şekilde ABD, Kanada ve Avustralya gibi oranların azaldığı ya da durağan hale geldiği gözlenen bölge insidansına oranla insidans pik sınırı geçilmiştir[22, 23]. Bu istenmeyen eğilim beslenme şeklinin değişmesi, obezite ve sigara tiryakiliği gibi etmenlerin birlikteliğinin yansımasıdır[23, 24]. ABD 1975-2006 döneminde hem kadın hem de erkeklerde KRK insidansının anlamlı derecede azaldığı tek ülke olmasında erken tanının etkisi ve KRK taramasıyla prekanseröz lezyonların eksizyonu faydalı olmuştur[22]. Bununla birlikte KRK mortalite oranları erken tanı ve gelişmiş tedaviler sayesinde azalırken, Doğu Avrupa, Güney ve Merkez Amerika'nın bir bölümünde kısıtlı sağlık araştırmaları ve düşük ekonomik kaynaklarla artmaya devam etmektedir[25].

2.2 Kolorektal Kanser İlişkili Gen Değişimleri

Çevresel risk etmenlerinde ve yaşam şeklini tanımlamada erişilen az miktarda ilerlemeye rağmen sporadik KRK'larda ortaya çıkan değişimleri somatik olarak sunan konstelasyonla birlikte KRK'ya yatkınlığın altında ki kalıtımsal özel gen bozulmalarının tanımlanmasında anlamlı derecede ilerleme kaydedilmiştir. KRK'ya sebep olan genetik bozukluları iki tip genin, yani onkogenlerin öncülük eden değişimleri ya da artan işlevlerinde ki değişimler ve tümör süpresör(*TSG)* genlerin işlevlerinde ki kayıp, öncülüğüyle değişimlerdir (tablo2). Klonal seçilim olarak adlandırılan bu süreç, temel evrimsel seçilim süreci, belirli kanser hücrelerinde ki bozulmaların gruplaşmasıyla şekillenir. Onkogenik varyantlarda hücresel genlerin dönüşümü özgül nokta mutasyonları veya gen ekspresyonunda ki düzenlenmeleri bozan amplifikasyonlarla sonuçlanabilir(şekil 1). *TSG*'İn sessizleştirilme mutasyonları, genin tamamen kaybı veya epigenetik değişimler gen ekspresyonunda değişimlere yol açabilir. Diğer tür kanserlerde de KRK'da ki gibi *TSG* bozulmalarının büyüklüğünün çoğunluğu somatiktir[26, 27].

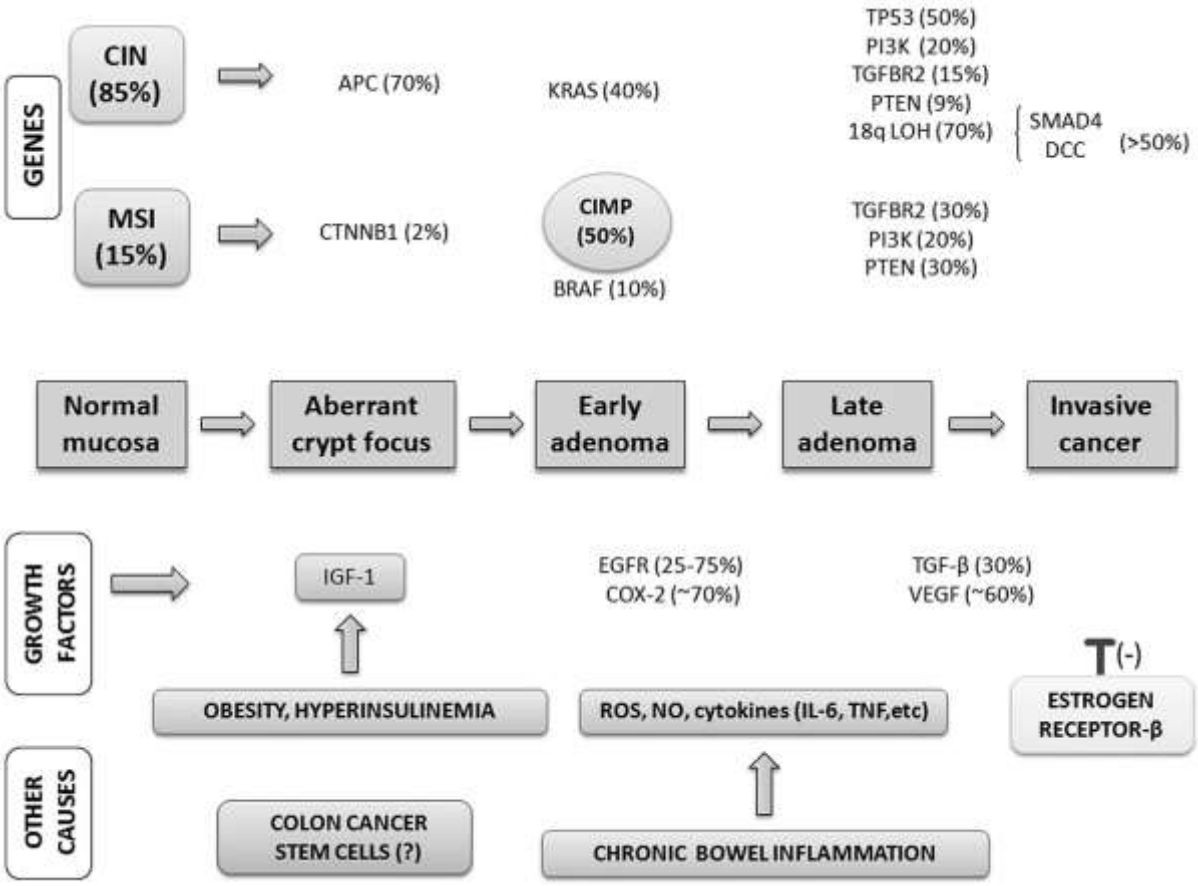
Normal mukozada doğal olarak meydana gelen ve normal fonksiyonlu onkogenler (proto-onkogen veya yaban tip onkogen olarak da adlandırılır) arasında dengeyle sonuçlanan sabit proliferasyon oranı vardır. Sabit proliferasyon oranı genlerin fonksiyonel DNA sekansları DNA'da sessizleştirici ya da çoğaltıcı adı verilen bölgelere bağlanan yüzey reseptörlerinden akış aşağı sinyal proteinleri ve metilasyonla değiştirilerek düzenlenir böylece transkripsiyonel seviyede de düzenlenmiş olur[28].

Proliferasyon çalışmaları, hızlı dönüşüm ve muazzam sayıda gerçekleşen mitozlar sonucu kolonda her gün ondan bine kadar değişen sayıda mutasyon meydana geldiğini ortaya koymuştur[29]. Yanlış eşleşme tamir sistemi (*MMR*), baz çıkarma tamir sistemi (*BER*), nükleotid çıkarma onarım sistemi ve çift iplik kırıkları onarım sistemi gibi etkili genomik tamir sistemleri eşleşme hatalarını ve mutasyonları bulmak için genomu tarar[30]. Sadece BER kolonda günde on binden fazla onarım gerçekleştirir[31].

Eğer hasar çok büyük veya yaygınsa hücre mitokondiriyal fonksiyonların kapatıldığı karmaşık sinyal yolağıyla apoptoza yönlendirilir[31].

DNA onarım sistemi replikasyon hatası tanıladığı zaman hücre onarımı yapmak için zamana ihtiyaç duyar ve hücre döngüsü beklemeye alınır. G1 onarma fazı *p53 TSG*'lerinin en

önemlisi olduğu, *TSG*'ler ile uzatılır[32, 33]. Yine de genomik tamir sistemi kusursuz değildir ve zamanla kontrol sisteminde de mutasyonlar gelişir.



Şekil 1:Gen ve büyüme faktörleriyle etkileşen koloerektal karsinogenez

https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2013.2041

2.2.1 Adenoma-Karsinoma Düzeni

Benign Gİ(gastrointestinal) tümörler değişken bir gruptur çevrelediği mukozanın üstünde bölgesel lezyonların görünümleri genellikle polip olarak isimlendirilir. İnsanda, kolorektal polipler, özellikle 5 mm'den küçük polipler, hiperplastiktir[34]. Birçok veri hiperplastik poliplerin KRK'nın asıl öncüsü olmadığını işaret etmesinin aksine adenomatoz polipler veya adenoma büyük ihtimalle önemli öncül lezyonlardır[34]. Adenomalar glandüler epitelden oluşur, displastik morfolojiyle nitelendirilir ve lezyonlarda epitel hücrelerinin

Tablo 2: Kolorektal Kanserlerde Meydana Gelen Onkogen ve Tümör Süpresör Gen Değişimleri

EN	**MUTASYON TİPİ**	**BELİRLENMİŞ DEĞİŞİM SIKLIĞI**
	ONKOGENLER	**%**
KRAS	NOKTA MUTASYON (KODON12, 13, 61)	% 40(KODON 12 MUTASYONU >75)
RAS	NOKTA MUTASYONU (KODON 12, 13,61)	< % 5
İK3CA	KİNAZ AKTİVİTESİNİ ETKİNLEŞTİREN NOKTA MUTASYONU	% 15-20
RAF	KİNAZ AKTİVİTESİNİ ETKİNLEŞTİREN NOKTA MUTASYONU	% 5-10 (CİMP POZİTİF KRK İLİŞKİLİ)
GFR	GEN AMPLİFİKASYONU	% 5-15
DK8	GEN AMPLİFİKASYONU	% 10-15
MYC	GEN AMPLİFİKASYONU	% 5-10
CNE1	GEN AMPLİFİKASYONU	5%
TNNB1	N UCU YAKININDA ÇERÇEVE KAYMASI DELESYONU VE SABİTLEYİCİ NOKTA MUTASYONU	% 5 <
EU(HER2)	GEN AMPLİFİKASYONU	% 5 <
YB	GEN AMPLİFİKASYONU	% 5 <

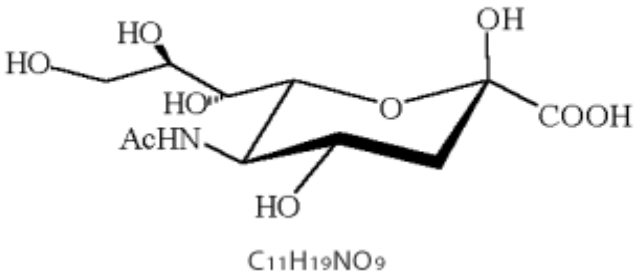
	TÜMÖR SÜPRESÖR GENLER	%
53	NOKTA MUTASYON, ALLEL KAYBI	% 60-70
PC	ÇERÇEVE KAYMASI, NOKTA MUTASYON, DELESYON, ALLEL KAYBI	% 60-70 (MUTASYONLARIN ÇOĞUNLUĞU ANLAMSIZ NOKTA MUTASYONLAR)
BXW7	ANLAMSIZ, YANLIŞ EŞLEŞME, DELESYON	% 10-80 (MUTASYONLARIN TAMAMINA YAKINI TRUNKAT PROTEİN OLUŞUMU SEBEBİ)
TEN	ANLAMSIZ, DELESYON	20%
MAD4	ANLAMSIZ, YANLIŞ EŞLEŞME, ALLEL KAYBI	10%
MAD2	ANLAMSIZ, DELESYON, ALLEL KAYBI	% 5-10
MAD3	ANLAMSIZ, DELESYON	5%
GFβIIR	ÇERÇEVE KAYMASI, ANLAMSIZ	% 10-15 (MSİ-H KRK)
CF7L2	ÇERÇEVE KAYMASI, ANLAMSIZ	% 5 (MSİ-H VE MSS KRK İLİŞKİLİ)
CVR2	ÇERÇEVE KAYMASI	% 10 (MSİ-H VE MSS KRK İLİŞKİLİ)

farklılaşmasıyla değişirler. ABD'de adenomaların prevelansı yetmiş yaş ile yaklaşık olarak % 50 ve elli yaş ile yaklaşık olarak % 25 oranı da varlık gösterir[35]. Adenomaların çıkarılmadığı bireylerde KRK riski artarken, polipektomi yapılmasıyla KRK riski azalır[36]. Karsinoma odakları adenomatöz poliplerde sıklıkla saptanır ve adenoma epitelyumunun

rezidüel bölgeleri KRK örneğinde sıklıkla gözlenir[37]. Sendromlardan etkilenen bireylerin adenomlara güçlü eğilimleri vardır, ailesel adenomatöz polipozis (*FAP*) gibi, kolonları çıkarılmazsa hayatlarının üçüncü veya beşinci dekatında KRK geliştirmeleri kesindir[38]. Yine de kanserin adenoma gelişiminin parçaları sadece ve devamlılığı olasılıkla yılları aşan sürede meydana gelmektedir. Örneğin, 1 cm civarında ki adenomaların on yıllık periyodta karsinoma dönüşümü yapma şansı yaklaşık olarak % 10- 15 civarında olabilir(38). Bununla birlikte adenomaları olan hastalarda bu adenomlar KRK için uzun zaman diliminde tehdit edici lezyonlardır ve bazı ülseratif kolitler genel populasyonla karşılaştırıldığında KRK tehdidinin on kat ya da daha fazla artmasına sebep olabilir. Ayrıca displazik ve flat adenomatöz plaklar öncül lezyonlar için önemli olabilir[39].

2.3 SİALİK ASİT

2.3.1 Glikokaliks ve Glikan Yapılar:



Şekil 2: Sialik Asit Yapısı

Kaynak: http://www.sanyofine.co.jp/eng/work/sialic_acid/sialic_acid.html

Bütün memeli hücreleri glikolipidlerden, glikoproteinlerden, glikofosfolipid çapalardan ve proteoglikanlardan oluşan yoğun bir glikokaliks ile kaplıdır(şekil:3) [40, 41]. Genomun % 1'inden fazlası gelişimsel olarak düzenlenmiş üretimle ilişkilidir ve doku özgül glikozilasyonu insan ve diğer omurgalılarda her hücre tipine özeldir.



Şekil 3: Kolon Mikrovillüs Hücrelerinin Glikokaliksinin Elektron Mikroskobu İle Görüntülenmesi

http://peir.path.uab.edu/library/picture.php?/23423

Bu hücre yüzeyi karbonhidratları hücre adezyonu, fertilizasyon, diferensiyasyon, gelişim ve tümör metastazına katılmaktadır[42]. Glikozilasyon çoğunlukla oldukça kompleks oligosakkaritlerin karbohidrat bölgelerinin zincirleriyle sonuçlanan, hücrenin sekresyon makinalarında protein ve lipitlere post translasyonel modifikasyonlar meydana getirirken oluşur ve beraberinde yapısal çeşitliliği sağlar. Bilinen protein sekanslarının yarısından fazlası potansiyel olarak glikozillenir[43]. Anormal glikozilasyon özellikle kanser olmak üzere birçok hastalıkla yakından ilişkilidir. Hücre yüzey glikozilasyonundaki değişimler tümör hücresinin invazyon veya metastazını indükleyerek veya baskılayarak hücre adezyonunu veya hareketliliğiyle karsinoma hücrelerinin metastazında kritik rol oynar[44, 45].

Glikozilasyon temel olarak iki büyük tipe ayrılır, şeker zincirlerinin serin (Ser) ya da treonin (Thr) rezidülerinin hidroksil grubuna bağlandığı O- glikozilasyon ve şeker rezidülerinin asparaginin (Asp), konsensüs sekans olarak Asn-X-Ser/Thr (X herhangi bir protein olabilir), amid grubunda tutunduğu N-glikozilasyon [46-48].

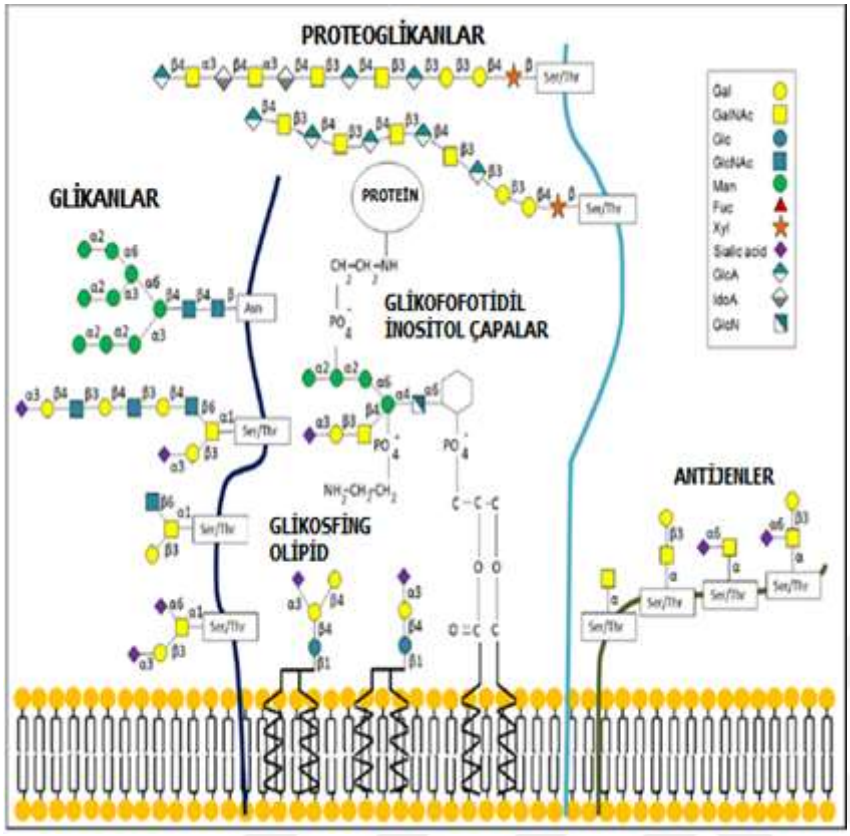
Potansiyel N-glikozilasyon siteleri protein motifinde yer alan Asn-X- Ser/Thr sekansının peptid dizilerinin analizi ile belirlenebilir. Protein sekanslarının tamamı genom tarafından kodlanır, buna rağmen protein çeşitliliği şeker parçaları ya da glikan bağlanmasıyla değişik sekanslara ve yapılarla değiştirilebilir[49]. Sıralı ve doğru şeker ya da glikan

modifikasyonu değişik doku veya hücrede yerleşmiş glikoziltransferaz ya da gilikosidaz olarak bilinen aktivitesi oldukça özgül ve tam olarak yerleşmiş enzim aktivitesine dayanır. Bu glikan yapıları sadece protein bağının doğası ile değil aynı zamanda yapıldığı doku veya hücre ile de belirlenir. Karbohidrat yan zincirleri proteinin çevresi ile olan etkileşimini, çözülebilirliğini etkilemesiyle, aktivite ve biyolojik geleceğini düzenler. Glikan örtünün fonksiyonu oldukça geniş bir spektrumda yer alır, büyüme için kritik rollerden daha küçük rollere kadar, gelişme ve hücrenin ve organizmanın hayatta kalmasını sağlama glikan yapının işlevleri arasında yer alır.

Glikan yapıları kolayca elde edilemez, çünkü proteinler gibi amplifiye edilemezler. Genellikle tek proteine birçok türün oldukça heterojenik karışımı olarak eklenirler. Lineer moleküller değildirler, biyolojik sistemlere bağlamak için varsayım yapmaksızın glikan türlerini önceden tahmin edecek evrensel bir metod yoktur. Artan deliller N-glikozilasyon sitelerinin kesin olarak belirlemeye dayanmaktadır çünkü özel kontrol mekanizmaları bölgesel gibi görünmektedir ve glikanların hepsinin katlanma prosedüründe eşit derecede önemli olmadıkları düşünülmektedir. Dikkate değer çalışmalar oligosakkaritlerin proteine tutunma sekanslarını karakterize etmiştir ve 3D yapılarını belirlemiştir. Glikanların içinde önemli bir molekül sialik asittir.[45, 50-60]

2.3.1.1 Glikozilasyon ve Kanser

Tümör hücreleri transforme olmamış eşlenikleri ile karşılaştırıldığında oldukça geniş aralıkta glikozilasyon değişiklikleri taşırlar. Protein glikozilasyonunun artmasıyla hücre populasyonunun moleküler heterojenitesi ve fonksiyonel çeşitliliği de artış gösterir(şekil 4)[61].



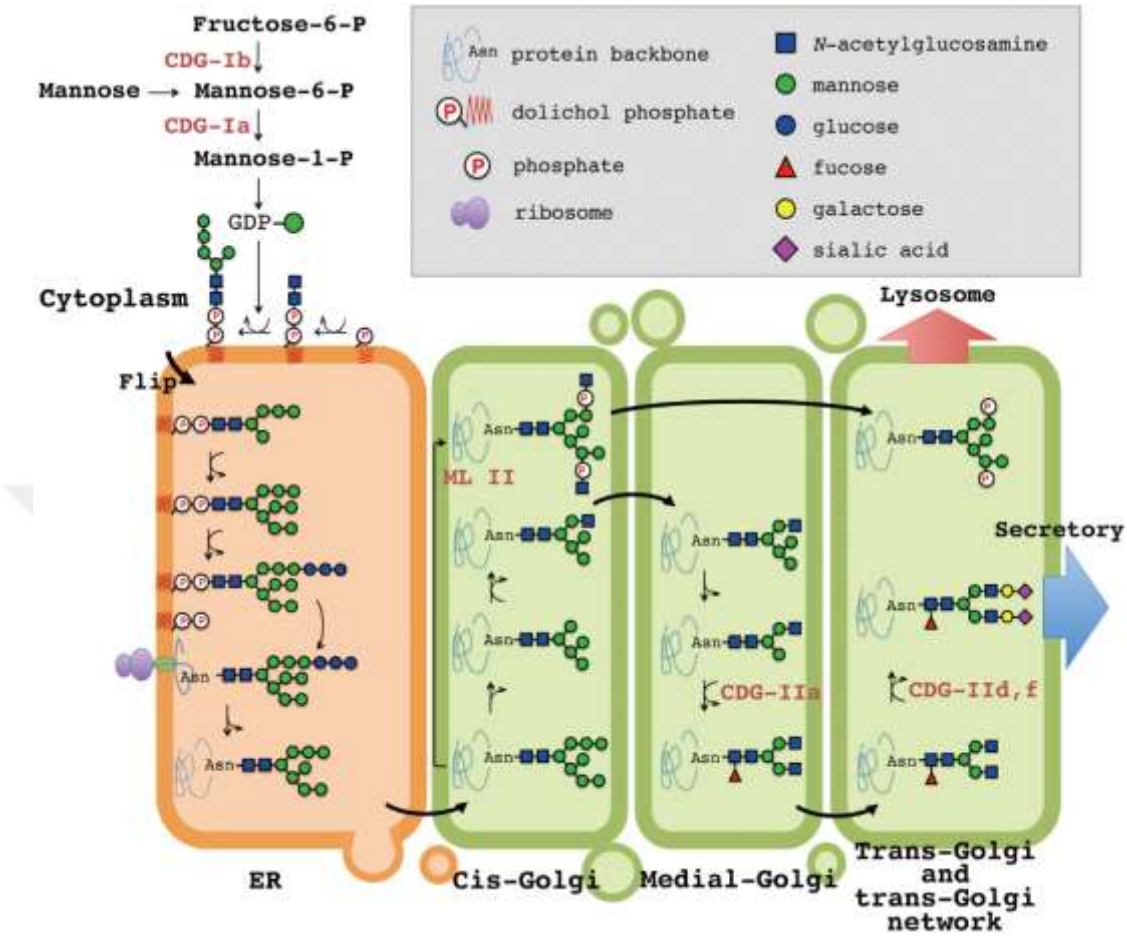
Şekil 4Hücre Yüzey Glikanlarının Modifiyesi

Kaynak:https://www.researchgate.net/publication/269407660_Glycosylation_changes_leading_to_the_increase_in_size_on_the_common_core_of_N-glycans_required_enzymes_and_related_cancer-associated_proteins

"Hakomori" ve "Kannagi" tarafından tümör ilişkili glikan sentezinin değişimlerinde iki sürecin yer aldığı ortaya konmuştur. Bunlar; tamamlanmamış sentez ve yeniden sentezlenme süreçleri[61].

Tamamlanmamış sentez süreci kanserin ilk aşamalarında meydana gelen trunkat yapıların oluştuğu süreçtir. Yeniden sentezlenme süreçleri ise daha ileri aşamada ki kanserlerde görülmektedir.

2.3.1.2 Sialilasyon



Şekil 5: N-Bağlı Oligosakkaritlerin Sentezi

Kaynak: http://www.intechopen.com/books/genetic-disorders/genetic-diseases-associated-with-protein-glycosylation-disorders-in-mammals

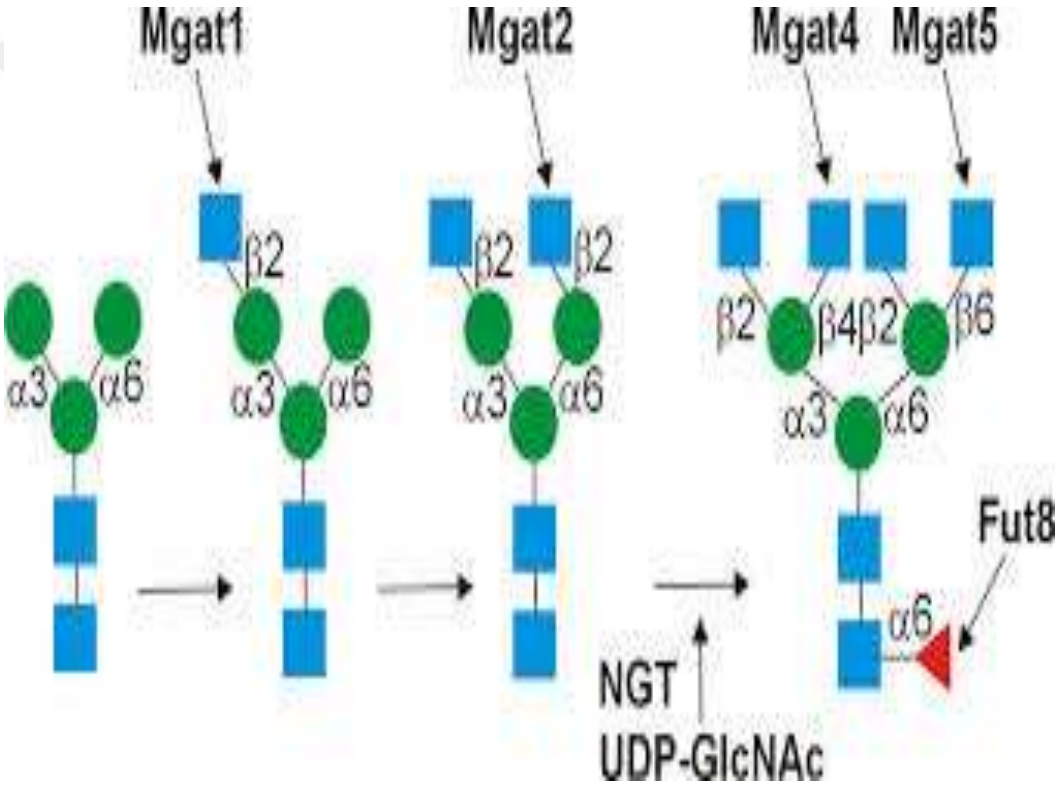
Sialilasyon selüler glikozilasyonun önemli bir modifikasyonudur(şekil 5). Sialillenmiş karbohidratlar hücresel tanıma, hücre adezyonu ve hücre sinyallerinde önemli role sahiptir. Artan sialilasyon ve değişen glikoziltransferaz ekspresyonu kanserle yakından ilişkilidir[20].

2.3.1.2.1 Fukozilasyon;

Fukozilasyon bozuklukları genellikle terminal fukozilasyonun uzatılamamasından kaynaklanır. Le^x ve Le^a , α fetoprotein, meme kanserinde EGFR(epiteliyel büyüme faktör reseptörü) fukozilasyonu buna örnek olarak verilebilir[62].

2.3.1.2.2 Dallanmış ve açısı değişmiş GlcNac N-glikanlar

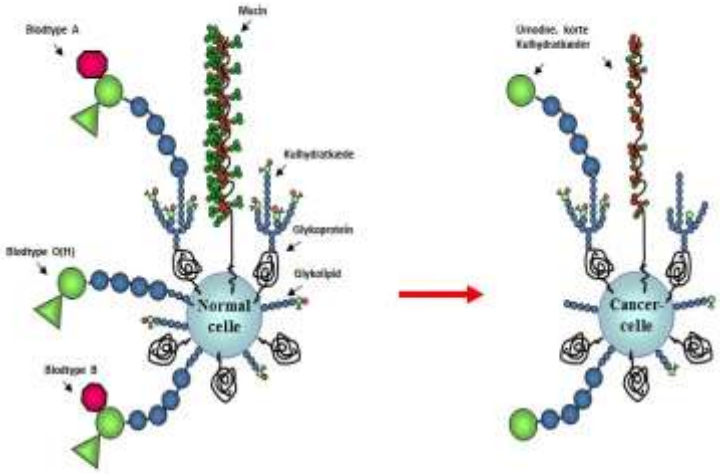
Malign transformasyon sırasında β1,6 dallanmış N-bağlı glikanların ekspresyonunda artış görülür. GnT-V(*N-acetylglucosaminyltransferase V*) aktivitesinde artış mevcuttur. Bu transferaz mannosidaz asetil glukozamin transferaz 5 geni (MGAT5) tarafından kodlanır. MGAT5 ekspresyonu RAS-RAF-MAPK sinyal yolağıyla düzenlenir. Bu yolak malignitede aktifleşir. GnT-V WNT sinyal yolağıyla kolon kanser hücrelerinin glikozilasyon seviyelerinin düzenlenmesinde de etkilidir(şekil:6)[62, 63].



Şekil 6:Mgat5 Gen Ürünleri

Kaynak:http://www.jbc.org/content/288/30/21850.full.pdf

2.3.1.2.3 Trunkat O-glikanlar



Şekil 7Kanser Hücresinde Trunkat Sentezlenme

Kaynak: http://www.biosciencetechnology.com/sites/biosciencetechnology.com/files/legacyimages/bt1309copenhagen.jpg

Musin tip O-glikanlar transmembran ve sekresyon glikoproteinlerinde sıklıkla bulunurlar. *Disakkarit Thomsen-Friedenreich Antijeni* (T antijeni, ayrıca core 1 olarak da bilinir), monosakkarit GalNAc(Tn) ve sialil formlarının anormal olarak ekspresyonları; trunkat veya kısalmış, tamamlanmamış sentezleri malignensi de görülür(şekil 7)[64].

2.3.1.3 Tümör Hücre-Hücre Adezyonunda Glikozilasyon

Epiteliyel kaderin (E-Kaderin) transmembran glikoproteini ve kanserde temel hücre-hücre adezyon molekülüdür. Glikanlar E-kaderin fonksiyonlarını etkileyerek tümör hücre hücre adezyonunu doğrudan etkilerler[65, 66].

Epiteliyel selektin (E- selektinler) kanser metastazında vasküler hücrelerle etkileşime geçerek kanser invazyonunu başlatmada aracılık ederler[66].

2.3.1.4 . Hücre Matriks Etkileşimleri ve Sinyallerinde Glikozilasyon

Heparan sülfat zincirlerinin proteoglakanlara kovalent olarak bağlandığı, HER_2, EGFR, MET (HGFR) ve TGFβ gibi proetinlerin işlevselliğini modifiye ettiği bazı kanser tiplerinde bilinmektedir[67]

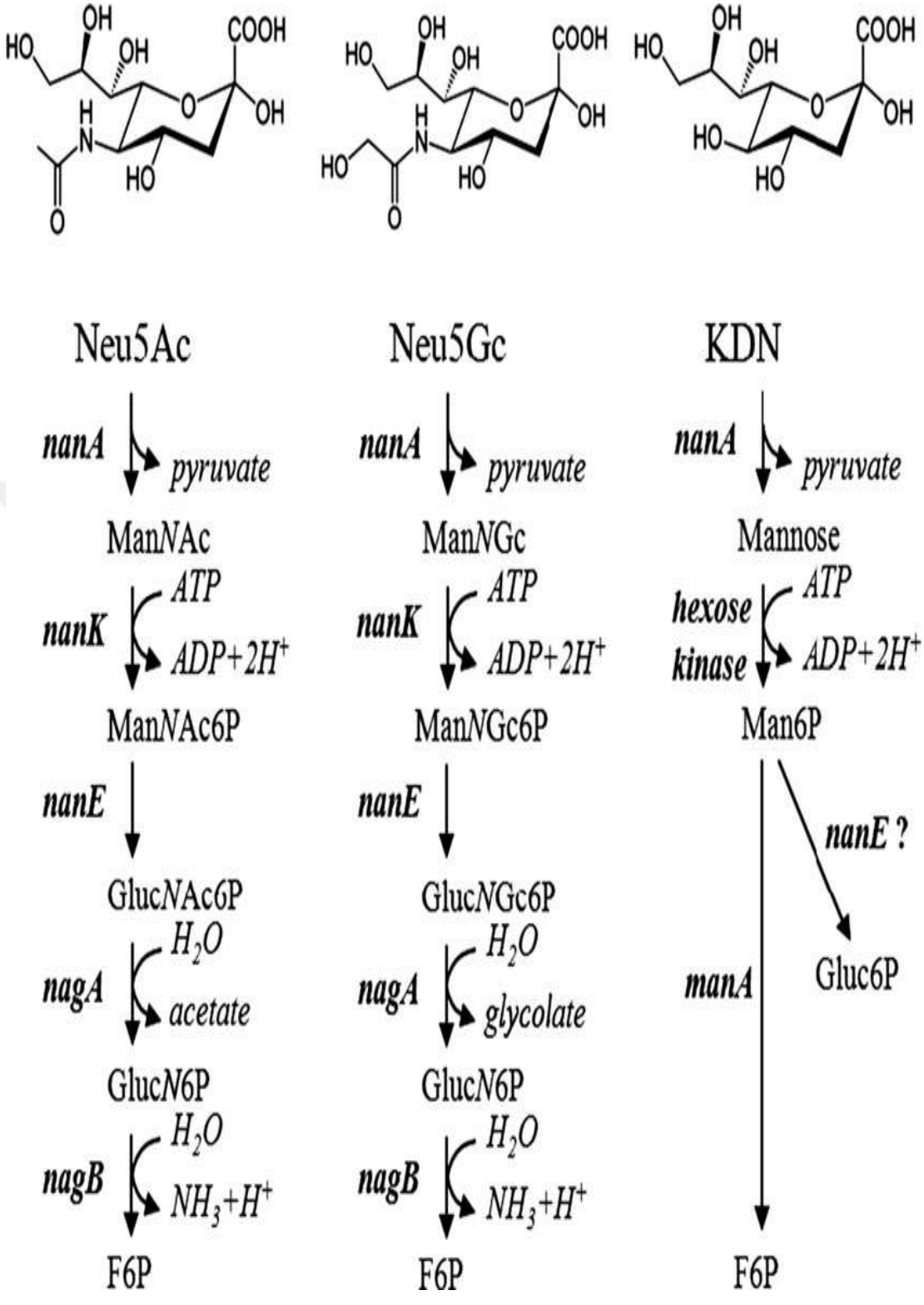
Diğer bir önemli membran reseptörü de CD44'dür. CD44 bozuklukları kanser hücresinin proliferasyonu, diferansiyasyonu, migrasyonu ve sinyallenmesi ile yakından ilişkilidir[68, 69].

2.3.1.5 Kanser Metabolizması ve Sinyallenmesinde Glikozilasyon Değişiklikleri

Hücre yüzey glikoproteinleri farklı sayıda N-glikan sitelerine sahiptir. N-glikan sayıları her bir glikoproteinin protein sekansları ile belirlenir. N-glikan yapı tipleri golgi N-glikan süreci ve şeker nükleotit havuzunda ki metabolit içeriği ile belirlenir[70]. EGFR, İGF reseptörü (İGFR), fibroblast büyüme faktörü (FGFR) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGFR) gibi hücre büyümesini, proliferasyonunu ve onkogenezi uyaran reseptörler her yüz aminoasit için fazla miktarda N-glikan bölgelerine sahiptir ve hepsinde uzun hücre dışı domainler vardır. Aksine TGFβ reseptör 1 (TGFβ1) ve TGFβ2 gibi hücre büyümesini durduran reseptörler az sayıda N-glikan sitesine sahiptir[70].

2.3.2 Sialik Asit

Sialik asitler (Sia) N-asetilnöraminik asit (Neu5Ac,NANA), N-glikolilnöraminik asit (Neu5Gc, NAGA) ve deaminonöraminik asitin (KDN; 2-keto-3-deoksi-D-glisero-D-galaktononurosonik asit) türevlerini kapsayan yaklaşık olarak kırk doğal aileye verilen isimdir(şekil:8). Modifikasyonları asetilasyon, sülfatlama, metilasyon, laktilasilasyon ve laktonizasyonlanmalarıdır.



Şekil 8:NANA, NAGA veKDN'nin Moleküler Yapısı ve Elde Edilişleri

Kaynak: http://femsle.oxfordjournals.org/content/347/1/14

Sialik asitin tüm omurgalıların tüm türlerinde ve bazı omurgasızlarda bulunduğu bilinmektedir. NANA bir örneği de kolominik asit olarak bilinen sialik asitin homopolimerleri olarak *E. coli* ve diğer bazı bakteri streinlerinde bulunmaktadır[71].

Çoğu memeli dokularında birden fazla çeşit sialik asit barındırır. İnsanoğlu bunun bir istisnası olarak sadece tek çeşit sialik asit tipine, NANA, sahiptir[72]. *HeLa* hücre hattında NAGA'nın izlerinin bulunması hücrelerin büyüdüğü fetal kalf serumdan absorbsiyonunun sonucu olabileği çıkarımına ulaşılmasını sağlamıştır[73].

Sağlıklı insan ürininden izole edilen sialik asitler primer olarak zayıf asit hidrolizlerinde NANA'yı göstermiştir, fakat ikinci olarak küçük bir miktar NAGA ve aynı oranda N-asetil-4-O-asetilnörominik asitinde varlığını ortaya koymuştur[74]. "Cabezas" ve "Ramos"un 1972'de ki aynı grup bildirimleri hem NANA hem de N,O-diasetinöraminik asitin insan safra musininde bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu da insan sialik asit tiplerinin hala tartışmaya açık olduğunu göstermiştir.

NANA 9 karbonlu şeker asididir. Genellikle altı karbonlu halka konfigürasyonunda bulunur,C_2 'ye karbonil grubu katılmasıyla ve C_6'ya hidroksil grubun hemiketal katılmasıyla şekillenir. Karboksil grubu pozisyon 1'e, asetillenmiş amino grubu C_5 'e tutunur. C_7, C_8, C_9 'nun üç karbon zincirini içerir. Çünkü bu üç karbonun her biri hidroksillenmiştir. Bu parçalar genellikle gliserol yan zincir olarak isimlendirilir.

Sialik asitin yapısal çeşitliliği biyolojik fonksiyonlarının yansımasıdır[75-78]. Hidrofilik karakteri ve boyutuyla birlikte negatif şarjlı olması bu şekerin çevresine fizikokimyasal etki yapmasına sebep olur[79]. Hücreler ve moleküller arası tanıma sürecinde sialik asitin rolü vardır. Sialik asit sayesinde immün sistem kendi hücrelerini ve kendinden olmayan hücreleri ayırabilmektedir(şekil 15)[80]. Hücre yüzeyinde sunulan sialik asitlerinin spesifik tanımasını yaptığı bilinen moleküllerden biri lektinlerdir. Lektinler bitkilerden elde edilir. Bilindiği kadarıyla bitkiler sialik asit içermemektedir. Bu lektinleri taşıma sebeplerinin savunma amaçlı olduğunu düşündürmektedir. Bilinen diğer sialik asit tanıma molekülleri siglekler ve selektinlerdir. Bu moleküller sialik asitlerin memelilerde ki eş molekül çiftleridir.

Selektinler, CD22, CD33, miyelin ilişkili glikoprotein (MAG) ve şivan hücre miyelin proteini(SMP) gibi sialoadezin (Sn) ailesi üyesidirler.

Selektinler ve siglek molekülleri şeker bağlamadan sorumlu bazı domainleri içerirler. Selektinler hücre yuvarlanması olarak adlandırılan lökositlerin endotele adezyonunun

başlangıç aşamasında önemli bir rol oynar. Endoteliyal hücre yüzeyinde yer alırlar ve lökosit yapısı üstünde ki sialil Lewis^{x} (Le^{x}) ve sialil Lewis^{a} 'yı(Le^{a}) tanırlar. Bu moleküller tümör hücreleri üzeride de sunulurlar, bu sebeple selektinlerin tümör metastazı ile ilişkili olabileceği de düşünülmektedir.

Diğer bir önemli özellikleri de hücreleri ve molekülleri maskelemeleridir. Eritrositlerin ömrü yaklaşık olarak yüz yirmi gündür. Bu süreçte yüzeylerindeki sialik asitler serum sialidazları tarafından ayrıştırılır böylece spontan hidrolizleri gerçekleşir. Altlarında kalan galaktoz rezidüleri makrofaj ve fagositlerin bağlanma sinyalini sunar[81].

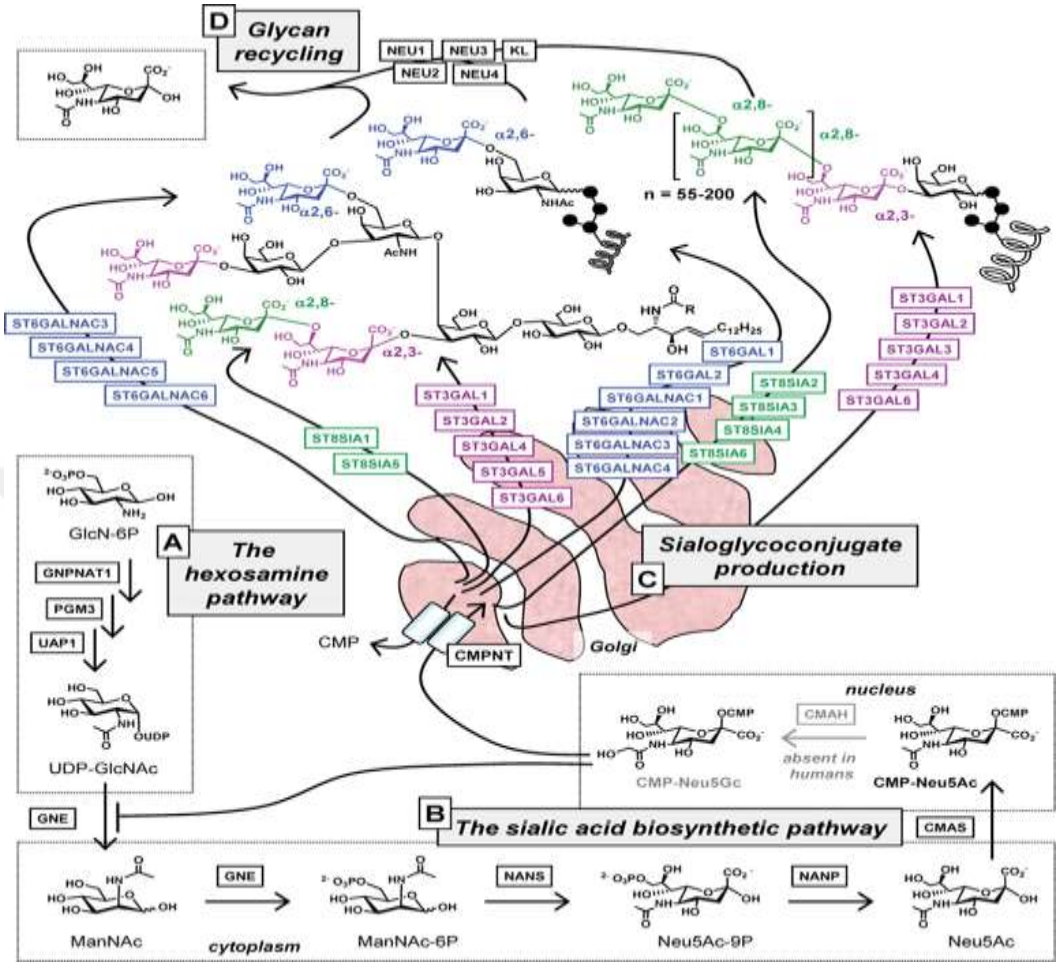
Bu duruma benzer bir olguda tümörlerin aşırı sialillenmesidir. Bu yüzden transforme hücreler immün sistem için görünmez olmayı başarırlar. Bu belki de kanser hücrelerinin kontakt inhibisyonunu kaybetmesinin de bir sebebi olabilir[82].

2.3.2.1 Sialik Asit Metabolizması

Sialik asit sentezi ve degredasyonu hücrenin farklı kompartmanlarına dağılmıştır. Şeker sitoplazmada N-asetilmannozamin-6-fosfat ve fosfoenolpiruvattan sentezlenir. Reaksiyon ürünlerinin defosforilasyonundan sonra, Neu5Ac-9-fosfat, CMP-Neu5Ac sentaz vasıtasıyla sitidin tri fosfattan (CTP) sitidin mono fosfat (CMP) rezidüsüne transferiyle nükleusta etkinleşir. Bu şeker nükleotidi sialik asit ve diğer bileşik arasında β- bağının doğal olarak oluşmasıdır, çünkü glikokonjugatlar daima α bağı yapar. CMP-Neu5Ac Golgi veya Endoplazmik Retikulum'a transfer olur.[78-88]. Aktive edilmiş sialik asitler uygun akseptör moleküle sialil transferazlar tarafından transfer edilir. Bağlanan sialik asit O-asetilasyon ve ya O-metilasyonla olgun glikokonjugat hücre yüzeyine transfer edilmeden önce modifiye edilebilir. Sadece N-asetil grupların hidroksilasyonu glikokonjugatın üstüne transfer gerçekleşmeden önce sitosolde meydana gelir[75].

Sialik asit metabolizmasının(şekil:9) anahtar enzimlerinden biri de sialidazlardır. Sialik asit rezidüleri membrana bağlı sialidazlarla hücre yüzeyinden veya serum sialoglikokonjugatlarından ayrılabilir. Genellikle glikokonjugatlar yüksek hayvanlarda reseptör aracılı endositozla degredasyona yatkındır. Endozom ve lizozomun birleşmesinden sonra terminal sialik asit rezidüleri lizozomal sialidaz tarafından uzaklaştırılır. Sialidazların etkin işlevleri için O-asetil gruplarının sialat-O-asetil-esteraz tarafından uzaklaştırılması

gerekir[77, 89]. Serbest sialik asit molekülleri yeni glikokonjugatların oluşum yeri olan Golgi'ye transfer edilir.



Şekil 9: Memelilerde Sialik Asit Metabolizması

Kaynak:http://glycob.oxfordjournals.org/content/19/12/1382/F2.expansion.html

Bunun alternatifi olarak sitozolik akilnöraminat liyaz ile asetilmannozamin ve piruvata degrede edilebilirler(77).

2.3.3 Sialil Transferazlar

. Sia'lar Golgide hem alıcı protein hem de alıcı bağa özgül sialiltransferazlar tarafından akseptör glikana transfer edilirler, fakat bu durum transfer edilen Sia'ya özgün değildir. Glikan Sia bağı daha sonra asetillenebilir veya metillenebilir[90].

Tablo 3:Sialil Transferazların Sembolleri, Enzim İsimleri, Kromozom Lokasyonları, Gen ID'leri

Table 1: Summary of the human sialyltransferase family
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene)

Symbol	Enzyme Name	Chromosome Location	Gene ID
ST3Gal (α2,3-ST)			
ST3GAL1	ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 1 HGNC: 10862, Gal-NAc6S, MGC9183, SIAT4A, SIATFL, ST3Gal A.1, ST3Gal IA, ST3O	8q24.22	6482
ST3GAL2	ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 2 HGNC: 10863, Gal-NAc6S, SIAT4B, ST3Gal II, ST3GalA.2	16q22.1	6483
ST3GAL3	ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 3 HGNC: 10866, SIAT6, ST3Gal II, ST3Gal III, ST3N	1p34.1	6487
ST3GAL4	ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 4 HGNC: 10864, CGS23, FLJ11867, NANTA3, SAT3, SIAT4, SIAT4C, ST3Gal IV, STZ	11q23-q24	6484
ST3GAL5	ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 5 HGNC: 10872, SIAT9, SIATGM3S, ST3Gal V	2p11.2	8869
ST3GAL6	ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransferase 6 HGNC: 18080, SIAT10, ST3Gal VI	3q12.1	10402
LOC343705	similar to β-galactoside α-2,3-sialyltransferase	20q11.22	343705
ST6Gal (α2,6-ST)			
ST6GAL1	ST6 β-galactosamide α-2,6-sialyltranferase 1 HGNC: 10860, CD75, MGC48859, SIAT1, ST6Gal I	3q27-q28	6480
ST6GAL2	β-galactosamide α-2,6-sialyltranferase 2 HGNC: 10861, KIAA1877, SIAT2, ST6Gal II	2q11.2-q12.1	84620
ST6GalNAc			
ST6GALNAC1	ST6 (α-N-acetyl-neuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide α-2,6-sialyltransferase 1 HGNC: 23614, HSY11339, SIAT7A, ST6GalNAc I	17q25.1	55808
ST6GALNAC2	ST6 (α-N-acetyl-neuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide α-2,6-sialyltransferase 2 HGNC: 10867, SIAT7, SIAT7B, SIATL1, ST6GalNAc II, STHM	17q25.1	10610
ST6GALNAC3	ST6 (α-N-acetyl-neuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide α-2,6-sialyltransferase 3 HGNC: 19343, PRO7177, SIAT7C, ST6GalNAc III	1p31.1	256435
ST6GALNAC4	ST6 (α-N-acetyl-neuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide α-2,6-sialyltransferase 4 HGNC:17846, SIAT3C, SIAT7D, ST6GalNAc IV	9q34	27090
LOC390377	similar to α-N-acetyl-neuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3-N-acetyl-galactosaminide α-2,6-sialyltransferase (NeuAc-α-2,3-Gal-β-1,3-GalNAc-α-2,6-sialyltransferase) ST6GalNAc IV, Sialyltransferase 7D, Sialyltransferase 3C	13q12.11	390377
ST6GALNAC5	ST6 (α-N-acetyl-neuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide α-2,6-sialyltransferase 5 HGNC: 19342, MGC3184, SIAT7E, ST6GalNAc V	1p31.1	81849
ST6GALNAC6	ST6 (α-N-acetyl-neuraminyl-2,3-β-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide α-2,6-sialyltransferase 6	9q34.11	30815
ST8Sia (α2,8-ST)			
ST8SIA1	ST8 α-N-acetyl-neuraminide α-2,8-sialyltransferase 1 HGNC: 10869, GD3S, SIAT8, SIAT8A, ST8Sia I	12p12.1-p11.2	6489
ST8SIA2	ST8 α-N-acetyl-neuraminide α-2,8-sialyltransferase 2 HGNC: 10870, HsT19690, MGC116854, SIAT8B, ST8SIA-II, STX	15q26	8128
ST8SIA3	ST8 α-N-acetyl-neuraminide α-2,8-sialyltransferase 3 HGNC: 14269, SIAT8C, ST8Sia III	18q21.31	51046
ST8SIA4	ST8 α-N-acetyl-neuraminide α-2,8-sialyltransferase 4 HGNC: 10871, MGC34450, MGC61459, PST, PST1, SIAT8D, ST8SIA-IV	5q21	7903
ST8SIA5	ST8 α-N-acetyl-neuraminide α-2,8-sialyltransferase 5 HGNC: 17827, SIAT8E, ST8Sia V	18q21.1	29906
ST8SIA6	ST8 α-N-acetyl-neuraminide α-2,8-sialyltransferase 6 HGNC: 23317, SIAT8F, ST8SIA-VI, ST8Sia VI	10p12.33	338596

Sialil transferazların memelilerde ve bakterilerde en az 15 ailesinin α2→3, α2→6, α2→8 ve α2→9 bağını Neu5Ac ve akseptör şeker arasında oluşturduğu bilinmektedir[80, 91]. ST'ler insanda sentezlenmelerindeki karbonhidrat ailesine bağlanmalarına göre dört gruba ayrılabilirler; ST3Gal (α2,3-ST), ST6Gal (α2,6-ST), ST6GalNAc ve ST8Sia (α2,8-ST) ailesi sınıflandırılabilir. Her aile kendi içinde değişik alt tiplere ayrılabilir(tablo 3)[92, 93].

Sialil transferazların yaklaşık 50 aminoasit dizisi korunmuştur. Bu korunmuş motifin substrat bağlamayla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Genel olarak bu enzim ailesi N-terminal sitoplazmik domain, sinyal membran çapası domaini, kök bölgesi ve C-terminal katalitik domain içerir. Akseptör özgüllükleri oldukça yüksektir. Enzim aktivitesi Ca^{+2} /calmodülin ve fosfat tarafından düzenlenir[94, 95].

2.3.3.1 ST3GAL1

ST3 beta-galaktosidaz α2,3- sialiltransferaz galaktoz içeren komponentlere CMP- sialik asit'den sialik asit transferini katalizleyen proteini kodlar. Kodlanan protein normal şartlarda golgide yer alır fakat proteolitik süreçte çözünür hale geçebilir.

Sialik bağlamanın yanı sıra sekretör musin artışında ve doku makrofaj reseptörü sialoadhesinin kapsayan hücresel etkileşiminde sialik asit bağlanmasında rolü olduğu düşünülmektedir[96]. Timosit maturasyonu sırasında ST3GAL1 ekspresyonunu düzenlenmesinin timik kortekste immatur T hücrelerinin tutulma mekanizması olduğu düşünülmektedir[97].

Günümüzde ST3GAL1'in katalitik aktivitesinin gösteren, cDNA seviyesinde üç farklı ST3GAL1 tanımlanmıştır. Bu sialil transferazlar SiaT-4a, Sia, SiaT-4b ve SiaT-4c olarak adlandırılmıştır.[98].

SiaT-4a orijinal olarak domuz submaksiller bezlerinden ve sonrasında fare beyninden klonlanmıştır. Hem glikoproteinler de hem de glikolipitlerde Gal(β1,3)GalNAc akseptörü yönünde aktivite gösterir[99].

SiaT-4b (ST3GAL.A.2) tercihen beyinde sentezlenir Sia-4b ile benzer özgüllüğe sahip olmasına rağmen, SiaT-4b akseptör olarak asialo G_{M1} ve G_{M2} 'yi daha effektif olarak kullanır[100].

SiaT-4c sadece Gal(β1,3)GalNAc-R'yi değil ayrıca Gal(β1,4)GlcNAc R'nin α2,3 sialilasyonunu da insan plasentasında gerçekleştirir[101].

Herbir sialil transferaz ekspresyon seviyeleri açısından farklı dokularda farklı patern izler. SiaT-4a hemen hemen her dokuda eş salgılama paterni gösterirken, beyin dokusunda düşük seviyede izlenmektedir. SiaT-4b seviyesi sadece karaciğerde gözlenmektedir. SiaT-4c ekspresyonu çarpıcı bir şekilde kalp, plasenta, testis ve overde izlenmektedir.

Kromozom düzenlenmesi açısından bu enzimleri kodlayan genlerSiaT-4a kromozom 8q24.22'de, SiaT-4b kromozom 11p21-p34'de ve SiaT-4c kromozom 11q23.3'de yer alır. Genler SİAT4A, SİAT4B ve SİAT4C olarak isimlendirilmiştir[102].

ST3GAL1 ve ST6GALNAC1'MUC1 ekspresyonuyla ve O_glikanlarda anormal sialillenme artışıyla ilişkili olarak bulunmuştur[103, 104]. Artmış MUC1 ekspresyonu artan tümör invazyonu ile koleredir[105].

2.3.3.2 ST3GAL2

ST3GAL2 α2,3 bağlanma ile glikokonjugatlarda bulunan son Gal rezidüsüne CMP-sialik asitten sialik asit transfer eden β-galaktosidaz α2,3 sialil transferazdır.

Farede ST3GAL-2'nin özellikle GD1a ve GT1b'nin sentezinde rol aldığı düşünülmektedir; beyin, karaciğer ve çizgili kaslarda ifade olan enzimdir. Aktif domaini ST3GAL-1 ile identiktir [99]. ST3GAL2 16q22.1 de bulunan gen tarafından kodlanır. 350 amino asitlik, 40173 Da'luk protein kodlar. Kardiyomyopatilerle ilişkisi olduğu düşünülmektedir.ST3GAL2'nin kanser ve metastaza ilişkin rolü literatürde çok yeni tartışılmaktadır.

ST3GAL2 kolon, meme ve over kanserlerinde artmış ekspresyonda görülmüştür. Artışı metastatik potensiyelle kolere olarak bulunmuştur.[106, 107].

Tümör progresyonunda ve metastazında etkili olan mekanizmada ST3GAL2'in rolü az bilinmektedir. İn vitro çalışmlarda ST3GAL2'in hücre migrasyonunu ve invasyonu uyardığı bulunmuştur[108, 109]. β1 integrin üzerine sialik asit eklenmesinde etkinliğinin bu mekanizmada önemli bir yer tuttuğu düşünülmektedir.[89, 110, 111].

2.3.3.3 ST6GAL1

ST6GAL1 CMP- sialik asitten galaktoz içeren substratlara sialik asit transfer eder. En çok çalışılmış sialil transferazdır. Bu enzim golgi'de membrana bağlı şekilde yer alır. Kromozomal lokasyonu 3q27.3'tür. 46605 DA ağırlıkta ve 406 aa uzunluktadır.

Fas ölüm reseptörleri ST6GAL1 için substrattır, α2,6 sialillenmiş Fas repseptörlerinde ligand uyarımlı Fas aktivasyonu sonrasında internalize olarak apoptotik sinyali azaltır[112].

Benzer olarak yapılan çalışmalarda TNFR1 ölüm reseptörlerinin ST6GAL1 ile siyalillenmesi TNF-α uyarımlı apoptozu bloklar.[113]. "Baum" ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ST6GAL1'le CD45'in sialilasyonu CD45'in internazilasyonunu engelleyerek T-hücrelerini apoptozdan korur.[114]. Ayrıca ST6GAL1 Sialilasyonu PECAM'i hücre yüzeyinde tuıtarak endoteliyal hücrelerin sağ kalımına neden olur[115].

Galektinin β1 integrine bağlanması ölüm sinyallerinden biridir. Fakat bu durum sadece β1 integrinin sialillenmemesi durumunda gerçekleşir[116].

ST6GAL1 tarafından sialillenen EGFR hedefli kemoterapi ilacı *gefitinib*'e direnç oluşmasına sebep olur[117].

Hücre kültüründe yapılan çalışmada EMT sırasında ST6GAL1 susturulması, E-kaderin artışı aracılığıyla EMT'nin durmasına yol açmıştır. Daha da ötesi MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattında yapılan çalışmada ST6GAL1'in susturulması kısmı olarak bazal mezenşimal tipin geri dönüşümünü sağlar.

ST6GAL1 kolon, meme ve over kanserinde ekspresyon seviyeleri oldukça yüksek bulunmuştur. Ayrıca bu enzimin fazladan eksprese olması metastatik fenotiple yakından ilişkilidir. ST6GAL1'in artışı Ras onkogeni aracılı sinyallenmenin sonucudur[106, 118, 119].

ST6GAL1'in tümör progresyonunda ki metastatik rolü tam olarak anlaşılabilmiş değildir, fakat β1 integrin reseptörünün sialillenmesi yoluyla olduğu düşünülmektedir[108, 109]. Ayrıca galektin-3 uyarımlı apoptozun gerçekleşebilmesi için β1 integrinin sialillenmemiş olması gerekmektedir. Sialik asit eklenmesi galektin-3 bağımlı apoptozdan kaçılmasını da sağlamaktadır[116].

Hücre migrasyonuna ek olarak ST6GAL1'in tümörijeniteyi hücre ölüm sinyallerinden kaçmayı sağlayarak yaptığı da bilinmektedir. Fas ölüm resöptörü ST6GAL1 için substrattır. Fas'ın siyalillenmesi ligand uyarımlı aktivasyondan sonra Fas internalizasyonunu engelleyerek apoptotik sinyallenmeyi engeller[112].

Benzer olarak TNFα uyarımlı apoptozda TNFR1 ölüm reseptörünün ST6GAL1 aracılığıyla bloklanması apoptozu durdurur[113].

"Baum" ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ST6GAL1 İle siyalillenen CD45'in internalizasyonu engellenerek T hücrelerinin apoptozdan korunması sağlanır[114].

ST6GAL1'in PECAM sialilasyonu, hücre yüzeyinde tutulmasını sağlayarak endoteliyel hücrelerin sağ kalımına sebep olur[115].

ST6GAL1 ekspresyonu normal kolon mukozasında ya çok az ya da hiç görülmezken, metastatik KRK'da oldukça yüksek seviyede görülür.GE11 hücrelerinde yapılan EMT araştırmasında ST6GAL1'in susturulması E-kaderini de azaltarak EMT'yi açıkça baskılamıştır. Daha da ötesinde meme kanseri hücre hattında ST6GAL1'in susturulması bazal mesenşimal fenotipin kısmi olarakta olsa geri dönüşümünü sağlamıştır[120].

EMT'nin ST6GAL1 tarafından baskılanması PI3K/Akt sinyal yolağı sayesinde gerçekleşir[121].

2.3.3.4 ST6GAL2

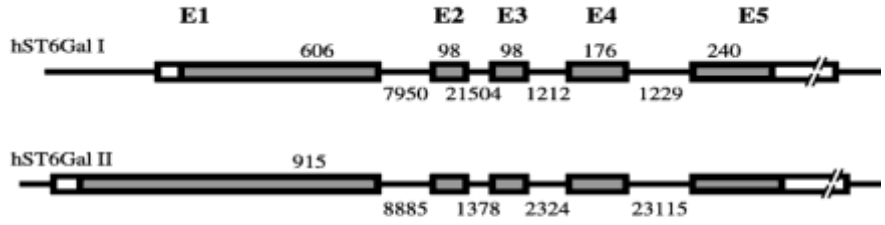
ST6GAL2, 2002 yılında klonlanmış ve sadece in vitro çalışmaları yapılabilmiş bir sialil transferazdır[122, 123]. ST6GAL2 kromozom 2q12.3 üzerinde yeralır. 529 aa uzunluğunda 60158 Da ağırlığındadır. ST6GAL2'nin splice'ı GT-AG kuralına uygun olarak gerçekleşir. Hem ST6GAL1'in hem de ST6GAL2'nin oldukça fazla korunmuş bölgesi mevcuttur(şekil:10).

ST6GAL2 Galβ1,4GlcNAc yapısını içeren oligosakkaritlerle aktivite gösterir fakat bu aktivite in vitro çalışmalarda oldukça zayıf olarak bulunmuştur veya hiç gerçekleşmemiştir. Oligosakkarit spesifik bir enzimdir, [123].

ST6GAL2 temel olarak erişkin ve embriyonik beyin hücrelerinde görülmüştür. Daha az ekspresyon seviyelerinde ise tiroid bezi, ince bağırsak, kolon ve testislerde mevcuttur.[123].

ST6GAL2'nin transkrpsiyonel aktivasyonunu sağlamada NRSF(*neuron-restrictive silencer factor*)[124] ve NF-κB transkripsiyonunu baskılarken, Olf1, Sox5 ve SP1 transkripsiyon aktivatörü gibi davranmaktadır[124].

A



B

	hST6Gal II		hST6Gal I		
Exon	Exon size (bp)	Amino-acid	Exon size (bp)	Amino-acid	% identity (aa)
1	999	314	658	202	22.4
2	98	33	98	33	69.7
3	103	34	98	33	32.4
4	175	58	176	58	60.3
5	5343	90	240	80	48.9

Şekil 10: ST6GAL1 ve ST6GAL2'nin Korunmuş Bölgeleri ve Ekzon Uzunlukları

Kaynak: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1033.2003.03458.x/full

2.3.3.5 Sialil Transferazların Ekspresyon Artışları

Hücre yüzeyinde ki N bağlı glikanlar ve O bağlı glikanların Sialil Lewis X'lerde terminal α 2-6 bağlı Sia'ların ekspresyon artışı sıklıkla birçok insan kanserinin kötü prognozuyla ilişkilidir. ST6GAL1 geni ekspresyonunun artışıyla ilişkili örnekler kolon, meme, serviks, koriyokarsinom, akut miyeloid lösemi ve beyin kanserlerinin bazı çeşitlerinde tanımlanmıştır[119, 125]. Bu özellik belki de α2-6 bağlı Sia'ların integrin fonksiyonları üzerine etkisinden kaynaklanmaktadır(89). Sialil-Lewis-X ekspresyonunda ise tümör hücreleri selektin ligandını selektinlerle etkileşime geçmek için kullanıyor gibi görülmektedir. Hematojen kaynaklı karsinoma selektin ligandları plateletler üzerinde ki selektinlerle, innat immün hücreler ve endotelyumla etkileştiğinde tümör embolisi ve mikrotrombusla sonuçlanır, metaztazı yaymaya hizmet eder[126, 127].

Özellikle nöroektodermal orjinli dokularda zengin olsa da tüm dokularda ve hücre tiplerinde bulunan gangliosidler Sia'ları taşıyan glikolipidlerdir. Malign melanomda

disialogangliosid GD3 oldukça yüksek seviyelerde ifade edildiği gibi, bu gangliosidin 9-O-asetilat ve 5-N-deasetilat formları bulunur[128].

ST3Gal ailesinde bulunan bütün enzimler glikolipitlerde bulunan son Gal rezidüsüne α2,3- bağıyla Neu5Ac rezidülerini transfer eder. ST3Gal ailesinde, ST3Gal-1 ve –II alt aileleri ST3Gal-III, -IV, -V ve VI oligosakkarit izomerlerinin Galβ1→3/4GlcNAc-R'ele alındığında özellikle tip 3 oligosakkarit yapıları Galβ1→3GalNAc-R kullanır. Ayrıca ST3Gal-V alt ailesi ganglioside GM3 sentezinin yükseltgeni olarak akseptör substrat özellikle laktosil-seramid kullanır. ST6Gal enzim ailesi sadece iki alt aileyi kapsar; ST6Gal-I ve –II, her ikiside akseptör substrat olarak Galβ1→4GlcNAc-R'yi kullanır. ST6GalNAc ailesi enzimleri O-glikosilproteinlerde (ST6GalNAc-I,-II ya da-IV) ve ya glikolipitlerde (ST6GalNAc alt ailesi I) bulunan GalNAc rezidülerine α2,6- bağıyla Neu5Ac nin transferini katalizler. St6GalNAc-I ve –II (ST6galNAc alt ailesi I) Galβ1→3GalNAc peptidlerinin (sialillenmiş veya sialillenmemiş) üstüne Neu5Ac'nin transferini katalizler ve aktiviteleri geniş ölçüde peptid parçalarına bağlıdır. Oysaki ST6GalNAc-III, -IV ve –VI (ST6GalNAc alt ailesi II) daha fazla sınırlı substrat spesifitesi sergiler, sadece sialillenmiş aksöptör substratlar olarak (Neu5Acα2→3Galβ1→3GalNAc-R),GM1b gibi glikolipit veya glikoproteinlerin her ikisinden de bulunanı kullanır. Bu alt ailelerin her biri diğer alt ailelerin göstermediği karakteristik sekans motiflerine sahiptir. ST8Sia ailesi enzimleri glikoprotein ve glikolipidlerde bulunan diğer Neu5Ac rezidülerini α2,8- bağıyla Neu5Ac rezidülerine transferinde aracıdır. Bu aile ağacının iki ana dalı üç alt aile içerir; ilk dalda ST8Sia-I, -V ve VI ve ikinci dalda ST8Sia-II, -III ve –IV[129-132].

Bütün omurgalı ST'leri benzer yapıya sahiptir. Trans-golgi kompartmanında genelde bulunan tip II transmembran proteinleridir. Kısa N-terminal sitoplazmik kuyruk, özgün transmembran domain ve uzun C-terminal katalitik domaini takip eden 20'den 200'e kadar değişik uzunlukta kök bölgesine sahiptirler. ST8Sia ailesi üyeleri, ST6GalNAc ailesi üyelerinin düşük korunmuş sekansa sahip olmalarına rağmen yüksek korunmuş sekansa sahiptir. ST3Gal ve ST8Sia ailesi üyeleri, ST6Gal ailesinin ST6GalNAc ailesinden ayrılışının aksine belirgin sekans benzerliği paylaşır[130].

Omurgalıların ST amino asid sekansı tüm ifadelenen sekansları gösterilerek tanımlanmıştır, bunların içinde sialil motifleri olarak adlandırılan dört peptid korunmuştur: L(*large*), S(*small*), motif III ve motif VS(*very small*) . Bu dört motif bağın ve akseptör

sakkarit spesifite ve esas disülfid bağının formasyonuyla ilişkili ve hem donör hemde akseptör substratın tanınmasında içeren ve katalitik aktivitedeki motif bütün ST'lerde yaygındır. İyi belgelenmiş L-, S- ve VS motifleri ve motif III süper aile seviyesinde korunmuş model kalıntıları göstermektedir. Bahsedildiği gibi, bu kalıntılar ST'larda hem yaygın hem fonksiyonel hem de yapısal role sahiptir. Patel ve Balaji'nin bağlanma spesifik motiflerinin tanımlaması korunmuş kalıntı kalıplarının ikinci seviyesini sunmaktadır. Bu seviyede korunmuş diziler kabul edilen sialik asit bağ spesifitesi ve monosakkarit parçaları için önemlidir. Korunmuş kalıpların üçüncü seviyesi Harduin-Lepers ve arkadaşları tarafından analiz edilmiştir, belirlenmiş diziler her yirmi alt ailede korunmuştur. Bu kalıntılar çeşitli alt aileler için aynı olmayan bütün akseptör substrat spesifikliğine katkı yapması beklenir. Bu korunmuş kalıntılar ökaryotik ST genlerini tanımlamak için ayırıcı özelliktir[132-134].

Hücre yüzeyi Sia seviyeleri ST genlerinin mRNA seviyelerine bağımlıdır. İnsanda, ST değişik seviyelerde birçok dokuda ifade olur. Buna ek olarak ST ifadelerinin seviyeleri kanser transformasyonunda önemli ölçüde değişir ve ST ifadelenmesindeki bu değişim 5' okunmayan bölgedeki dallanma doku özgül ya da hücre özgül promotorlarda mRNA türlerinin üretimi yoluyla transkripsiyonel olarak kazanılmış olabilir. Örneğin insan ST6Gal-I'in transkripsiyonel düzenlenmesi üç büyük mRNA türünün dahil olduğu en derinlemesine çalışılmışıdır. İlk plasenta cDNA kütüphanesinde, 5'kodlanmayan Y ve Z içerdiği ve temel veya referans genin sunulduğu düşünülmektedir. İkinci türde ekzon Y ve Z eksiktir ve ekzon I'in önünde özgül sekanslar barındırır ve büyük karaciğer transkripti sunulur(hepatik yada H formu:446 bp). Üçüncü form, B-lenfositlere özgül, ekzon Y ve Z noksan fakat 5'okunmayan ekzon X(X form ya da X transkripti: 128 bp) içerir. Değişik STGal-1 transkriptlerinin doku yada hücre tipi seçmeli ekspresyonu özgül promotorların kullanılmasıyla kontrol edilebilir ve ST6Gal-I ekspresyonun kantitatif regülasyonuna izin vermiş transkripsiyonel faktörlerin uygun olduğunu ortaya atmaktadır. Buna ek olarak Ras onkogeninin yapımı ST6Gal-I transkripsiyonunun düzenlenmesinde katkıda bulunabilir. Karaciğer zenginleştirilmiş faktör hepatosit nükleer faktör-I (HNF-1) hepatosit özgül P1 promotor aktivitede katılımcı olduğu düşünülmektedir. "Xu" ve arkadaşları Form 1 mRNA ekspresyonunu düzenleyen P1 promotorunu karakterize etmiştir. Lusiferaz analizi kullanarak HNF-1 tanıma unsurunu içeren 1 bölgeyi göstermeleri kolon adenokarsinoma hücre hattında ST6Gal-I genin transkripsiyonel aktivitesi için önemlidir çünkü HNF-1 bölgesi mutasyonlarının yaban tip yapıyla

karşılaştırıldığında %80'yle lusiferaz aktivitesi azalır. ST6Gal-I'e benzer olarak çoklu promotorlar,[135, 136]ST3Gal-IV, ST3Gal-V (GM3 sentaz) ve ST3Gal-VI genleri ki her verilen ST çoklu izoformunun sonucu olarak bulunur, bu promotorlar değişik fizyolojik sinyallere cevap olabilir ve değişik hücre tiplerini uyarır[137].

Diğer çalşmalar ST3Gal-IV ve STGal-III ST'lerindeki çalışmaların kompleksliğini göstermektedir. ST3Gal-IV genini kromozomal lokasyonu ve orijinal yapısı belirlenmiştir. İnsan ST3Gal-IV mRNA'sı birçok izoform barındırır; A1, A2, B1, B2, B3 ve BX. Bu transkriptler alternatif promotor kullanımı kombinasyonlarıyla ve RNA spliysing ile üretilir. ST3Gal-IV mRNA değişik promotorlardan transkribe olabilir; pA, pB1, pB2, pB3 ve pBX . tip B mRNA bazı hücrelerde sunulurken, tip A mRNA özellikle testis, ovaryum ve plasentada eksprese edilir. "Taniguchi" ve "Matsumoto" ST3GalIV gen ekspresyonunun epiteliyal hücrelere spesifik düzenlenmesinin DNA bölgesinin -520'den -420'si ile AP2 nin spesifik etkileşimi aracılığıyla olduğunu ileri sürdü. AP2 epitelyum hücre spesifik gen ekspresyonuyla ilişkili transkripsiyon faktörleri grubuna aittir. ST3Gal-III hakkında, "Grahn" ve arkadaşları periferal kan lökositlerinden insan ST3Gal-III gen transkriptini klonlamış ve sekanslamışlardır ve 19 değişik transkript ile nükleotit(nt) 45'ten nt896'ya kadar olan bölgede delesyonların geniş değişkenliğini izole etmişler ve nt 26'dan nt173'e insersiyon bulmuşlardır. Transkripsiyonel yönden bakıldığında, "Taniguchi" ve arkadaşlarının ST3Gal-III genin transkripsiyon başlangıcında dört hücre hattında(K-562, HT-29, PC-3 ve HepG2) translasyon başlangıç kodonundan -181 bp haritalamışlardır ve ST3Gal-II geni ST3Gal-IV ve _VI genlerinde olduğu gibi çoklu mRNA'ya sahip olmadığını bulmuşlardır. Ayrıca 5'-okunmayan bölgenin iki ekzona; E1 ve E2 ayrıldığını, işaret ederek bunun ekzon E1 pIII promotor lokasyonunun yukarı yönde olmasına dayandırılabileceği ve yaygın Sp1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ST3Gal-III gen ekspresyonu için önemli olabileceğini dikkate almışlardır[138].

Bütün ST'lerin çalışmaları göreceli olarak karışıktır çünkü hücre yüzeyindeki sialil-glikokonjugatların ekspresyonundaki değişiklikler tümör ilişkisini kapsamaktadır. Buna ek olarak, özgül çalışmalar ve değişik hücre tiplerinden ST'lerin klonları benzer aktiviteli enzimler arasındaki anlamlı farklılıkları ortaya çıkarmaktadır. Aslında sergilenen aktiviteye birden fazla substrata yöneliktir. Böylece enzimlerin kritik özgüllüğü akseptör substratla enzimin hangi hücrede ve zamanda karşılaştığına bağlıdır. Bir enzim bir bağ olarak kurulmuş

teori “bir enzim ailesi genellikle bir bağ” olarak revize edilmiştir. Ayrıca, ST üyelerinin çeşitli splice formları saptanmıştır. Bu bütün ST’lerin ya da ST üyelerinin bütün splice formlarının aynı zamanda çalışılmalarını oldukça zorlaştırmıştır[102, 107-109,[139].

2.3.4 Kolon ve Rektum Kanserlerinde Glikozilasyon Değişimleri

Tümör metastazı adhezyon olaylarının çok adımlı süreçleri ve sinyal olaylarını kapsayan, tümör dağılımında en önemli süreçtir. Bu süreç normal fizyolojik veya patolojik süreçte enfeksiyon veya yaralanmaya lökosit cevabına oldukça benzer.

Bu cevabın başlangıcında, dolaşımdaki lökositlerin kayma kuvveti altında vasküler duvara adere olmaları gerekir. Selektinler, endoteliyel hücrelerin, plateletlerin ya da diğer lökositlerin üzerinde lökositlerin bağlanma ve dönmesiyle karakterize edilen ilk adheziv basamağa aracılık ederler. L-selektin, çoğu lökositin üzerinde eksprese olur, bazı endoteliyal hücrelere ve diğer lökositlerin ligandlarına bağlanır. E-selektin, sitokinle aktifleşmiş endoteliyel hücrelerde eksprese olur, çoğu lökositin ligandına bağlanır. P-selektin aktive olmuş plateletle ve endoteliyel hücrelerde eksprese olur ve ayrıca çoğu lökositin ligandına bağlanır. Selektin ve ligandlarının ekspresyonunun düzenlenmesi inflamatuvar cevabın başlaması ve sonlanmasına yardım eder. Bununla birlikte bu moleküllerin uygunsuz ekspresyonu çeşitli inflamatuar ve trombotik bozukluklarda lökosit aracılı doku hasarına katkıda bulunur. Tümör hücreleri ve endoteliyal hücreler arasındaki etkileşim selektin ve ligandlarına bağlanması yoluyla endotelyum boyunca tümör hücresinin invazyonu ve tutunması metastatik süreçte önemli bir adım olabilir[140-144].

Kanser hücrelerinin yüzeyindeki salil-Tn, sialil-T, sialil-Le_a ve sialil-Le_x ‘in dahil olduğu, sialillenmiş antijenlerin fazla ekspresyonu geniş olarak bildirilmiştir. Musin tip O-glikan ve sialil-Le_x ligandlı tümör hücreleri endotelyumda etkinleştirilmiş E-selektinlere bağlanmaya hazırdır. Bazı deneysel modellerde, O-glikanlar metastaz için kritiktir. E-selektinlere bağlanan insan kolon kanser hücrelerinin bağlanması GalNAc- benzil ile engellenerek O-glikan uzamasının baskılanması ve böylece nude mice’da LS174T insan kanser hücrelerinin karaciğer metastazı azalmıştır. Çünkü Lewis Antijenlerinin ekspresyonu GalNAc-benzil ile baskılanabilir, bu O-glikanlara esas olarak bağlı gibi görülmektedir. Sialil –Le_x O-glikanlara tutunurken hücre adezyonunu ve invazyonu teşvik edebilir, diğer O-glikan

yapılar kanser hücre yüzeyinde önemli bir rol oynayabilir. Primer tümörle karşılaştırıldığında, sialil-Tn, sialil-T, sialil –Le_a ve sialil-Le_x'in artışına uyumlu olarak Tn ve T antijenlerinin ekspresyonu metastatik kolon kanserinde azalmıştır. Sialil-Tn ve Le_x antijenlerinin farklı doku dağılımı servikal kanser metastazı ve primer tümör arasında anlamlıdır[144-147].

Sialil-Tn bazı epiteliyal kanser hücrelerinde (gastrik, pankreatik, kolorektal, ovaryum ve meme kanserleri) fazlaca eksprese edilen önemli bir karbohidrat antijendir ve genellikle kötü prognozla ilişkilendirilir. Sialil-Tn GalNAcα1-O-Ser/thr parçalarına α2,6 bağıyla sialik asit kalıntılarını transfer eden ST6GalNAc-I tarafından sentezlenir[148, 149].

İnsan KM12 kolon kanseri hücrelerindeki varyantlar, sialil dimerik Le_x ekspresyonunun yüksek invazivliğiyle örtüşen musin tip zincirlere tutunur. Sialil-dimerik Le_x metastatik kolon kanserinde çoğunlukla yükselir. Bu sialillenmiş Lewis yapıları selektin bağlanma özelliği yolundan başka kanser metastazında rol oynayabilir. Sia'nın metastatik süreçle ilişkili olduğu defalarca gösterilmiştir. Sialilasyonun baskılanması ve O-glikan uzaması ve sialilasyon kanser hücrelerinin metastatik potansiyelini azaltır. Metastatik kolon kanser hücreleri hücre adezyonunda önemli rol oynuyor gibi gözüken hiper sialillenmiş musinler üretir. Sia taşıyan zincirlerin kanser hücrelerinin diğer hücrelerle ve hücre matriksi ile etkileşimleri düzenleyebiliyor olması olasıdır. Bu zincirler bundan dolayı anti adezyon ve uzama için olduğu gibi adezyondan da sorumlu olabilir. Sialik asit büyümenin düzenlemesinde de yer alabilir. Çünkü sialil-glikokonjugatlar adezyonu ve hareketliliği teşvik etmede düzenleyicidirler, kanser hücrelerinin kolonizasyonu ve metastatik potansiyeli için önemli olabilirler[150-157].

β1 integrin 12 olası α alt ünitesinden biriyle heterodimerize olabilir ve kollajen, fibronektin ve lamininde dahil olduğu çoklu ligandlarda hücre adezyonu, dağılım ve migrasyona aracılık eder. Benzer şekilde bu integrin ve sosyal çevrenin ekstra sellüler ayrımında tümör hücre davranışını etkilemede ideal olarak uygundur. Kolon adenokarsinoma fenotipinde β1 integrin merkezi rolünün kanıtları, β1 karşıtı antibodilerle bloklandığında *in vivo nude mice* modellerinde ve insan kolon karsinoma hücrelerinde metastazın azaldığı gösterilmiştir. β1 integrinin yükselmiş α2,6 sialilasyonu kolon adenokarsinoma dokularında kendi lokal matriks çevresiyle kolon tümör hücrelerinde değişmiş etkileşim olması gözlenmiştir. β1 integrin fonksiyonunda sialilasyonun rolünü doğrulamak için "Seales" ve arkadaşları SW48 hücrelerinde ST6Gal-I ekspresyonuna zorlayarak kollajen I'de β1

integrinin aracılı migrasyon ve tutunmanın artışına yol açtığı ve talin proteini ilişkili sitoiskelet β1 alt ünitesi çiftinin arttığını buldular. Buna ek olarak β1 integrin-ligand etkileşiminin doğrudan değiştirilmesi, ST6Gal-I aracılı sialilasyonun integrin aktivasyon mekanizmasında daha fazla dolaylı mekanizmanın etkilenebileceğini buldular. Örneğin yukarı düzenleme α2,6 sialilasyon integrin bağlı süreçleri koordineli olarak düzenlemede ürokinaz tip plazminojen aktivatör reseptör ve tetraspanin gibi diğer membran ilişkili proteinlerle β1 içeren integrinlerin lateral ilişkisi değiştirilebilir. Özellikle CD 82 tetraspanin ile α3β1 ve α5β1 heterodimerlerinin etkileşimi CD 82 ve integrinin her ikisine de ayrı ayrı glikozilasyon bölgelerinde bağımlı gibi görülmektedir. ST6Gal-I'in yanında ST3Gal-IV tümör hücre adhezyon ve migrasyonunda önemli olabilir[126, 158-162].

Musin glikoproteinlerinin antijenitesi, episalin, (MUC1) çeşitli kanser tiplerinde değişmiştir. MUC1'in ekspresyon seviyesinde ve post translosyonal modifikasyonlardaki değişim, özellikle glikozilasyon ya da sialilasyonda kanser hücrelerinin davranışını diğer hücrelerle ve ekstra sellüler matriks etkileşimi ile ilişkili etkilediği bulunmuştur. Normal glandular epiteliyal hücrelerde, MUC1 ekspresyonu lümenle sınırlandırılmış apikal yüzeyle sınırlıdır. Yine de polaritesini kaybetmiş kanser hücrelerinde, MUC1 bütün yüzeyde eksprese olur. Çubuk yapılar sayesinde, moleküler uzama, çoğu membran moleküllerinin uzamasında 5-10 katlanma yaparak, yüzey çevresinde 100-200 nm'den fazladır. Sialik asidin yüksek derecede bulunması yüzünden, MUC1 negatif yük sergiler ve MUC1'in hücrede yüksek seviyede eksprese olması her hücreyi birbirinden uzaklaştırabilir. Böyle itici etkiler ekspresyon yapmayan ebeveyn hücrelerle karşılaştırıldığında MUC1 transfektanlarının azalan agregasyonunun görülmesi ispatlanmıştır ve ayrıca bu hücrelerin ekstrasellüler matriks ile etkileşimi baskılanmıştır. E kaderin aracılı hücre etkileşimiyle MUC1'in hücre adezyonunu baskılayıcı molekül olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık, MUC1'in β kateninle etkileşimi adezyonu arttırabilir. Hücre hücre etkileşimlerinde MUC1 etkileri dikkate alındığında, özgül etkileşimlerin olmadığı açıktır, örneğin lektin molekülleriyle, uzun yüksek yüklü moleküller hücreler arası repulsiyonla sonuçlanır. Hücre etkileşimindeki bu baskı etkisi molekülün büyüklüğüne ve negatif yüke bağlı görünmektedir. Bununla birlikte özgül etkileşimlerde olasıdır, örneğin lektine bağlanan belirli karbohidrat epitopundan sonra hücre etkileşimi artabilir. Bunun için MUC1 endoteliyel hücreler ile ICAM1 ekspresyonu ligandı olarak bildirilmiştir. Buna ek olarak, MUC1 sialoadhesin için makrofaja özel adhesyon molekülü,

özellikle Neu5Acα2→3Gal'e bağlanan, ligand olarak gösterilmiştir ve böylece tümör bölgesinde bulunan makrofajlarla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Musin glikozilasyon kalıbı değiştiğinde karsinomada yapı değişir, bu farklı glikoformların oluşturulmasıyla sonuçlanır, böylece karbohidrat bağımlı etkileşimler etkilenmektedir. Kanser musinlerindeki O-glikanlar kanser tipleriyle çeşitlilik gösterir, böylece kolon karsinoma hücrelerinde üretilen MUC1 selektin ligandıyla belirebilirken, meme kanserinde görülmeyebilir. Kanser hücresi yüzeyindeki MUC1'in metastatik progresyonu nasıl etkilediği açık değildir, buna rağmen null mice MUC1'de, memeli tümörlerinin progresyonunda gecikmiş olarak bildirilmiştir. B1,6-N-asetilglukozaminiltransferaz V'ın *Null* mutant farelerde, N-glikan yolağında kısıtlı enzimi, tümör büyüme ve metastazı önemli biçimde baskılamıştır[163, 164]

2.4 KANSER HÜCRESİNİN METASTAZI

Metastaz kanser hastalarının morbidite ve mortalite sebeplerinin başlıcasıdır, moleküler temelleri ise hala anlaşılamamıştır(112). Metastaz modeli kullanılan primer tümör hücrelerinden elde edilen modeller düşük metastaz potansiyeline sahip olmasına rağmen büyük primer tümör içerisindeki az sayıda hücre somatik mutasyonlar sonucu metastatik potansiyel biriktirir(113). Metastatik fenotip primer tümörden migrasyon yapabilme, lenf veya kan dolaşım sistemi içinde hayatta kalabilme, uzak dokuları istila etme ve uzak lenf nodlarında metastatik bölge kurabilme özelliklerine sahiptir(113). Metastatik yayılım sırasında primer tümörün kanser hücreleri hareketlerini sıralı olarak gerçekleştirir:

1. Etraftaki dokuyu istila etme lenf ve dolaşım sistemine mikrodamar girişimiyle yayılım (intravazasyon)
2. Sağ kalım ve dıştaki dokulara mikrodamarlarla akış boyunca büyük miktarda yerdeğişimi
3. Dolaşım sisteminden çıkma (ekstravazasyon)
4. Dış dokunun mikroçevresinde sağ kalım
5. Hücre proliferasyonu ve makroskopik ikincil tümör oluşumuna olanak tanıma davranışı için dokunun yabancı mikroçevresine adapte olma(6).

Dolaşan tümör hücreleri (CTC) Avusturalyalı "Dr. Thomas Ashworth" tarafından 1869'da tanımlanmıştır. Teknolojik eksiklerden kaynaklanan kısıtlamaların bir kısmının aşılmasıyla bu konuda araştırmalar ön plana çıkmıştır. Bu hücrelerin dolaşım sisteminde

izolasyonuyla nadirliğinin birleşmesiyle yapılan bazı deneylerin sonucunda elde edilen bulgularla CTC'nin farklı özelliklerinden yararlanılarak izole edilebilmelerini olanağını sağlamıştır(114).

Primer tümörden ayrılmak ve metastatik süreci başlatmak için kanser hücrelerinin küçük bir grubu ya da bireylerinin migrasyon ve istila edebilme yeteneğine sahip olmaları gerekir. Bu özellikler farklı ikincil bölgelere geçitlerinin ana yolunu sağlayan kan ve lenfatik damarlara, etraftaki dokunun ekstrasellüler matriksinde(ECM) degredasyonu ve ECM boyunca hareket edebilmeyi sağlar. Metastatik ayrılmanın ilk klinik işareti daha fazla farklı metastaz açılışı sağlayan geçici durma noktalarından daha çok kör uç gibi görülen lenf nodu drenajı, çoğunlukla lenfatik damarlar boyunca primer tümör oluşumu yeriyle doğrudan bağlantılı drene lenf nodlarında kanser hücrelerinin sunumundan meydana gelebilir(115). Aslında anatomik olarak farklı bölgelere yayılım, hematojen yayılım süreci yoluyla dolaşım sistemi boyunca nerdeyse tamamen meydana gelmekte gibi görülmektedir(47, 116).

Tümöre özgün neoplastik hücreler homojen değildir. İntratumoral heterojenitenin önemli kaynağı hiyerarşik olarak düzenlenmiş normal dokuların yerini tutan bunlar gibi tümör içindeki hücre populasyonunda bulunan kendini yenileyebilen hücrelerin bulunmasıyla ortaya çıkarılmıştır(117). Kendini yenileyebilme özelliğinde, kanser kök hücreleri (CSC) olarak adlandırılan bu hücreler, kısmen farklılaşmaya geçişi tamamlayıcı hücrelerdir ve tamamen farklılaşma seviyesini bitirmiş hücreler diğer tümör hücreleri ve birçok karsinomda kendilerini yenileyebildikleri gözlenmektedir(118).

2.4.1 Kolorektal Kanser ve Metastaz

Kanser gelişimi komplike bir biyolojik süreçtir. Kanser primer başlangıcı normal hücrelerin bulundukları bölgede malign türevlerine transformasyonudur. Bu gelişim çok adımlıdır ve birçok genetik ve epigenetik değişimi gerektirir. Malign transformasyon sırasında iki süreç birlikte gelişme gösterir; kanser hücre transformasyonu ve metastatik kaskad(119).

Primer mutasyon progresif sellüler proliferasyona ve tümör formasyonuna önderlik ederek karsinogenezin başlama sinyalini sağlar. Neoanjiyogenezis ve invazyon tümörü takiben migrasyon ve intravazasyon özellikleri kazanır. Bundan sonraki adımlar immün hücrelerden kaçmak, sistemik dolaşımın düşman çevresinde hayatta kalmak, hedef organın

endoteliyal duvarının kapiller yatağına adezyon ve ekstravazasyondur. Metastatik kaskadın son basamağı konukçu savunmasından kaçınma, ikincil tümör gelişimi için gerekli ihtiyaçları sağlama sebebiyle yeni kan damar ağına ulaşmak ve kolonizasyondur(119-121).

Bütün bu başarılı aşamalar malign hücrelerin çoklu özelliklerini gerektirmektedir ve bozukluk veya eksiklik tüm metastatik kaskaddan çıkılmasına sebep olur. Bu özellikler çoklu mutasyonlar sonucunda biriktirilir. Kanser hücrelerinin metastatik kaskada başladığında bu özelliklere sahip olup olmadıkları ya da bu kaskada girerek kaskadın tamamlanması için gerekli özellikleri mutasyonlarla bu süreçte biriktirip biriktirmedikleri halen belirsizliğini korumaktadır(122, 123). Daha önemli olarak çeşitli laboratuvar yaptıkları çalışmalarda onayladıkları gibi primer tümör bölgesinde farklı hücre alt populasyonları mevcuttur. Eş zamanlı olarak kanser hücreleri tarafından farklı yerleşimlerde metastatik tümör oluşumu primer kanser hücresinden tamamiyle farklı nitelendirilmiştir, çünkü metastatik hücreler atalarından farklı genetik ve fenotipik özellikler göstermektedir(6, 124, 125).

Mikrometastaz yapan birkaç kanser hücresi, sıklıkla makrometastazıda meydana getirir(37).

2.4.1.1 Kolorektal Kanserin Karaciğer Metastazı

Hepatik kapiller ağın sinüzoid içeriği sinüzoidal duvara yakın veya sinüzoidal lümende ki dört farklı hücre tipinden oluşur; sinüzoidal endoteliyal hücreler(SEC), kupffer hücreleri(KC), hepatik stellat hücreleri (HSC) ve pit hücreleri. Her bir hücre çeşidi hepatik homeostazide ve KRK metaztazında kritik rol oynar(126).

KRK'nın hepatik metaztaz süreci birbiriyle alakalı dört faza ayrılır:

1- karaciğer infiltrate malign hücrelerin mikrovasküler fazı
2- interlobular mikrometaztaz fazı
3- anjiyogenik metaztaz fazı
4- belirlenmiş hepatik metaztaz fazı.

İlk faz sıklıkla SEC'lerde meydana gelir, ilerleyen basamaklarda hepatik parankim etkilenmeye başlar. Yine de dört fazda SEC'lerde meydana gelebilir. (127).

Metastatik KRK hücreleri selektinler aracılığıyla SEC'lere bağlanır. Bu bağlanma tümör hücrelerini stabil hücre adezyonu elde etmesini sağlayacak kadar kuvvetli olmasa da,

integrinler SEC adezyonunun stabilizasyonunu sağlar. Eğer integrinlerle uyum gerçekleşmezse bağ kırılır ve kanser hücreleri kana tekrar salınır veya mekanik hasara uğrar(128). Güçlü itersellüler bağların oluşumunu takiben, kanser hücreleri SEC'lere adhere olduğunda dolaşan kan hücrelerine ve plazmanın çekici gücüne direnç kazanır(129).

Ekstravazasyon gerçekleştiğinde sitotoksik T hücreleri, monositler ve makrofajlar metaztatik hücreler karşı aktive olur, fakat daima başarılı olamazlar(130).

Bu süreçte neden olduğu bilinmemekle birlikte çoğunlukla metastatik hücreler dormant faza geçer. Kanser hücrelerinin bu süreçte yeni niş hazırladığı düşünülmektedir. Kanser hücrelerinin, immün hücrelerinin, endoteliyal ve stromal hücrelerin çapraz konuşması sonucu EGF ve TGFα gibi çeşitli kemokinlerin ve büyüme faktörleinin üretimi başlar, bu faktörler karaciğerde metastatik tümör büyümesine sebep olur. EMT'nin tersi olarak MET başlar ve E-kaderin gibi epiteliyal belirteçler yeniden eksprese olur(131, 132).

2.4.1.2 Kolorektal Kanserin Peritonel Karsinamatoz (PK) Metastazı

Peritonel kavitede yaşayabilen tümör hücrelerinin peritoneal bölgeye ulaşması primer tümörden iatrojenik veya spontan perforasyonla gerçekleşir. Kanser hücreleri peritonel kaviteye ekildiğinde farklı anatomik bölgelere yerleşimleri 3 temel kuvvet sayesinde gerçekleşir; yerçekimi, GİS peristaltik hareketi ve diyafram kasının hareketiyle gerçekleşen negatif basınç gücü(133).

Başarılı implantasyonun gerçekleşebilmesi için sadece tümör hücrelerinin dolaşımı yeterli değildir ayrıca dokununda metastatik implantasyonu barındırması gerekmektedir. Yer edinme süreci iki şekilde gerçekleşir; transmezoteliyal ve translenfatik. Transmezoteliyal süreçte serbest kanser hücreleri doğrudan uzak mezotelyuma tutunur ve bu süreç CD44, lenfosit homing molekülü ve çeşitli lökosit ilişkili diğer adezyon molekülleri sayesinde gerçekleşir(134).

Takip eden basamakta sitokinlerin üretimi mezoteliyal hücrelerin submezoteliyal bazal membrana nüfuz etmesi için büzülmelere sebep olur. Peritona tutunup mezoteliyal bariyere penetre olan tümör hücreleri integrinlerle etkileşime geçer. Subperitonel dokuya invazyon peritonel kan bariyerinin aşılmasını gerektirir. Bu bariyer motilite faktörler ve MMP'ler

(matriks metalloproteinaz)sayesinde geçilir(135). Özellikle MMP2 ekspresyonunun lenf nodu metastazı ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir(136).

Subperitonel yüzeyde kapillerin komşuluğuna yerleşen kanser hücresi kendisinin veya stromanın ürettiği büyüme faktörleri aracılığıyla proliferasyonunu başlatır[164]. Sonraki adım peritonel yayılma sürecinde VEGF-A ve VEGF-C üretimi aracılığıyla subperitonel alanda neoanjiyogenezdir. Daha önce ki çalışmalar VEGF'in tümör varlığında yüksek seviyelerde bulunduğunu göstermiştir(138)

Transmezoteliyal yolda, peritonel kanser yayılımı translenfatik süreçle gerçekleşir. Lenfatik nodların yüksek yoğunlukta peritonel kavitede anatomik yerleşimi omentum, kolonun epiploik apendiksi, diyaframın inferior yüzeyi, falciform ligament, *Douglas* poşu ve ince bağırsak mezenteridir. Bu yerleşim sütlü benekler (milky spot) olarak adlandırılan, serbest kanser hücrelerinin translenfatik yayılımıyla ilişkili olan diğer lenfatik yapıların varlığıyla nitelendirilir[165-167].

Sütlü benekler peritonel membranla teması olan, kapsülsüz, makrofajlarla çevrili, kan ve lenfatik damarlarla desteklenen az sayıda plazma hücreli ve lenfosit bulunduran oldukça küçük yapılardır. Bu yapıların kesin görevi bilinmemekle birlikte lenfatik yapılara benzer oldukları ve peritonel karsinomatozun yayılımına katkıda bulundukları bilinmektedir[168]. Lenfatik stomalar sütlü noktaların içinde bulunmakta ve lenfatik orifisler boyunca peritonel kavitede peritonel makrofajlar mobilize olmaktadır. Peritonun katlarından *Douglas* poşu subperitonel lenfatik damarlar ve sütlü noktalar bakımından zengindir. İntraperitonel sıvı serbest kanser hücreleri bir kere subperitonel lenfatik yapılara ulaştığında rektuma doğru giderler ve son akış iliyak arterin etrafında ki lenf nodlarıdır. Diğer yandan periton karaciğer, ince bağırsağın serözel yüzeyi ve dalağı korur ve bu yapılar lenfatik stomalara sahip değildir. Bu bölgeler peritonel karsinomatozun son evreleriyle ilişkili olarak kanser hücreleri ve tümörleri gösterirler.

Psödomiksoma peritoneide ki peritonel ayrılma mekanizmaları translenfatik süreç olarak nitelendirilir, gastrik ve kolon kanserlerinin ayrımı hem translenfatik hem de transmezoteliyal süreçle belirlenir[169]. Psödomiksoma peritonei, peritonel kavitede bulunan oldukça fazla jelatinöz musin birikimi ve peritonel yüzeylere ve omentuma diffüze müsinöz implantlar olarak karakterize edilir(141).

2.4.1.3 Kolon ve Rektum Kanserlerinde Karaciğer ve Peritonel Karsinamatoz Metastazlarının Karşılaştırılması

Tablo 4: Kolorektal Kanserlerin Karaciğer ve Peritoneal Karsinamotoz Metastazlarının Karşılaştırılması

Sütun1	Sütun2	Sütun3
	Karaciğer Metastazı	Peritonel Metastaz
Yayılma mekanizması	Portal Ven	Peritonel yüzey
Progresyon şekli	Parankimal kütlenin genişlemesi	eksfolasyon
Metastatik etki	Düşük	Yüksek
Primer diyagnozda insidansı	20%	10%
Rekürrenste insidansı	50%	60%
Modern sistemik kemoterapi cevabı	60%	30%

Kaynak: http://www.hindawi.com/journals/bmri/aip/782890/

3 GEREÇ VE YÖNTEM

DEÜ Hastanesi Patoloji ABD arşivinde kolorektal kanser tanısı alıp opere olmuş ve eş zamanlı olarak veya daha sonra PK veya karaciğer metastazı görülen 26 hastanın patolojik dokularının moleküler yöntemlerle sialil transferaz seviyelerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırmamız 2004-2014 yılları arasında DEÜ Hastanesi'de DEÜ Genel Cerrahi ABD'da kolorektal kanser teşhisi ile ameliyat olmuş ve eş zamanlı ya da daha sonraki bir tarihte PK veya karaciğer metastazı görülen hastaların, DEÜ Tıbbi Onkoloji ABD'da tedavisi yapılmış veya hala yapılmakta olan, ameliyat materyalleri DEÜ Patoloji ABD'da bulunan 26 hastanın parafine gömülü doku örneklerinin retrospektif olarak belirlenmesi ve arşiv materyali yeterli olan dokuların moleküler yöntemlerle incelenmesi ile yapıldı. Tanımlayıcı araştırmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma 2012-2017 yılları arasında tez önerisi ve etik kurul onayı alındıktan sonra DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Araştırmanın Evreni Ve Örneklemi/ Çalışma Grupları

2004-2014 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD'da opere edilmiş ve Patoloji Anabilim Dalı'nda kolon ve rektum tümörü tanısı almış, eş zamanlı veya daha sonra ki zaman diliminde karaciğer ve/veya peritonel karsinomatoz metastazı bulunan, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Tibbi Onkoloji Polikliniği'nde tedavi görmüş olgular dahil edildi. Tanımlanan olguların patolojik arşiv materyalinden multipleks PCR array için uygun ve yeterli RNA izole edilebilen 26 olgunun normal kolon mukozası, primer kolorektal kanser dokusu, karaciğer metastazı ve peritoneal karsinomata dokuları ile araştırma sürdürüldü. Sekiz hasta örneğinde RT-PCR ile doğrulama yapıldı.

3.4 Çalışma Materyali

Çalışmaya primer ameliyatını ve metastaz oluşumundan sonraki ameliyatını eş zamanlı olarak veya tekrarlayan ameliyatlarla Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde olmuş olguların parafin bloklarından elde edilen hemotoksilen eozin boyalı preperatlardan

tümör yüzdesi değerlendirildikten sonra, tümör dokusu moleküler çalışma için yeterli olan bloklar seçilmiştir. Seçilen olguların parafin bloklarından Temel Onkoloji ABD tarafından sağlanan steril 1,5 mL hacimli mikrosantrifü tüplerine (*Citotest, Ref.no:*34730015S, Çin) ve polilizinli lamlara (*İsotherm objekttrager ca.75x25 mm/3x1 inch Geputzt/Gebrauchsferting Positive charged,Almanya*) 10 mikronluk kesitler *Sakura mikrotom ve father* (kod:4980) mikrotom bıçağı kullanılarak kesitler alınmıştır.

3.4.1 Parafine Gömülü Doku Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

Dokuların formalinle fiksasyonu ve parafine gömülmeleri sonrasında nükleik asitler çok fazla parçalandıkları gibi formaldehit tarafından kimyasal modifikasyona da uğrarlar. Fragmentasyon derecesi örnek tipi ve yaşına bağlı olduğu gibi fiksasyon koşullarına, gömme işlemine ve saklanma koşullarına da bağlıdır.

Parafine gömülü dokudan RNA izolasyonu için; öncelikle tüm parafinin dokudan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla Deparafinizasyon Solüsyonu kullanılabileceği gibi alternatif metotlarda uygulanabilir. Bu basamaktan sonra dokudan RNA elde edebilmek için proteinaz K içeren lizis buferda örnekler inkübe edilir. Yüksek sıcaklıkta kısa bir inkübasyon yaparak formalinin nükleik asitlerle olan çapraz bağı kısmi olarak serbestleşebilir. Bu işlem de RNA yeterliliği ve kalitesi önem taşır. Daha sonra uygulanacak işlemle DNaz uygulaması yapılarak tüm genomik DNA'nın örnekten uzaklaştırılması sağlanır. Uzun süreli parafinde kalmış dokularda bu işlem tüm DNA'nın uzaklaştırılmasını sağlar. DNA'nın uzaklaştırılması ile lizat Bufer RBC ile karıştırılır. Etanol eklenir. Bu işlem RNA'nın kolonlara bağlanma koşulunu sağlar. Örnek RNA'nın tamamiyle membrana bağlanacağı ve kontaminantların yıkanarak uzaklaştırılacağı RNeasy MinElute Spin kolona gönderilir. RNaz serbest su ile yıkanarak RNA ayrılır.

Tümör doku ve çevresinden izole edilmiş parafin doku slaytlarından RNA izolasyon kiti (*Qiagen,USA cat no* 73504) ile RNA elde edilmiştir.

3.4.2 RNA İzolasyon Protokolü

1. 10 mikronluk kesitler 2mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp ağızları kapatıldı.
2. 320 µL Deparafinizasyon solüsyonu (Rkat.no:19093, qiagen) eklenerek 10 saniye boyunca vortekslendi, örnek tüpün ortasına gelir gelmez satrifüj durduruldu.
3. 56°C'da 3 dakika boyunca inkübe edilerek oda sıcaklığına kadar soğutuldu.

4. 240µL PKD Buffer eklenerek vorteksle karıştırıldı.

5. 11000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi

6. Süpernatant atıldıktan sonra 10µL proteinaz K eklenerek pipet ucu yardımıyla nazikçe karıştırldı.

7. Önce 56°C'da 15 dakika boyunca sonra 80°C'da 15 dakika boyunca inkübe edildi. (Örnekler 80°C'lık benmariye konulmadan önce benmari sıcaklığı 80°C'a getirildi.)

8. Süpernatant atılarak, aşağıda kalan renksiz faz yeni 2 ml santrifüj tüpüne alındı.

9. Buz üzerinde 3 dakika bekletildikten sonra 13500 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi

10. Pellet bozulmadan nazik bir şekilde süpernatant yeni santrifüj tüpüne aktarıldı.

11. 25µL DNaz uzaklaştırıcı DNaz Booster Buffer ve 10µL DNaz 1 stok solüsyonu eklendi. Tüpler ters çevrilerek karıştırıldı. Tüp kenarına likit çözelti çıkana kadar kısa bir süre için santrifüjlendi.

12. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.

13. 500µL RBC buffer eklenerek karıştırıldı.

14. 1200µL etanol(%100) eklenerek örnekler pipet yardımıyla karıştırıldı.

15. Örnek çökelti içermeden RNaz MinElute Spin kolona 2mL'lik koleksiyon tüpleri ile yerleştirildi. Kapağı nazikçe kapatıldı. 10000 rpm'de 15 saniye nazikçe santrifüjlendi.

16. Örnek RNaz MinElute spin kolondan geçirildikten sonra 500µL RPE buffer RNaz MinElute spin kolona eklendi. Kapağı nazikçe kapatılarak 15 saniye, 10000 rpm'de santrifüjlendi. Akış boyunca ayırma gerçekleştirildi.

17. 16. Basamak aynı şekilde tekrarlandı.

18. Yeni 2 mL tüplerin yerleştirildiği RNaz MinElute spin kolon 5 dakika boyunca en yüksek santrifüj hızıyla santrifüjlendi. Akış boyunca koleksiyon ayrılması gerçekleştirildi.

19. RNA'yı ayırmak için yeni 1,5 mL ependorf RNaz MinElute spin kolona yerleştirildi. 14-30µL RNaz serbest su doğrudan membran kolon membranına uygulandı. Kapak nazikçe kapatıldı, 1 dakika boyunca son hızda santrifüj yapılarak RNA ayrıldı.

3.4.3 RNA'nın Miktarının Belirlenmesi

Saflaştırılmış RNA RNaz serbest su içerisinde -15°C'da bir gece bekletildi. RNA konsantrasyonunu 260 nm (A_{260}) spektrometrik ölçümle belirlendi(tablo:6). Küçük miktar

RNA belirlemeleri için QİAxcel Advanced system kullanıldı. Elde edilen total RNA agaroz jel içerisinde yürütüldü.

Anlamlılık açısından emin olmak için; A_{260} okuması 0,15'den büyük olmalıdır. RNA'nın her ml'nin 44 µg'ına karşılık 260 nm'de 1 ünitenin absorbansıdır. Bu ilişki sadece nötral pH'da geçerlidir. Bu yüzden RNA örneklerini nötral pH'da ki bufer ile dilüe etmek gerekir. Absorbans değerlerinin 260 nm ve 280 nm arasında olduğu değerler RNA'nın saflaştırımış olmasının ölçümüdür.

RNA ölçümü yapılırken kullanılan küvetlerin RNaz barındırmaması gerekir. Bu 0,1 M NaOH, 1mM EDTA ile yıkamanın ardından RNaz serbest suyla küvetlerin yıkanmasıyla sağlanır. Spektrometreyi sıfırlamak için kullanılan RNA buffer kullanılarak dilüe edilmelidir. Bu işlem için gerekli prosedür aşağıda sıralanmıştır;

1. Spektrofotometre küvetleri 0.1 M NAOH, 1mM EDTA, ile yıkandıktan sonra RNaz serbest su ile tekrardan yıkandı
2. RNA örnekleri 100µL olarak alındı
3. Dilüsyon 10µL RNA örneği+ 490µl mM Tris Cl, pH=7,0 (1/50 dilüsyon)
4. RNaz serbest küvetlere 1mL örneklerden aktarım yapıldı.

   Elde edilen RNA'lar agaroz jelde yürütüldü(şekil:9).

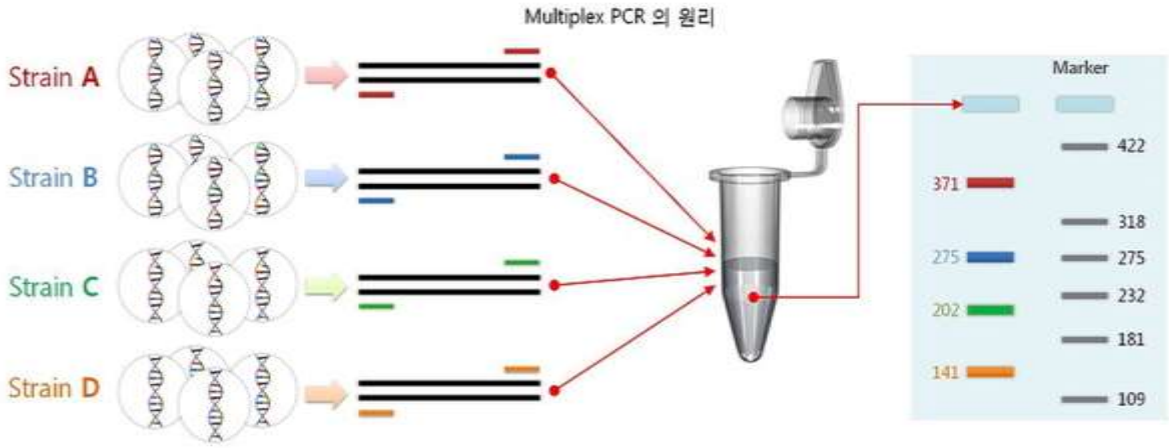
3.4.4 cDNA Elde Edilmesi

Elde edilen total RNA'dan cDNA sentez kiti (Qiagen,USA cat no 330401) ile cDNA sentezlendi. Sentezlenen cDNA'lardan *Multipleks PCR Array* ile costum dizayn sialyl transferazların ekspresyonları değerlendirildi. cDNA kontrolü için elde edilen cDNA'lar agaroz jelde yürütüldü. cDNA kontrolleri yapıldı.

3.4.5 Multiplex PCR ARRAY

16 hedefli *Multipleks PCR* (99-955 bp) ileri optimizasyon veya AII sağlayıcısından hot start DNA polimeraz ile çeşitli koşullar gerekmeden *QİAGEN Multipleks PCR* Kit için standart koşullarda 35 döngüyle uygulanmıştır. Karşılaştırma Mg^{+2} konsantrasyonu indikatörlü ve AII sağlayıcısından hot start DNA polimeraz için her 50 µl için 2.5 ünit kullanılmıştır. Karşılaştırma sağlayıcı AII'dan hot start DNA polimeraz için optimize Mg^{+2} konsantrasyonu (3.5 mM) ve enzim her 50µl reaksiyon miktarı gösterilerek uygulanmıştır. Başarılı sonuçlar *QIAGEN Multipleks PCR* Kit M markırlarla sağlanmıştır(tablo:8).

*Multipleks PCR Master Mix dNTP'*leri, magnezyumu ve hot start taq DNA polimerazı içerir. Optimize reaksiyon koşullarına ihtiyaç duymaz.



Şekil 11: Multipleks Array PCR Kullanımı

Kaynak: Qiagen Multiplex Array Using User Manual

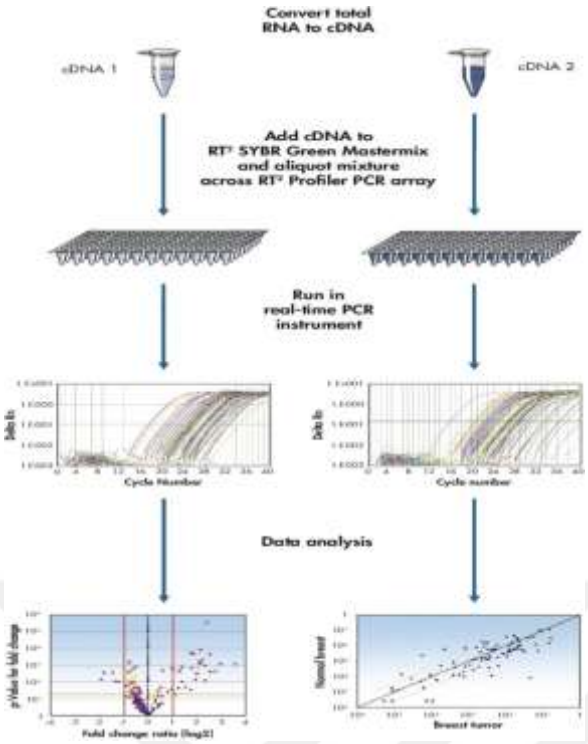
HotStarTaq DNA Polimeraz DNA taq poimerazın modifiye formudur ve çevresel koşullarda polimeraz aktivitesi göstermez. Bu PCR döngüleri arasında beklemede iken oluşan nonspesifik DNA uzamaları ve primer bağlanmalarını engeller. 95°C'de 15' inkübasyonda etki gösterir.

Multipleks PCR Array Bufer özel optimize koşullarda K^{+}, NH^{+4} ve özel PCR katkı maddesi faktör MP içerir. *İnnovatif* bufer her PCR döngüsünde spesik bağlanmayı arttırır.

Q-Solution solüsyon zor koşullarda DNA'nın erime davranışını modifiye ederek *innovatif* PCR'a katkıda bulunur. Non toksiktir. *Multipleks PCR* Kitkullanımı kontaminasyon ve pipetleme hatalarının önüne geçilmesini sağlar. Sonuç karışımına sadece primerin ve örneğin atılması gerekir. (*Qiagen,USA*) Örneklerde anlamlı bulunan genlerin doğrulaması için Q-PCR yapıldı

3.4.6 Q-RT-PCR Uygulaması

Sentezlenen cDNAlardan mültipleks arrayde ifade artışı görülen ST3GAL1, ST6GAL1, ST6GAL2, ST3GAL2 genlerinin ekspresyonlarina bakılması için Eş zamanlı PCR(Q-PCR) yapıldı. Primerler genlere spesifik olarak dizayn edilmis assay primerler olarak (*Qiagen,USA*) alınmıştır. Eş zamanlı PCR için SYBR Green Q-Pcr kiti (Qiagen, USA cat no 330510) kullanıldı. PCRlar için *Rotor Gene (Qiagen, USA)* cihazı kullanılmıştır. Kontrol geni olarak da β-aktin kullanılmıştır.



Şekil 12:RT-PCR Protokolü

Kaynak: Qiagen RT-PCR Kullanım Kılavuzu

3.5 Araştımanın Değişkenleri

Olguların demografik verileri KRK tanısı alma yaşı(50 yaş üstü veya altı), cinsiyeti, primer tümör yeri, primer hücre tipi, metastaz yeri ve sağ kalım süresi dağılımlarına göre belirlendi. Parafine gömülü patolojik dokulardan elde edilen sialil transferaz ekspresyon seviyeleri metastaz yerine göre karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bağımlı değişkeni kolorektal kanser, bağımsız değişkenleri hastanın demografik verileri, metastaz durumu ve sialiltransferaz ekspresyonlarıdır.

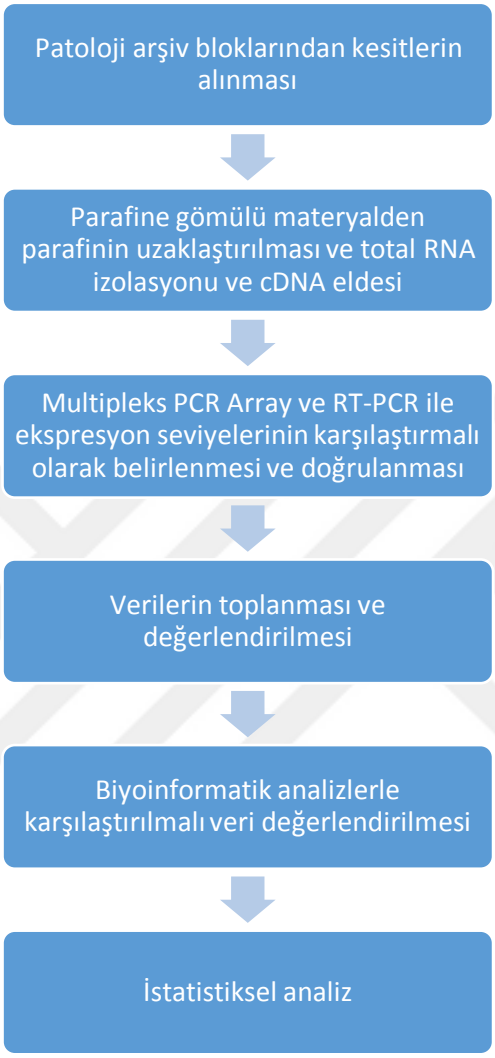
3.6 Veri Toplama Araçları

Araştırmada veri toplama aracı olarak DEÜ Genel Cerrahi ABD'da kolorektal kanser tanısı ile opere olmuş hastaların parafine gömülü primer kolorektal kanser tümör doku örneği ile normal mukoza örneği ve aynı hastanın metastaz dokusuna ait parafine gömülü doku örneklerine ait Cerrrahi, Patloji ve Tibbi Onkoloji arşiv bilgileri ve laboratuvar analiz sonuçlarıdır.

3.7 Araştırma Planı Ve Takvimi

Araştırma planı tablo 5'de şematize edilmiştir.

Tablo 5: Çalışma Şeması



3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Olgu bulgularının veri analizi SPSS 15.0 ile yapıldı. İstatistiksel analiz yöntemi olarak Mann Whitney U testi kullanıldı.

3.9 Çalışmadaki Güçlük Ve Sınırlıklar

Parafin dokudan total RNA izolasyonu ve bunun moleküler yöntemlerde kullanımı güçlükler içermektedir. Özellikle cerrahi operasyon sonrası patolojik incelemeye alınmış dokuların moleküler çalışmalara uygun gömülmemiş olması RNA'nın kalitesini

etkilemektedir. Özellikle bizim çalışmamızda çalışılan grubun sialil transferaz olması ve bunun yansımalarının hücre yüzeyinde gösterimi için metanole gömülü doku gerekliliği çalışmamızda ki en büyük değerlendirme olan sialiltransferazların ekspresyonundan sonra hücre içi kompartmanlarda ve hücre yüzyindeki glikokaliks yapıda sialik asit dağılımının gösteriminin siglekler kullanılarak değerlendirmesini tamamen engellemektedir. Ayrıca kullanılan materyalin RNA olması ve RNazlar ile müdahelenin engellemesi için optimum koşulların gerekmesi ve parafine gömülü dokunun de parafinizasyonu sırasında kullanılan artan alkol basamaklarının RNA'ların kaybına yol açmasıda sonuçları etkilemektedir.

Parafinize dokunun parafine girmeden önceki bekleme süresi hücre profilindeki RNA kaybının diğer bir sebebidir. Bizim çalışmamız retrospektif olması, dokuların daha önceden alınmış olması optimizasyon sağlamamıza başlıca engeli oluşturmuştur.

Çalışmamızdaki diğer bir kısıtlamada hasta sayısının yetersiz olması ve taze doku kullanılamamış olmasıdır. Çalışmamızda değerlendirilen 4 sialiltransferaz 8 hastada yeterli olan RNA örneklemi ile değerlendirilip RT-PCR ile doğrulanmıştır. Bu durum çalışmanın gücünü düşürmektedir. Gelecekte daha fazla sayıda hastada taze materyal kullanılarak yapılacak çalışmalar sialil transferazların ekspresyonlarındaki değişikliklerin ve diğer EMT molekülleri ile etkileşimlerinin daha ortaya konmasını sağlayabilir, böylece KRK'in metastatik fenotipinin daha iyi karakterize edilmesine katkı sağlayabilir.

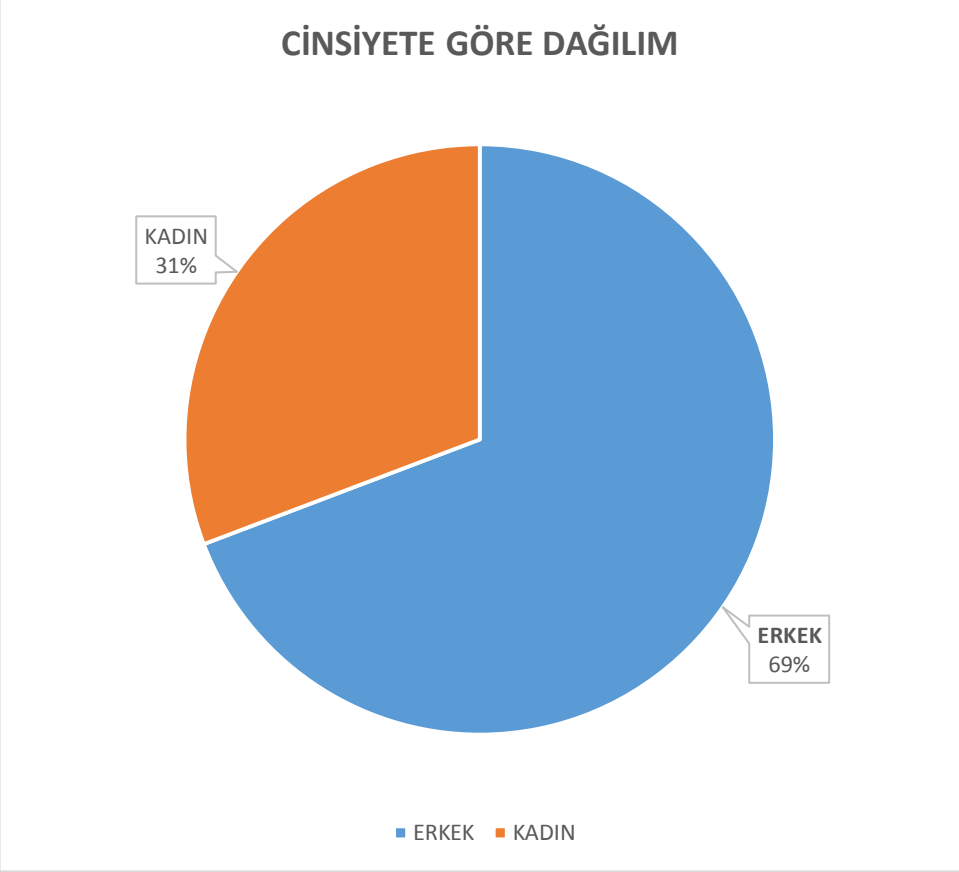
4 BULGULAR

4.1 Demografik Veriler

2004-2014 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı'nda kolorektal kanser ve buna bağlı karaciğer veya PK metastazı ameliyatı yapılmış, DEÜ Patoloji Anabilim Dalı'nda KRK tanısı almış, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nda izlenen ve patoloji tanıları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda konulan 26 olgu çalışmaya alındı. Yirmi altı olgudan genotip analizine uygun miktar ve kalitede DNA elde edildi.

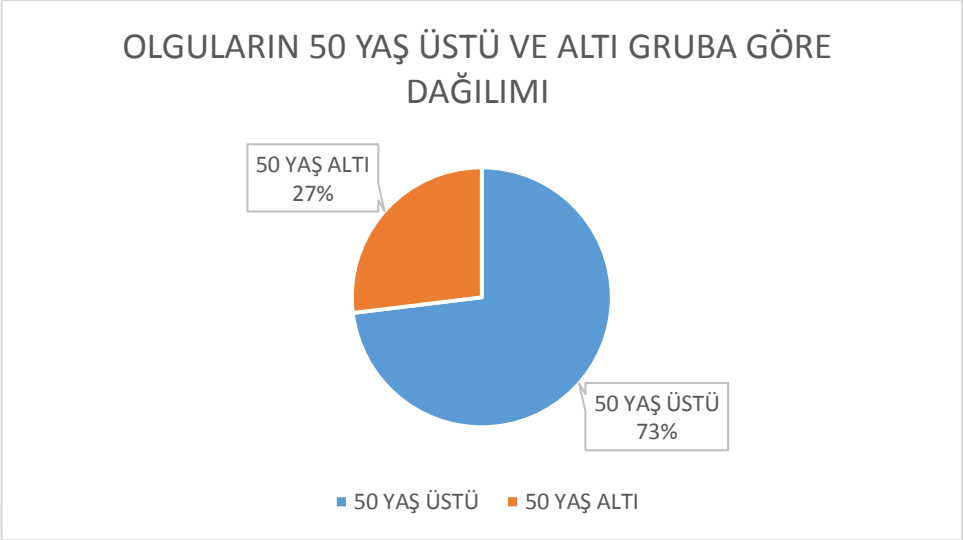
26 Olgunun n=18(%69)'i erkek, n=8(%31)'i kadındır(tablo:6).

Tablo 6:Olguların Cinsiyete Göre Dağılımı



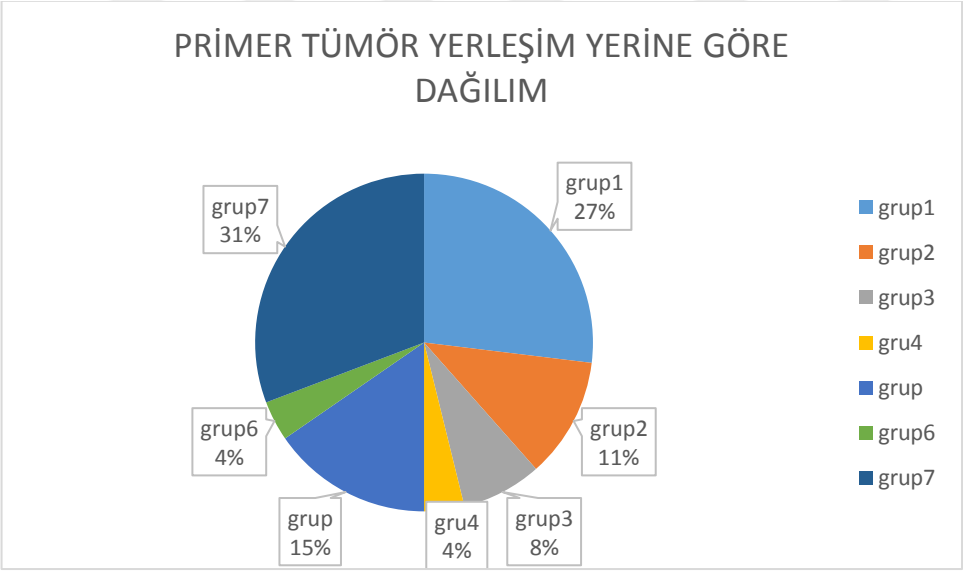
Olguların yaşları 31 ile 89 arası olup median yaş 47 idi. Olgular yaş grubu olarak 50 yaş altı ve 50 yaş üstü olarak iki grupta değerlendirildi. Olguların %73'ü 50 yaş üstü, %27'si de 50 yaş altında idi (tablo:7).

Tablo 7: Olguların 50 Yaş Üstü ve Altı Gruba Göre Dağılımı



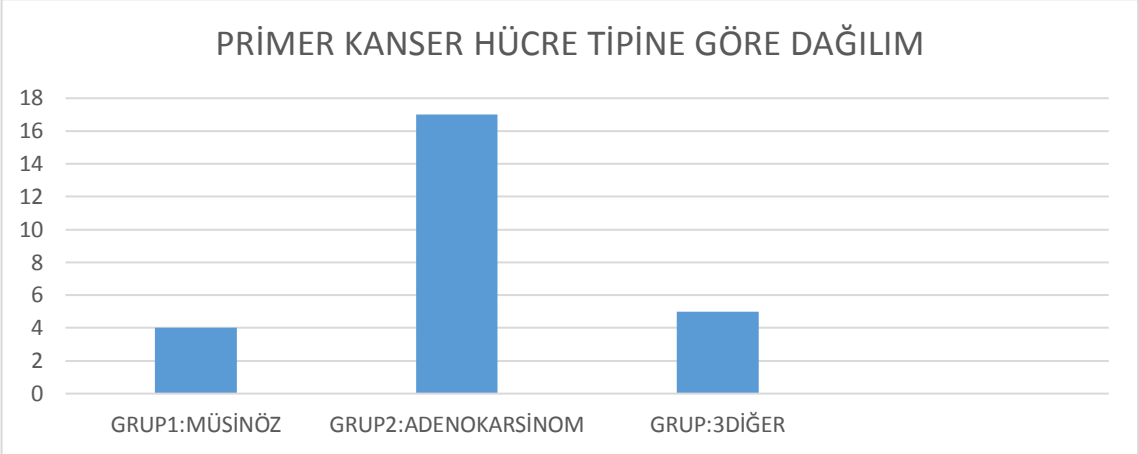
Tümör yerleşim yerleri;grup1: Çekum(%26.9), grup2: Sağ Kolon(%11.5), grup:3 Splenik Fleksura(%7.7), grup4: İnen kolon(%3.8), grup5: Rektosigmoid kolon(%3.8), grup 6: Sigmoid Kolon(%15.4), grup, grup7: Rektum(%30.8) olarak bulundu(tablo:8).

Tablo 8: Primer Tümör Yerleşim Yerine Göre Dağılım



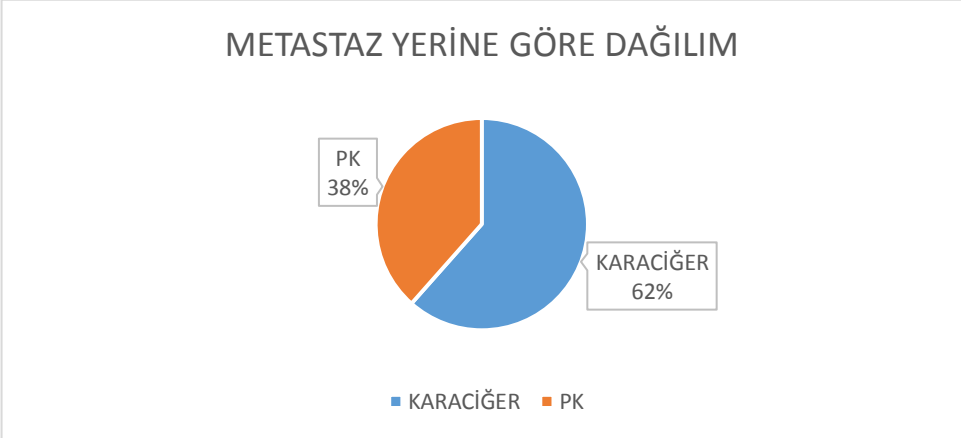
Primer tümörün histolojik tipine göre olguların %15,4'ünde müsinöz tipli hücre(grup:1), % 65.4'ünde adenokarsinom(grup:2), %19.2'sinde diğer hücre tipleri görüldü(tablo:8).

Tablo 9:Primer Kanser Hücre Tipine Göre Dağılım



Olguların metastaz dağılımları değerlendirildiğinde 10 (%38)'nunda peritoneal karsinomatoz, 16 (%62)'sında da karaciğer metastazı(16) olduğu yaptığı belirlendi(tablo:10).

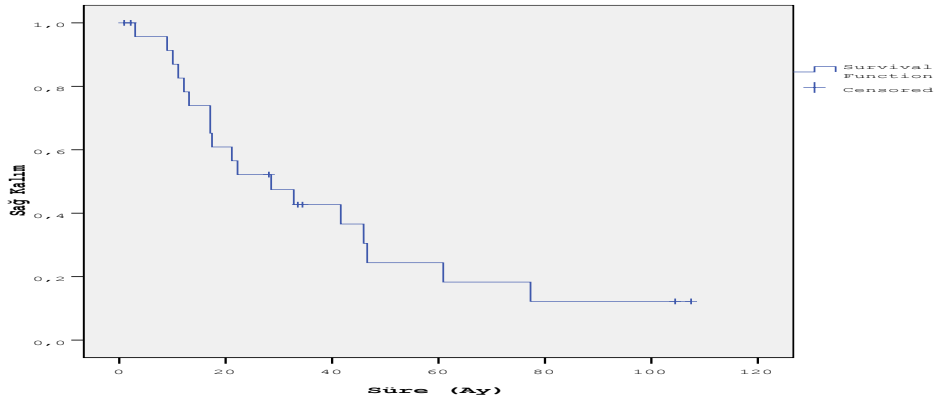
Tablo 10: Olguların Metastaz Yerine Göre Dağılımı



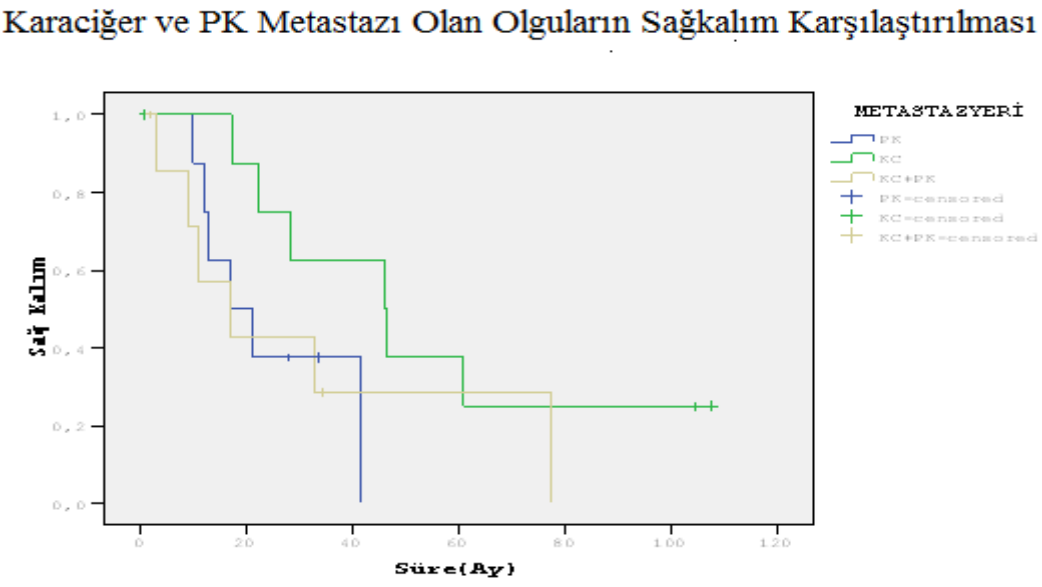
4.2 Sağ Kalım Analizleri

Tüm grupta 1-yıllık sağ kalım oranı %82, 2-yıllık sağ kalım oranı %52 ve 5-yıllık sağ kalım oranı %24 olarak bulunmuştur(tablo:11). Karaciğer metastazı olan olgularda sağkalım, PK metastazı olan olgulardan daha uzun olmasına karşın, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Tablo 11: Tüm Grubun Sağ Kalım Eğrisi

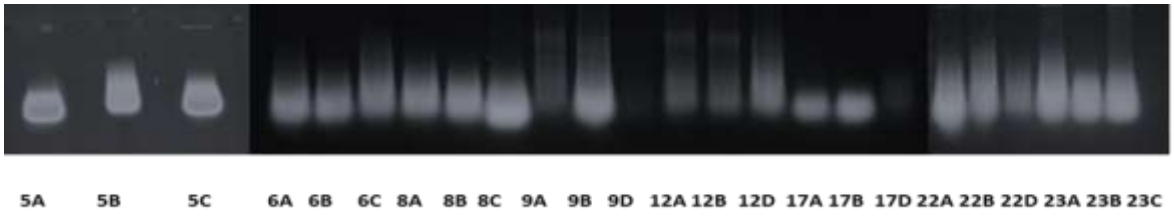


Tablo 12: Karaciğer ve PK Metastazı Olan Hastaları Sağ Kalımının Karşılaştırılması



4.3 Total RNA Eldesi ve Değerlendirilmesi

Parafin bloklardan elde edilen RNA değerlendirmesinde örnek konsantrasyonu 100ng/µl'den fazla olanlar olguların seçilmesiyle, ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2 RNA'larının pürifikasyon işlemleri tamamlandıktan sonra %1'lik agaroz jelde 100V 1X TBE buffer ile yürütüldü(şekil:13). RNA kalite ölçümü spektro-fotometrik olarak yapılmıştır, bulgular tablo 11'de verildi.



Şekil 13:Elde Edilen RNA'lar %1'lik Agaroz Jelde Yürütülmüştür(100V ve 1X TBE buffer içerisinde)

Tablo 13: Total RNA Kalite Kontrolünün Spektro-Fotometrik Ölçümleri

Samples	A230	A260	A280	A260/A280	A260/A230	Concentration
5A	15.718	28.141	15.079	1.866	1.79	1407.04
5B	7.548	14.898	7.171	2.077	1.974	744.91
5C	18.584	33.377	18.907	1.765	1.796	1668.84
6A	16.393	30.542	16.949	1.802	1.863	1527.11
6B	11.079	20.484	11.554	1.773	1.849	1024.22
6C	14.566	23.469	13.846	1.695	1.611	1173.47
23A	12.704	24.203	12.199	1.984	1.905	1210.16
23B	8.618	16.539	8.442	1.95	1.919	826.97
23C	15.33	28.451	15.734	1.808	1.85	1422.56
8A	15.01	25.551	14.525	1.759	1.702	1277.55
8B	8.372	16.417	7.58	2.166	1.961	820.83
8C	30.686	49.305	31.404	1.57	1.612	2465.27
12A	3.873	7.299	3.7	1.973	1.884	364.93
12B	3.096	6.046	3.002	2.014	1.953	302.31
12B	3.044	6.014	2.851	2.11	1.976	300.72
12D	6.44	12.305	5.73	2.147	1.911	615.25
9A	3.072	5.873	3.024	1.942	1.912	293.65
9B	18.574	34.428	18.445	1.867	1.854	1721.39
9D	0.009	1.234	0.563	2.193	1.962	61.68
17A	2.965	5.613	2.558	2.194	1.863	280.63
17B	7.84	14.648	7.215	2.03	1.868	732.41
17D	0.423	2.248	0.909	2.474	1.58	112.38
22A	18.294	33.969	19.041	1.784	1.857	1698.44
22B	7.809	15.052	7.832	1.922	1.928	752.62
22D	2.262	4.186	2.291	1.827	1.85	209.29

cDNA eldesinin değerlendirilmesi elde edilen cDNA'ların agaroz jelde yürütülmesi ve spektro-fotometrik ölçümle ile yapıldı(şekil14). Örnekler spektro-fotometrik olarak değerlendirildi(tablo:12).



Şekil 14: Elde Edilen cDNA'lar %1'lik Agaroz Jelde yürütülmüştür(100V 1X TBE bufer içerisinde)

Tablo 14: cDNA'ların kalite kontrolünün Spektro-Fotometrik Ölçümü

Samples	A230	A260	A280	A260/A280	A260/A230	Concentration
5A	1.74	3.375	1.59	2.123	1.939	168.76
5B	2.398	4.912	2.375	2.068	2.048	245.58
5C	3.019	6.032	2.898	2.081	1.998	301.59
6A	2.881	5.818	2.812	2.069	2.02	290.9
6B	2.518	5.088	2.48	2.052	2.021	254.41
6C	2.7	5.313	2.601	2.043	1.968	265.67
23A	2.605	5.145	2.574	1.999	1.975	257.23
23B	2.406	4.901	2.317	2.115	2.037	245.03
23C	3.025	6.06	2.97	2.04	2.003	302.99
8A	2.134	4.376	2.119	2.065	2.051	218.78
8B	2.808	5.636	2.897	1.946	2.007	281.82
8C	2.075	4.258	2.127	2.002	2.052	212.91
12A	2.073	4.257	2.086	2.04	2.053	212.83
12B	2.124	4.364	2.164	2.017	2.054	218.19
12D	2.191	4.48	2.158	2.076	2.045	223.98
9A	2.077	4.236	2.085	2.031	2.04	211.79
9B	2.24	4.534	2.228	2.035	2.024	226.68
9D	2.24	4.534	2.228	2.035	2.024	226.68
17A	2.493	5.064	2.457	2.061	2.032	253.22
17B	2.16	4.411	2.116	2.085	2.043	220.57
17D	1.939	3.978	1.979	2.011	2.052	198.91
22A	2.799	5.571	2.74	2.033	1.99	278.56
22B	2.448	4.923	2.427	2.029	2.012	246.16
22D	2.869	5.722	2.863	1.999	1.994	286.12

4.4 Sialil Transferaz Ekspresyon Sonuçları

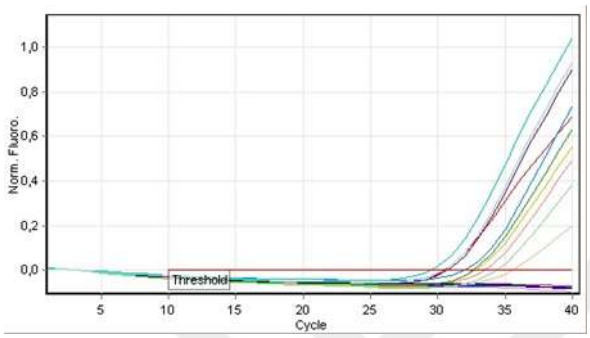
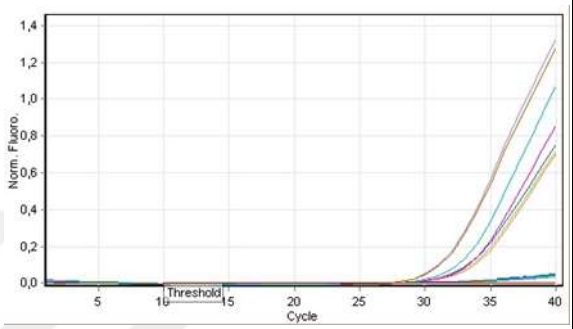
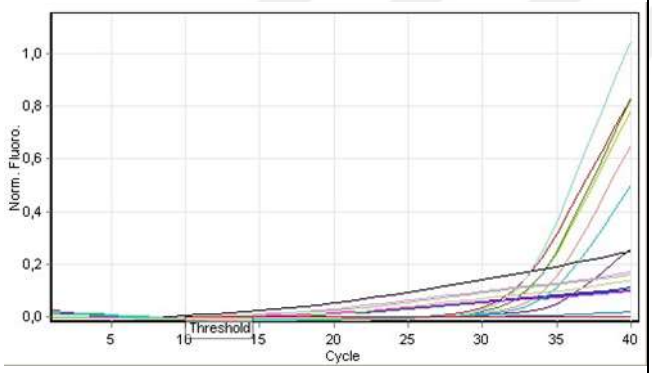
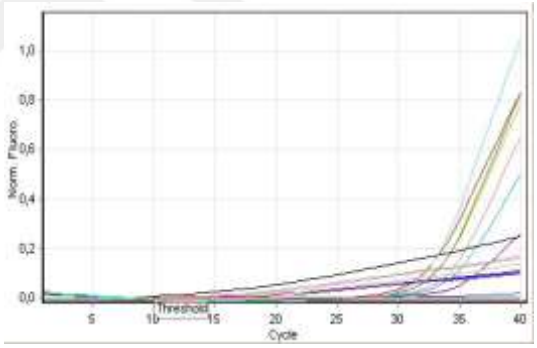
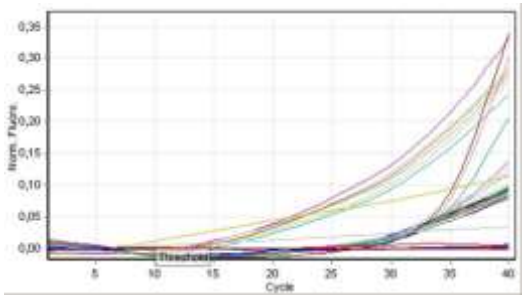
Çalışmamızda yer alan 26 hastanın örneklerinde sialil transferazların ekspresyonları multipleks PCR array tekniğiyle ile değerlendirildi. Arrayde görülen artışlar eşliğinde ekspresyon değerleri anlamlı bulunan dört sialil transferaz, Q-RT-PCR metodu ile eş zamanlı olarak çoğaltılarak değerlendirildi. Gen ekspresyon değerlendirilmesinde house keeping gen olarak β-katenin ekspresyonu kullanıldı(tablo:15).

Tablo 15: β-aktin House Keeping Genine Göre Delta Ct değerleri

Delta Ct DEĞERLERİ	Sütun1	ST3GAL1	ST3GAL2	ST6GAL1	ST6GAL2
(b-actin'e göre)					
5A	KOLON PRİMER	0.65	6.16	-6.59	-6.92
6A	KOLON PRİMER	-7.72	5.47	-8.27	-7.65
8A	KOLON PRİMER	9.69	6.49	5.49	-7.04
9A	KOLON PRİMER	21.12	17.82	16.77	3.18
12A	KOLON PRİMER	2.67	15.86	6.17	2.94
17A	KOLON PRİMER	-7.1	5.53	-5.31	-6.63
22A	KOLON PRİMER	26.63	17.91	7.35	4.3
23A	KOLON PRİMER	15.82	5.53	-8.44	-7.92
5B	NORMAL MUKOZA	11.79	5.47	12.88	-7.34
6B	NORMAL MUKOZA	-7.7	5.46	-7.8	-7.34
8B	NORMAL MUKOZA	8.58	2.42	3.03	-10.58
9B	NORMAL MUKOZA	1.11	6.09	-8.97	-6.68
12B	NORMAL MUKOZA	23.18	17.05	16.25	2.67
17B	NORMAL MUKOZA	-7.05	5.92	-7.47	-7.15
22B	NORMAL MUKOZA	9.85	2.16	-11.63	-11.48
23B	NORMAL MUKOZA	13.19	4.26	11.47	-9.14
5C	KC MET	-5.88	7.17	-6.76	-5.44
6C	KC MET	-7.46	5.47	0.03	-6.64
8C	KC MET	0.96	6.45	-2.98	-6.91
23C	KC MET	1.02	5.48	-7.77	-7.38
9D	PK MET	20.39	15.91	14.53	0.6
12D	PK MET	12.55	6.66	6.79	-6.5
17D	PK MET	7.98	5.77	5.44	
22D	PK MET	20.56	17.37	17.69	3.3

Çalışmamızda gen ekspresyonu artış değeri *Multipleks PCR Array* ile belirlenmiş Sialil transferazların olgu gurubundaki Q-RT-PCR ile doğrulanan sonuçları değerlendirildi(tablo:16).

Tablo 16: ST3GAL2, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2'nin Q-RT-PCR ile Değerlendirilmesi ve β-aktin House Keeping Genle Karşılaştırılması

ST3GAL1 	**ST3GAL2** 
ST6GAL1 	**ST6GAL2** 
B-aktin	

Olguların cT değerleri ile birlikte değerlendirmesi yapıldığında; ST3GAL1, ST3GAL2 ve ST6GAL1 ekspresyon seviyeleri PK metastazında artmış olarak bulundu. Karaciğer metastaz dokusunda ST3GAL1, ST3GAL2 ve ST6GAL1 ekspresyon seviyeleri azalmış olarak bulundu(tablo:17-18).

Tablo 17: Olgu Gruplarında; Normal Mukoza, Primer Doku, Karaciğer Metastaz Dokusu, Periton Metastaz Dokusu ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2 Sialil Transferazların Ekspresyon Düzeyleri(Ct Value)

Ct DEĞERLERİ	NORMAL MUKOZA	PRİMER TÜMÖR DOKUSU	KARACİĞER METASTAZ DOKUSU	PERİTON METASTAZ DOKUSU
	MEAN + SD	MEAN + SD	MEAN + SD	MEAN + SD
ST3GAL1	27.23	24.39	17.53	31.17
	8.9	9.6	4.2	1.2
ST3GAL2	26.72	26.77	26.52	27.23
	0.27	0.44	0.31	0.29
ST6GAL1	21.58	17.57	16.00	26.92
	9.20	5.25	3.18	0.49
ST6GAL2	13.48	13.45	13.78	13.01
	0.34	0.30	0.23	0.56

Tablo 18: Olguların Normal Mukoza Primer Tümör Dokusu Karaciğer Metastaz Dokusu Ve Periton Metastaz Dokusu Sialil Transferaz Düzeylerinin House Keepinb Beta Aktine Göre Düzeltilmiş Değerleri

Delta Ct DEĞERLERİ (β-actin'e göre)	NORMAL MUKOZA	PRİMER TÜMÖR DOKUSU	KARACİĞER METASTAZ DOKUSU	PERİTON METASTAZ DOKUSU
ST3GAL1	6.62	7.72	-2.84	15.37
ST3GAL2	6.10	10.09	6.14	11.42
ST6GAL1	0.97	0.89	-4.37	11.11
ST6GAL2	-7.13	-3.22	-6.59	-0.86

4.5 Normal Kolon Mukozası Ve Primer Tümör Dokusunun Karşılaştırılması

Çalışmamızda yer alan 26 hastanın sialil transferaz ekspresyonları yalnızca 8 olguda Q-RT-PCR ile valide edilebildi. Elde edilen sonuçlara göre primer tümör dokusu ve normal mukozada eksprese olan sialil transferazların karşılaştırılması; ST3GAL1(fold change 1.16), ST3GAL2 (fold change 1.65) ve ST6GAL2 ekspresyonu (fold change 0.45) artmış olarak bulundu. ST3GAL2 artışı istatistiksel olarak anlamlı(P=0.038 Mann Whitney U testi) bulundu.

4.6 Karaciğer Metastaz Dokusu İle Normal Mukoza Karşılaştırılması

Çalışmamızda PCR değerlendirmesi yapılan 8 hastanın 4'ünde karaciğer uzak metastazı mevcuttur. Yapılan biyoinformatik değerlendirme sonucu karaciğer metastaz dokusunda normal mukozaya göre sialil transferazların ifadelenme değerleri; ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ekspresyonları azalmış olarak bulundu. Ancak istatistiksel fark bulunmamaktadır.

4.7 Peritonel Karsinamatoz Metastazları Normal Mukozaya Göre Karşılaştırılması

Biyoinformatik analizlerle verilerin karşılaştırılmalı değerlendirilmesi sonucu PK metastazlarının normal mukoza ile karşılaştırılmasında değerlendirilen sialil transferazlar, ST3GAL1, ST3GAL2 ve ST6GAL1 ekspresyon seviyeleri artmış bulundu Sonuçlar ST3GAL2 (fold change: 1.87) istatistiksel olarak anlamlı bulundu; (p=0.028). Diğer enzimlerde istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışlarına rağmen ekspresyon seviyelerinde artış görüldü.

4.8 Karaciğer Metastazlarının Primer Tümörle Karşılaştırılması

Patolojik dokulardan elde edilen cDNA'ların RT-PCR ile karşılaştırma bulgularının değerlendirilmesinde ilk olarak hastanın primer tümörü ile karaciğer metastazlarında hastanın kendi primer tümörüne karşı; değerlendirilmiş olan ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2'de ekspresyonlar azalmış olarak bulundu. Ancak istatistiksel fark bulunmamaktadır.

4.9 Peritoneal Karsinamatoz Metastaz Dokusunun Primer Tümörle Karşılaştırılması

PK metastazlarında hastanın kendi primer tümörüne karşı incelenen sialil transferazlarda artış bulunmaktadır. ST6GAL1 (fold change 12.48) artışı istatistiksel olarak anlamlıdır (P=0.016)

4.10 Peritoneal karsinamatoz Metastazları İle Karaciğer Metastazlarının Karşılaştırılması

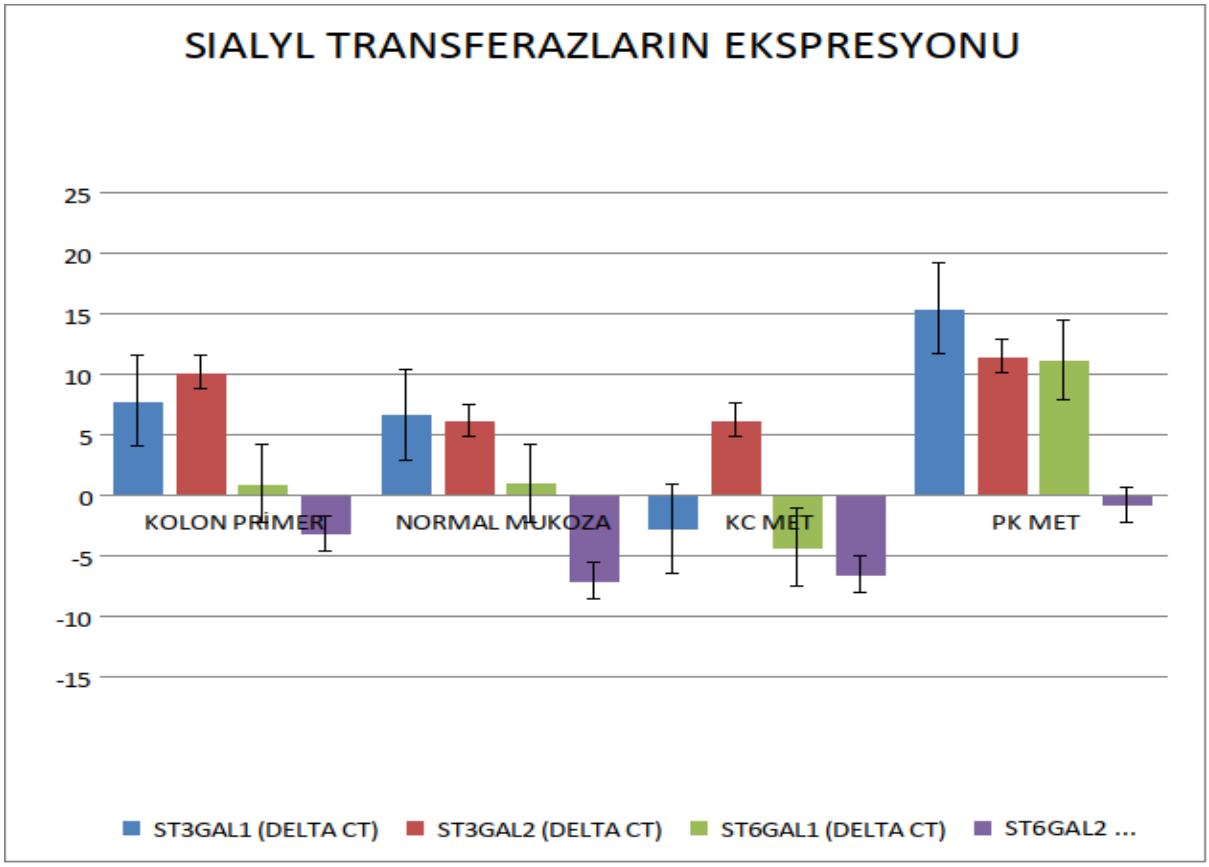
Metastaz tümörlerinde sialil transferazların karşılaşmalı değerlendirilmesi yapılmıştır. Karaciğer metastaz tümörü ve PK metastaz tümörleri karşılaştırıldığında, PK'da ST6GAL2 hariç hepsinin ekspresyonları artmış olarak bulundu. Bu karşılaştırma sonuçlarında ST3GAL1 (P=0.029, fold change 12.53), ST6GAL1 (P=0.029, fold change 4.52), istatistiksel olarak anlamlıdır. ST3GAL2 (P=0.057) Örnek sayısının azlığı nedeniyle sınırda anlamlılık bulunmaktadır(tablo:19).

Karaciğer metastazlarında ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2 ekspresyonları normal mukozaya karaciğer metastazlarında ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2 ekspresyonları normal mukozaya göre ve hastanın kendi primer tümörüne göre azalırken, periton metastazlarında artmaktadır. Periton metaztazlarında karaciğer metastazlarına göre olan bu artış ST3GAL1 (P=0.029), ST3GAL2(P=0.057) ve ST6GAL1(P=0.029) için istatistiksel olarak anlamlıdır(tablo: 19).

Tablo 19:Peritonel Karsinomatoz Metastaz Dokısu ile Karaciğer Metastaz Dokusunda ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2 Sialil Transferazların Karşılaştırılması

Sütun1	Sütun2	KC MET	PK MET
ST3GAL1	PRİMER TÜMÖRE GÖRE	-	+
	NORMAL MUKOZAYA GÖRE	-	+
ST3GAL2	PRİMER TÜMÖRE GÖRE	-	+
	NORMAL MUKOZAYA GÖRE	NA	+
ST6GAL1	PRİMER TÜMÖRE GÖRE	-	+
	NORMAL MUKOZAYA GÖRE	-	+
ST6GAL2	PRİMER TÜMÖRE GÖRE	-	+
	NORMAL MUKOZAYA GÖRE	NA	+

Tablo 20: Kolon Primer Dokusunda Normal Mukozada Karaciğer Metastaz Dokusunda ve PK Dokusunda ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2'nin Ekspresyon Seviyelerinin Grafiği



Çalışmamızda sialil transferazların karşılaştırılması yapıldığında; ölçümlendirilmiş olan ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1 ve ST6GAL2 sialil transferazların ekspresyon seviyelerinin artışının histogram değerlendirilmesi gösterilmiştir(tablo:20).

5 TARTIŞMA

Çalışmamızda tümör oluşumunda uzun zamandır bilinen değişikliklerden glikokaliks değişiminin en önemli moleküllerinden biri olan sialik asitin hücre yüzeyindeki miktarını ortaya koyan sialil transferazların miktarını araştırdık. Kolon kanserinin metastazında yöneliminin sialik asitlerin bağlanma şekilleri ve sialik asit yüküyle bağlantısının sorgulandığı çalışmamızda. Kolorektal klanserin PK metastazında sialik asitlerin ve bağlanma şekillerinin ve ayrıca sialil transferazların (ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1) artışının anlamlı olabileceğini gösterdik. Yine kolorektal kanserin karaciğer metastazı sırasında aynı enzimlerin ekspresyon seviyelerinde ki azalma bu bağlamda sialil transferazların ve sialik asit miktarının kolorektal kanserin metastatik fenotipini açıklamada yardımcı olabilir.

İntegrinler hücrenin ekstrasellüler matrikse sitoiskeloton aracılığıyla bağlanması için gerekli hücre yüzeyi transmembran proteinleridir. İntrasellüler sinyal transdüksiyonunda ve proliferasyon, diferansiyasyon, apoptoz ve hücre migrasyonu gibi çeşitli süreçlerde önemli rolleri vardır. Birçok integrin büyük oranda sialik asit taşır ve bu yapının değişmesi hücre hücre ve hücre matriks etkileşimini değiştirir[45, 170-172]. "Muller" ve arkadaşları meme tümörlerinde tümörün başlaması ve proliferatif derecenin devamı için β1 ekspresyonunun kritik olduğunu ortaya koymuşlardır[173]. Bu çalışmayı baz alarak "Hedlund" ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ST6GAL1 null farede β1 integrin seviyelerinde artış görülmesine rağmen herhangi bir morfolojik değişim görülmemiştir[174]. Bu çalışma tümör progresyonu açısından bizim çalışmamızda görülen ST6GAL1 ekspresyonunun PK metastazında artışı ile koreledir. Primer tümörden ve normal mukozadan farklı olarak PK implantlarında ST6GAL1 artışı β1 integrin aracılı EMT ve hücre motilitesinin artışına sebep olarak düşünülebilir.

"Dall'Olio" ve arkadaşlarının yapmış olduğu kolon kanseri üzerine olan çalışmada, ST6GAL1'in normal mukozaya kıyasla primer tümör hücresinde oldukça arttığını bulmuşlardır[175]. Gurubun yaptığı diğer çalışmalar ilk çalışmaları ile kolere iken[121, 176, 177]. Bizim çalışmamızda primer tümörle normal mukoza karşılaştırmasında istatistiksel bir artış görülmemiştir, yine aynı grubun yapmış olduğu metastatik fenotipte normal mukoza ve primer tümöre göre artışlar çalışmamızda PK metastaz fenotipinde ST6GAL1 artışının olmasıyla koleredir. Yine aynı çalışmada "Dall'Olio" ve arkadaşlarının göstermiş olduğu

insan KRK hücre hattı Caco-2 de enterosit diferansiyasyonu ST6GAL1 artışıyla birlikte görülmektedir. Fetal ve yeni doğan rat intestinal hücrelerinde ST6GAL1 aktivitesi oldukça yüksekken, sütten kesilmeyle birlikte dramatik olarak azalmıştır[178, 179]. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde kolon hücrelerinin malign transformasyonunda oldukça yüksek ST6GAL1 ekspresyonu yaptığı düşünülmektedir. Çalışmamızda ST6GAL1 seviyeleri primer tümörle normal mukoza karşılaştırılmasında artmış olarak bulunmuştur. ayrıca bizim çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı artış ST3GAL1'de görülmüştür. ST3GAL2'de de artış mevcuttur. Bu bağlamda bakıldığında bizim çalışmamız ve "Dall'Olio" grubunun sonuçları birbirine paralel görülmektedir.

Kolon kanser hücrelere hatlarının adherent olarak büyüdüğü ve eksprese ST6GAL1 eksprese etmediğini ve alt popülasyonda gevşek şekilde tutunan hücrelerde ST6GAL1 aktivasyonunun gözlendiği "Dall'Olio" ve arkadaşlarının çalışması[180] ve *Ehlirch* tümör hücrelerinde bu gözlemin tekrarlanması[181, 182] ST6GAL1'in rolü üzerinde kafa karıştırıcı olsa da; operasyon sonrası alınan dokularda ST6GAL1'in enzim seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olmaması ve bu dokular ksenograft null farelerde üretildiğinde ST6GAL1 seviyelerinin artışı[183] bizim çalışmamızdaki normal mukoza ve primer tümörde görülen ST6GAL1 seviyeleri ile PK metastazında görülen artışla sonuçlarını açıklar niteliktedir.

"Pia Antony" ve arkadaşlarının invaziv mesane tümörleri ve metastatik mesane kanserleri üzerinde yaptıkları çalışmada ST6GAL1 ekspresyon seviyesinde ki azalma[184], ST6GAL1'in metastaik potansiyel ve doku yönelimi açısından varyatnlarının da ayrımı ile değerlendirilerek yeniden çalışılması KRK'nın metastazı hakkında daha fazla bilgiye sahip olunmasını sağlayabilir. Bu çalışma bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında primeri KRK olan kanserlerin metastaz hareketini başlatmada ST6GAL1'in kolon kanserlerine özgüllüğü düşünülebilir.

"Matthew J Schultz" ve arkadaşlarının over kanserlerinde yapmış oldukları hücre kültürü çalışmasında, fazla eksprese olan ST6GAL1'in kaspaz 3 yolağı ile gerçekleşen apoptozu önlediğinin gösterilmiştir[185]. Bizim çalışmamızda NM ile primer tümör arasında ST6GAL1 artışında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen, normal mukoza ve primer tümörde ST6GAL1 ekspresyonlarının karşılaştırılması sonucunda ST6GAL1 artışı görülmüştür. PK metastazında ST6GAL1'in artışı hücrenin motilitesinin

artması ve migrasyonunun bu enzime bağlandırabilmesi ile birlikte yeni lokasyonda implant oluşturmada apoptozdan kaçışı sağlamasınında rolü olduğunu düşündürmektedir.

"Zhongyu Liu" ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada insan peritonel dokusunda ST6GAL1 artmış ekspresyonun TNFR1'in aşırı sialillenmesine sebep olduğu için TNFα ile indüklenen apoptozun önlendiği gözlenilmiştir[113]. Bu çalışmadan çıkan sonuçlar bizim çalışmamızda ortaya koyduğumuz PK metastazında ST6GAL1'in artışının ayrıca apoptozdan kaçışıda etkilemiş olabileceği sorusunu ortaya koymaktadır.

Dall'Olio ve arkadaşlarının KRK hücre hatlarında yapmış olduğu diğer bir çalışmada ST6GAL1 artışı doğrudan aktifleşmiş Ras'la bağımlı olarak bulunmuştur[186]. Kolon hücrelerinde malign dönüşümün gerçekleşmesine katkısı bilinen Ras'ın ST6GAL1 artışı üzerinde ki etkisi bizim çalışmamızda ortaya koyduğumuz PK metastazı ile ilişkili olabilir. Ras aktivitesi sonucu oluşan ST6GAL1 ekspresyon seviyelerinin Ras mutasyonları ile birlikte değerlendirilmesi bu ilişki ile ilgili daha fazla bilgiyi ortaya koymada yardımcı olabilecektir.

"Videira" ve arkadaşlarının mesane kanserinde yapmış olduğu sialil transferaz çalışmasında ST3GAL1 ekspresyonu artışını, musküler invazyon göstermeyen metastatik fenotipte istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aynı çalışmada ürotelyumda ST3GAL1 artışı görülmemiştir. Yine bu çalışmada bening tümörlerde ST3GAL1 seviyesi düşük olarak belirlenmiştir. Çalışmada ST3GAL2 seviyeleri ST3GAL1 ile doğru orantılı bulunmuştur[187]. Bizim çalışmamızda elde etmiş olduğumuz ST3GAL1 ve ST3GAL2 seviyelerinin PK metastazında artışının olması, normal mukoza ile karşılaştırıldığında tümör hücresinde artışın bulunması kolorektal kanserlerde sialil transferaz artışının tümör belirteci açısından değerlendirilebileceğini ve daha ileri çalışmalarlarla metastazının organ yönelimini göstermesi açısından değerlendirilebilir biyomarkır olabileceğini düşündürmektedir.

"Burchell" ve arkadaşlarının ST3GAL1 transgenik mice deneyinde, meme tümörlerinde ST3GAL1'in artışının tümör oluşumunu hızlandırdığı ve ST3GAL1'in fazladan ifadelenmesinin onkogenezde karsinogenezin etkisi değil tümör gelişiminde avantaj sağladığı gösterilmiştir[188]. Bizim çalışmamızda erken tümörigenezde ifadelenme değerleri bakıldığında ST3GAL1 ifadelenmesinde ki artış herhangi istatistiksel bir anlamlılık göstermemekle birlikte ekspreyon seviyesinde artış görülmüştür. Kolon kanseri hücresinin PK

metastazı sırasında ifadelenme artışı göstermesi kolorektal kanserlerde ST3GAL1'in artışının PK metastazında anlamlı olduğunu düşündürmektedir.

Meme kanserinde ST3GAL1'in ekspresyon artışının metastazla ilişkisini göstermek için yapılan çalışmada fazla ifadelenme tipi ve shRNA kullanarak aynı varyantlarda ST3GAL1'in susturulmasının E-selektine bağlanmasında artışla yüksek invazyon ve migrasyon özelliği kazandığı ve ST3GAL1'in invasyonla ilişkili moleküllerin; β1 integrin, COX-2, MMP-9, MMP-2, ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir[189]. Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızda ST3GAL1 ifadesinde artışın metastazı desteklediği sonucuyla koleredir.

"Gu" ve arkadaşlarının 293T ve HeLa S3 hücre hattında yapmış olduğu GnT3 (sailik asiti substratına sialik asidi 1,4 bağlayan sialil transferaz); GnT-3'ün hücre migrasyonuna etkisi, hücrenin eksprese ettiği diğer sialil transferaz paternleri ile yakından ilşkili bulunmuştur. Aynı çalışmada GnT-3'ün fazla ifadelenmesi migrasyon yeteneğini azaltırken, bu ifadelenme artan ST6GAL1 'in ifadelenmesinde artış olduğunda migrasyonu ve metastazı engelleyememiştir. Aynı çalışmada GnT-3 artışının α2,3 sialilasyonu engellediği ortaya konmuştur. Bu çalışma da sonuç olarak α2,6 sialilasyonun artışının GnT3 artışının metastaz önleyici davranışını değiştirebildiği görülmüştür[190]. Bizim çalışmamızda KRK'larda artmış sialil transferaz paterninde PK metastazı oluşturan hücre tipinde GnT-3'de ekspresyon artışı görülmediği gibi ST6GAL1 aracılığıyla α2,6 sialilasyon artışının ve ST3GAL1 ve ST3GAL2' artışının PK metastazının belirteci olabileceği sonucunu destekler yöndedir.

"Bellis" ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada artan ST6GAL1 ekspresyonunun tümöre yakın olan ve normal görülen mukozada da artışının olduğu malign dokuda kript yapılarının oldukça bozulmuş olduğu ve bu dokularda ST6GAL1 ekspresyon artışının oldukça fazla olduğu ortaya konmuştur[191]. Bizim çaışmamızda normal mukozada ST6GAL1, ST3GAL1 ve ST3GAL'nin normal mukozada ekspresyon seviyesi ve tümör dokusunda ekspresyon seviyelerinin birbirine yakın oluşunun nedeni "Bellis" ve grubunun göstermiş olduğu bulgulara bağlı olabilir. Tümör mikroçevresi etkileşimleri ile ilgili daha ileri tetkiklerin yapılması ve bu bölgede metastazla ilişkisi olduğu düşünülen MMP-2 ve MMP-9 gibi faktörler, Fas ve β integrin seviyeleri ve ilişkilerinin değerlendirilmesi bu konuda daha ayrıntılı bilgilere sahip olunmasını sağlayabilir.

Onkogenik ras ekspresyonuna sekonder olarak ST6GAL1 artışı gösteren HD3 hücrelerinde, shRNA kullanılarak ST6GAL1'in ekspresyonunun susturulması ve kanser kök hücre popülasyonunun flow sitometre aracılığıyla değerlendirilmesi için yapılan çalışmada ST6GAL1'in susturulmasının kanser kök hücresi sayısında iki kattan fazla azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir[111]. "Hirabayashi" ve arkadaşlarının indüklenmiş pluripotent kök hücre ile somatik hücre farklılığınında, ips'lerde somatik hücreye göre artmış ST6GAL1 seviyesini gösterdiği çalışma[192] ile birlikte değerlendirildiğinde bizim çalışmamızda bulmuş olduğumuz PK metastazlı hücrelerde ST6GAL1'in artış sebeplerinden birini aydınlatabilir. Ayrıca çalışmamızda görülen normal mukoza ve kanser hücresinde ki ST6GAL1 ekspresyon seviyelerinin birbirine yakın olması, transformasyonun moleküler bazda başlamış hücrelerin morfolojik olarak normal kabulünden kaynaklı olabilir. Bu durum cerrahi sınır belirlemede yeni yöntemlere ışık tutabilir.

"Gu" ve arkadaşlarının G11 hücre hattında yapmış olduğu çalışmada TGF-β ile indüklenen EMT sürecinde ST6GAL1 ve α2,6 sialilasyonun arttığı, ST6GAL1 artışıyla kolere olrak α2,3 sialilasyon paterninde de istatistiksel olarak anlamlı artış gözlendiği ortaya konmuştur[120]. Bu bulgular ST6GAL1'in bizim çalışmamızda göstermiş olduğumuz PK metastaz sürecinde ki artışının sebeplerinden birinin EMT dönüşümüne dahil olması sebebiyle olabileceği sorusunu akla getirmektedir.

"Kannagi" ve arkadaşlarının hücre hattında yaptıkları çalışmada ST3GAL1 ekspresyon seviyesinin artışının $sLe^{x/a}$ seviyesinde ki artışla uyumlu olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada $sLe^{x/a}$ artışına c-Myc katkısının ST3GAL1 transkripsiyonel indüksiyonuyla katkı da bulunduğu gözlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada hipoksik koşullarla ilişkili E-selektin ligandının ST3GAL1 aktivasyonuyla düzenlenerek ekspresyon seviyesinin arttığı gösterilmiştir.[193]. Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla aynı doğrultuda yer almaktadır. $sLe^{x/a}$ uzun zamandır kolorektal kanserlerle ilişkisi bilinen ve metastazda rol aldığı kabul edilen bir antijendir.

"Dall'Olio" ve ekibinin mesane kanser hücre hattında yaptıkları çalışmada; ürotelyum ile karşılaştırıldığında mesane kanserlerinin invazyon gösteren fenotipinde ST3GAL1 seviyesi anlamlı olarak artmış bulunmuştur(yaklaşık 8 kat). ST3GAL2 ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermemiş olsa da normal mukoza ve tümör hücresi karşılaştırıldığında iki kat,

ürotelyumda ve tümörde karşılaştırıldığında ise beş kat artış gösterdiği bulunmuştur. Çalışmada metastatik olmayan ürotelyum tümörigenezinin erken seviyesinde ST6GAL1 seviyesinin artışının tümör oluşumundan sonra normal seviyelere indiğini göstermişlerdir. İnvaziv mesane kanserinde ise ST3GAL1 seviyesinde artışın devam ettiği ve ST3GAL1 ekspresyon seviyesinde ise azalma olduğu gösterilmiştir.[187]. Bizim bulgularımızda ST3GAL1 seviyesinde ki artışın metastaza katısı olduğunu gösterirken, çalışmamızdaki ST3GAL1' artışıyla "Dall'Olio" ve ekibinin mesane kanserinde göstermiş olduğu ST3GAL2'nin azalması, KRK'ların metastazı açısından ST3GAL2'nin anlamlı bir belirteç olabileceği yönünde bir gösterge olabilir. Bu konuda yapılacak ileriki araştırmalar daha fazla bilgi sahibi olunması yönünde gereklidir.

"Hong" ve arkadaşlarının insan keratinosit HaCaT hücre hattında EMT üzerine çalışmalarında; incelemiş oldukları sialil transferazlardan 10 tanesinin; ST3GAL1, ST3GAL4, ST3GAL5, ST3GAL6, ST6GAL1 ve ST6GALNAC1'in ortama TGF-β1yüklendikten dört saat sonra azalma gösterdiğini, ilk 24 saatte sadece ST6GAL6 ve ST6GALNAC1'in azalan seviyeyi koruduğunu, diğer sialil transferazların ekspresyon seviyelerini tekrar eş seviyeye yükselttikten sonra ekspresyon artışının devam ettiğini ve yükselttiklerini ortaya koymuşlardır. Ayrıca ST3GAL2 seviyesinin ilk saatlerde ve devam eden süreçte ekspresyon seviyesini arttırdığını ortaya koymuşlardır[194]. Bu çalışma bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz ST6GAL1 ve ST3GAL2'nin EMT sürecine katkısı yönünde değerlendirilmesi gereken enzimler olabileceği sorusunu düşündürmektedir.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Kolorektal tümörler dünya genelinde kanser mortalitelerinin önde gelen sebeplerindendir. Kolorektal tümörlerin metastaz potansiyeli oldukça fazladır. Kolorektal kanserin metastatik davranışını ortaya koymak için pek çok çalışma halen yapılmaktadır. Bunlar arasında EMT dönüşümünün basamakları aydınlatılarak, teröpatik yaklaşımlar için yeni ilaç hedefleri bulunmasını amaçlayan çalışmalar ön sıralarda yer almaktadır.

Glikomik araştırmalar hücrenin şeker yapılarının anlık değişimlerini ortaya koymaya çalışmaktadır. Glikomik'in değerlendirildiği alanlardan biri de onkolojik çalışmalardır. Kolorektal kanser çalışmalarında yapılmış olan glikomik çalışmaların çoğunluğu hücrede etkileşimde olabileceği diğer molekülleri baz alınarak yapılmıştır. Bizim çalışmamızda hücrenin kimliklenme molekülü olarakta bilinen sialik asitin hücredeki seviyesini gösteren sialil transferazların kolorektal kanser hücresindeki artış seviyelerini ve sialik asitleri spesifik bir şekilde substratına bağlayan sialil transferazların ekspresyon seviyeleri belirlenerek bu sialik asitlerin yapmış oldukları bağ tiplerinin belirlenmeye çalışılması hedeflenmiştir.

Çalışmamızda kolorektal kansere bağlı peritoneal ve karaciğer metastazlarında sialyl transferaz ekspresyonlarının değişkenlik gösterdiği, ST3GAL1, ST3GAL2 ve ST6GAL1'in ekspresyon seviyelerinin peritoneal metastazda arttığı, karaciğer metastazında ise azaldığı saptanmıştır. Bu iki metastaz paterni arasındaki farklılık kolorektal kanserde metastatik fenotipin organ seçiliminde sialil transferazların ve sialik asit bağlanma şekillerinin potansiyel rolünün olduğunu düşündürmektedir. Peritoneal karsinomatozda gözlenen artışlar kolorektal kanser hücresinde PK metastazı yapan hücrelerde sialik asitlerin daha çok α2,3 ve α2,6 sialik asit bağlanmalarının görüldüğü ve bu artışın kolorektal kanser hücresinin peritonel alana yayılmasında belirteç olabileceğini ortaya koymuştur.

Çalışmamızın kısıtlılıkları olarak hasta sayısının yetersizliği ve parafin bloktan çalışılmış olması yani elde edilen materyalin taze dokudan elde edilen materyalle eş kalitede olmaması sayılabilir. Çalışmamızda değerlendirilen 4 sialiltransferaz 8 hastada yeterli olan RNA örneklemi ile Q-PCR ile doğrulanabilmiştir. Bu durum çalışmanın gücünü düşürmektedir. Gelecekte daha fazla sayıda hastada taze materyal kullanılarak yapılacak çalışmalar sialil transferazların ekspresyonlarındaki değişikliklerin ve diğer EMT molekülleri

ile olan etkileşimlerinin ortaya konmasını sağlayabilir, böylece KRK'in metastatik fenotipinin daha iyi karakterize edilmesine katkı sağlayabilir.

7 KAYNAKLAR

1. Fearon, E.R., *Molecular genetics of colorectal cancer.* Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2011. **6**: p. 479-507.
2. Bray, F., et al., *Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study.* The lancet oncology, 2012. **13**(8): p. 790-801.
3. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012.* European journal of cancer, 2013. **49**(6): p. 1374-1403.
4. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2009.* CA: a cancer journal for clinicians, 2009. **59**(4): p. 225-249.
5. Panwalker, A.P., *Unusual infections associated with colorectal cancer.* Review of Infectious Diseases, 1988. **10**(2): p. 347-364.
6. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the'seed and soil'hypothesis revisited.* Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(6): p. 453-458.
7. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition.* The Journal of clinical investigation, 2010. **120**(5): p. 1786.
8. Geiger, T.R. and D.S. Peeper, *Metastasis mechanisms.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2009. **1796**(2): p. 293-308.
9. Fidler, I.J. *Critical determinants of metastasis.* in *Seminars in cancer biology*. 2002. Elsevier.
10. Chaffer, C.L. and R.A. Weinberg, *A perspective on cancer cell metastasis.* Science, 2011. **331**(6024): p. 1559-1564.
11. Saeland, E., et al., *Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumour tissue of colon cancer patients.* International Journal of Cancer, 2012. **131**(1): p. 117-128.
12. Bowden, N.A., et al., *Regulators of global genome repair do not respond to DNA damaging therapy but correlate with survival in melanoma.* 2013.
13. Lau, K.S. and J.W. Dennis, *N-Glycans in cancer progression.* Glycobiology, 2008. **18**(10): p. 750-760.
14. Hakomori, S.-i., *Glycosynaptic microdomains controlling tumor cell phenotype through alteration of cell growth, adhesion, and motility.* FEBS letters, 2010. **584**(9): p. 1901-1906.
15. Balog, C.I., et al., *N-glycosylation of Colorectal Cancer Tissues A LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY-BASED INVESTIGATION.* Molecular & Cellular Proteomics, 2012. **11**(9): p. 571-585.

16. Tideman, H., *Quantitative glycohistochemistry defines new prognostic markers for cancers of the oral cavity: S. Saussez, A. Marchant, N. Nagy, C. Decaestecker, S. Hassid, A. Jortay, MP Schuring, HJ Gabius, A. Danguy, I. Salmon, R. Kiss Cancer 1998: 82: 252–260.* International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1999. **28**(2): p. 161.

17. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis.* Cell, 1990. **61**(5): p. 759-767.

18. Leslie, A., et al., *The colorectal adenoma–carcinoma sequence.* British Journal of Surgery, 2002. **89**(7): p. 845-860.

19. DeSantis, C., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics for African Americans, 2013.* CA: a cancer journal for clinicians, 2013. **63**(3): p. 151-166.

20. Kim, Y.J. and A. Varki, *Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer.* Glycoconjugate journal, 1997. **14**(5): p. 569-576.

21. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics.* CA: a cancer journal for clinicians, 2011. **61**(2): p. 69-90.

22. Center, M.M., A. Jemal, and E. Ward, *International trends in colorectal cancer incidence rates.* Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2009. **18**(6): p. 1688-1694.

23. Jemal, A., et al., *CA: a cancer journal for clinicians.* Cancer Stat, 2009. **59**: p. 225-249.

24. López, P.J.T., J.S. Albero, and J.A. Rodríguez-Montes, *Primary and secondary prevention of colorectal cancer.* Clinical medicine insights. Gastroenterology, 2014. **7**: p. 33.

25. Edwards, B.K., et al., *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates.* Cancer, 2010. **116**(3): p. 544-573.

26. Taylor, D.P., et al., *Population-based family history–specific risks for colorectal cancer: a constellation approach.* Gastroenterology, 2010. **138**(3): p. 877-885.

27. Kerber, R.A., et al., *Frequency of familial colon cancer and hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) in a large population database.* Familial cancer, 2005. **4**(3): p. 239-244.

28. Spilianakis, C.G., et al., *Interchromosomal associations between alternatively expressed loci.* Nature, 2005. **435**(7042): p. 637-645.

29. Barnes, D.E. and T. Lindahl, *Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells.* Annu. Rev. Genet., 2004. **38**: p. 445-476.

30. Lang, T., et al., *A DNA polymerase β mutant from colon cancer cells induces mutations.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(16): p. 6074-6079.

31. Wang, S. and W.S. El-Deiry, *Requirement of p53 targets in chemosensitization of colonic carcinoma to death ligand therapy.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(25): p. 15095-15100.

32. Richardson, R.B., *p53 mutations associated with aging-related rise in cancer incidence rates.* Cell cycle, 2013. **12**(15): p. 2468-2478.

33. Shin, Y.-J., et al., *Post-translational regulation enables robust p53 regulation.* BMC systems biology, 2013. **7**(1): p. 83.

34. Jasperson, K.W., et al., *Hereditary and familial colon cancer.* Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2044-2058.

35. Rex, D.K., et al., *Colonic neoplasia in asymptomatic persons with negative fecal occult blood tests: influence of age, gender, and family history.* The American journal of gastroenterology, 1993. **88**(6): p. 825-831.

36. Winawer, S.J., et al., *Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy.* New England Journal of Medicine, 1993. **329**(27): p. 1977-1981.

37. Shibata, D., et al., *The DCC protein and prognosis in colorectal cancer.* New England Journal of Medicine, 1996. **335**(23): p. 1727-1732.

38. Rustgi, A.K., *The genetics of hereditary colon cancer.* Genes & development, 2007. **21**(20): p. 2525-2538.

39. Stryker, S.J., et al., *Natural history of untreated colonic polyps.* Gastroenterology, 1987. **93**(5): p. 1009-1013.

40. Wiederschain, G.Y., *Essentials of glycobiology.* Biochemistry (Moscow), 2009. **74**(9): p. 1056-1056.

41. Taylor, M.E. and K. Drickamer, *Introduction to glycobiology*. 2011: Oxford university press.

42. Fukuda, M. and O. Hindsgaul, *Molecular and cellular glycobiology*. Vol. 30. 2000: Oxford University Press.

43. Halliday, J.A., et al., *A rapid, semi-automated method for detection of Galβ1-4GlcNAc α2, 6-sialyltransferase (EC 2.4. 99.1) activity using the lectin Sambucus nigra agglutinin.* Glycobiology, 2001. **11**(7): p. 557-564.

44. Redondo, P.d.A.G., et al., *Differential expression of sialic acid and N-acetylgalactosamine residues on the cell surface of intestinal epithelial cells according to normal or metastatic potential.* Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2004. **52**(5): p. 629-640.

45. Hakomori, S.-i., *Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo (glyco) lipid metabolism.* Cancer research, 1996. **56**(23): p. 5309-5318.

46. Christlet, T.H.T. and K. Veluraja, *Database analysis of O-glycosylation sites in proteins.* Biophysical journal, 2001. **80**(2): p. 952-960.

47. Petrescu, A.-J., et al., *Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding.* Glycobiology, 2004. **14**(2): p. 103-114.

48. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.

49. Marchal, I., et al., *Bioinformatics in glycobiology.* Biochimie, 2003. **85**(1): p. 75-81.

50. Lee, K.-Y., et al., *The hexapeptide inhibitor of Galβ1, 3GalNAc-specific α2, 3-sialyltransferase as a generic inhibitor of sialyltransferases.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(51): p. 49341-49351.

51. Dorudi, S., et al., *Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancer.* British journal of surgery, 1998. **85**(1): p. 98-100.

52. Aubert, M., et al., *Restoration of α (1, 2) fucosyltransferase activity decreases adhesive and metastatic properties of human pancreatic cancer cells.* Cancer research, 2000. **60**(5): p. 1449-1456.

53. Yamamoto, H., et al., *α2, 6-sialylation of cell-surface N-glycans inhibits glioma formation in vivo.* Cancer research, 2001. **61**(18): p. 6822-6829.

54. Schneider, F., et al., *Overexpression of Sialyltransferase CMP-Sialic Acid: Galβ1, 3GalNAc-R α6-Sialyltransferase Is Related to Poor Patient Survival inHuman Colorectal Carcinomas.* Cancer research, 2001. **61**(11): p. 4605-4611.

55. Wang, P.-H., et al., *Altered mRNA expression of sialyltransferase in squamous cell carcinomas of the cervix.* Gynecologic oncology, 2001. **83**(1): p. 121-127.

56. Wu, C.-Y., et al., *Soyasaponin I, a potent and specific sialyltransferase inhibitor.* Biochemical and biophysical research communications, 2001. **284**(2): p. 466-469.

57. Recchi, M.-A., et al., *Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer.* Cancer research, 1998. **58**(18): p. 4066-4070.

58. Recchi, M.-A., et al., *Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases: application to breast cancer cells.* Glycoconjugate journal, 1998. **15**(1): p. 19-27.

59. Kannagi, R., *Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer.* Glycoconjugate journal, 1997. **14**(5): p. 577-584.

60. Tsuji, S., *Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases.* Journal of Biochemistry, 1996. **120**(1): p. 1-13.

61. Hakomori, S.-I. and R. Kannagi, *Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers.* Journal of the National Cancer Institute, 1983. **71**(2): p. 231-251.

62. Seberger, P.J. and W.G. Chaney, *Control of metastasis by Asn-linked, β1–6 branched oligosaccharides in mouse mammary cancer cells.* Glycobiology, 1999. **9**(3): p. 235-241.

63. Demetriou, M., et al., *Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V.* The Journal of cell biology, 1995. **130**(2): p. 383-392.

64. Kudelka, M.R., et al., *Chapter Three-Simple Sugars to Complex Disease—Mucin-Type O-Glycans in Cancer.* Advances in cancer research, 2015. **126**: p. 53-135.

65. Pinho, S., et al., *Molecular Plasticity of E-Cadherin and Sialyl Lewis X Expression.* Two Comparative Models of Mammary Tumorigenesis. PLoS ONE, 2009. **4**(8): p. e6636.

66. Seidenfaden, R., et al., *Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions.* Molecular and cellular biology, 2003. **23**(16): p. 5908-5918.

67. Wade, A., et al., *Proteoglycans and their roles in brain cancer.* FEBS Journal, 2013. **280**(10): p. 2399-2417.

68. Günthert, U., et al., *A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells.* Cell, 1991. **65**(1): p. 13-24.

69. da Cunha, C.B., et al., *De novo expression of CD44 variants in sporadic and hereditary gastric cancer.* Laboratory Investigation, 2010. **90**(11): p. 1604-1614.

70. Lau, K.S., et al., *Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation.* Cell, 2007. **129**(1): p. 123-134.

71. Barry, G.T. and W.F. Goebel, *Colominic acid, a substance of bacterial origin related to sialic acid.* Nature, 1957. **179**: p. 206.

72. Gottschalk, A., *Chemistry and biology of sialic acids and related substances.* 1960.

73. Hof, L. and H. Faillard, *The serum dependence of the occurrence of N-glycolylneuraminic acid in HeLa cells.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1973. **297**(2): p. 561-563.

74. Carrion, A., R. Bourrillon, and J. Cabezas, *N-Acetyl-and N, O-diacetylneuraminic acids in a sialoglycopeptide from normal human urine.* Clinica Chimica Acta, 1969. **26**(3): p. 481-484.

75. Schauer, R., et al., *Biochemistry and role of sialic acids*. 1995: Springer.

76. Schauer, R., *Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids.* Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, 1981. **40**: p. 131-234.

77. Schauer, R., *Sialic acids and their role as biological masks.* Trends in Biochemical Sciences, 1985. **10**(9): p. 357-360.

78. Kelm, S. and R. Schauer, *Sialic acids in molecular and cellular interactions.* International review of cytology, 1997. **175**: p. 137-240.

79. Müller, H., *Die pathogenetische Bedeutung mikrobieller Neuraminidasen.* DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1974. **99**(39): p. 1933-1940.

80. Schauer, R. and J. Kamerling, *Chemistry, Biochemistry and Biology of Sialic Acids in Glycoproteins II (Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H, eds) pp 243–402*. 1997, Amsterdam: Elsevier.

81. Bratosin, D., et al., *Flow cytofluorimetric analysis of young and senescent human erythrocytes probed with lectins. Evidence that sialic acids control their life span.* Glycoconjugate journal, 1995. **12**(3): p. 258-267.

82. Wieser, R.J., C.E. Baumann, and F. Oesch, *Cell-contact mediated modulation of the sialylation of contactinhibin.* Glycoconjugate journal, 1995. **12**(5): p. 672-679.

83. Blix, F., A. Gottschalk, and E. Klenk, *Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids.* 1957.

84. Corfield, A.P. and R. Schauer, *Occurrence of sialic acids*, in *Sialic acids*. 1982, Springer. p. 5-50.

85. Corfield, A.P. and R. Schauer, *Metabolism of sialic acids*, in *Sialic acids*. 1982, Springer. p. 195-261.

86. Comb, D.G. and S. Roseman, *The sialic acids I. The structure and enzymatic synthesis of N-acetylneuraminic acid.* Journal of Biological Chemistry, 1960. **235**(9): p. 2529-2537.

87. Shaw, L. and R. Schauer, *Detection of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase activity in fractionated mouse liver.* Biochem. J, 1989. **263**: p. 355-363.

88. Schauer, R., *Biosynthesis and function of N-and O-substituted sialic acids.* Glycobiology, 1991. **1**(5): p. 449-452.

89. Seales, E.C., et al., *Hypersialylation of β1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility.* Cancer Research, 2005. **65**(11): p. 4645-4652.

90. Butor, C., S. Diaz, and A. Varki, *High level O-acetylation of sialic acids on N-linked oligosaccharides of rat liver membranes. Differential subcellular distribution of 7-and 9-O-acetyl groups and of enzymes involved in their regulation.* Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(14): p. 10197-10206.

91. Datta, A.K., A. Sinha, and J.C. Paulson, *Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(16): p. 9608-9614.

92. Shinya, K., et al., *Avian flu: influenza virus receptors in the human airway.* Nature, 2006. **440**(7083): p. 435-436.

93. Suzuki, Y., et al., *Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses.* Journal of virology, 2000. **74**(24): p. 11825-11831.

94. Kleineidam, R.G., et al., *Studies on the inhibition of sialyl-and galactosyltransferases.* Glycoconjugate journal, 1997. **14**(1): p. 57-66.

95. Schaub, C., B. Muller, and R.R. Schmidt, *New sialyltransferase inhibitors based on CMP-quinic acid: development of a new sialyltransferase assay.* Glycoconjugate journal, 1998. **15**(4): p. 345-354.

96. Crocker, P., et al., *Purification and properties of sialoadhesin, a sialic acid-binding receptor of murine tissue macrophages.* The EMBO journal, 1991. **10**(7): p. 1661.

97. Gillespie, W., et al., *Regulation of alpha 2, 3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)+ to PNA-phenotype in developing thymocytes.* Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(6): p. 3801-3804.

98. Gillespie, W., S. Kelm, and J.C. Paulson, *Cloning and expression of the Gal beta 1, 3GalNAc alpha 2, 3-sialyltransferase.* Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(29): p. 21004-21010.

99. LEE, Y.C., et al., *Molecular cloning and expression of Galβ1, 3GalNAcα2, 3-sialyltransferase from mouse brain.* European Journal of Biochemistry, 1993. **216**(2): p. 377-385.

100. Kojima, N., et al., *Kinetic Properties and Acceptor Substrate Preferences of Two Kinds of Gal. beta. 1, 3GalNAc. alpha. 2, 3-Sialyltransferase from Mouse Brain.* Biochemistry, 1994. **33**(19): p. 5772-5776.

101. Kitagawa, H. and J.C. Paulson, *Cloning of a novel alpha 2, 3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups.* Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(2): p. 1394-1401.

102. Chang, M.-L., et al., *Three genes that encode human β-galactoside α2, 3-sialyltransferases. Structural analysis and chromosomal mapping studies.* Glycobiology, 1995. **5**(3): p. 319-325.

103. Burchell, J., et al., *An α2, 3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas.* Glycobiology, 1999. **9**(12): p. 1307-1311.

104. Julien, S., et al., *Expression of sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc α2, 6-sialyltransferase (ST6GalNAc I) cDNA.* Glycoconjugate journal, 2001. **18**(11): p. 883-893.

105. Julien, S., et al., *ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity.* Glycobiology, 2006. **16**(1): p. 54-64.

106. Zhuo, Y. and S.L. Bellis, *Emerging role of α2, 6-sialic acid as a negative regulator of galectin binding and function.* Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(8): p. 5935-5941.

107. Dall'Olio, F. and M. Chiricolo, *Sialyltransferases in cancer.* Glycoconjugate journal, 2001. **18**(11): p. 841-850.

108. Zhu, Y., et al., *Suppression of a sialyltransferase by antisense DNA reduces invasiveness of human colon cancer cells in vitro.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2001. **1536**(2): p. 148-160.

109. Lin, S., et al., *Cell surface α2, 6-sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells.* Experimental cell research, 2002. **276**(1): p. 101-110.

110. Christie, D.R., et al., *ST6Gal-I expression in ovarian cancer cells promotes an invasive phenotype by altering integrin glycosylation and function.* Journal of ovarian research, 2008. **1**(1): p. 3.

111. Shaikh, F.M., et al., *Tumor cell migration and invasion are regulated by expression of variant integrin glycoforms.* Experimental cell research, 2008. **314**(16): p. 2941-2950.

112. Swindall, A.F. and S.L. Bellis, *Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells.* Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(26): p. 22982-22990.

113. Liu, Z., et al., *ST6Gal-I regulates macrophage apoptosis via α2-6 sialylation of the TNFR1 death receptor.* Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(45): p. 39654-39662.

114. Amano, M., et al., *The ST6Gal I Sialyltransferase Selectively ModifiesN-Glycans on CD45 to Negatively Regulate Galectin-1-induced CD45 Clustering, Phosphatase Modulation, and T Cell Death.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(9): p. 7469-7475.

115. Kitazume, S., et al., *α2, 6-sialic acid on platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) regulates its homophilic interactions and downstream antiapoptotic signaling.* Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(9): p. 6515-6521.

116. Zhuo, Y., R. Chammas, and S.L. Bellis, *Sialylation of β1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3-induced apoptosis.* Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(32): p. 22177-22185.

117. Park, J.-J., et al., *Sialylation of epidermal growth factor receptor regulates receptor activity and chemosensitivity to gefitinib in colon cancer cells.* Biochemical pharmacology, 2012. **83**(7): p. 849-857.

118. Schultz, M.J., A.F. Swindall, and S.L. Bellis, *Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans.* Cancer and Metastasis Reviews, 2012. **31**(3-4): p. 501-518.

119. Dall'Olio, F. and M. Chiricolo, *Sialyltransferases in cancer.* Glycoconjugate journal, 2001. **18**(11-12): p. 841-850.

120. Lu, J., et al., *β-Galactoside α2, 6-sialyltranferase 1 promotes transforming growth factor-β-mediated epithelial-mesenchymal transition.* Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(50): p. 34627-34641.

121. GANGOPADHYAY, A., S.P. PERERA, and P. THOMAS, *Differential expression of α2, 6-sialyltransferase in colon tumors recognized by a monoclonal antibody.* Hybridoma, 1998. **17**(2): p. 117-123.

122. Krzewinski-Recchi, M.A., et al., *Identification and functional expression of a second human β-galactoside α2, 6-sialyltransferase, ST6Gal II.* The FEBS Journal, 2003. **270**(5): p. 950-961.

123. Takashima, S., S. Tsuji, and M. Tsujimoto, *Characterization of the Second Type of Human β-Galactoside α2, 6-Sialyltransferase (ST6Gal II), Which Sialylates Galβ1, 4GlcNAc Structures on Oligosaccharides Preferentially GENOMIC ANALYSIS OF HUMAN SIALYLTRANSFERASE GENES.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(48): p. 45719-45728.

124. Lehoux, S., et al., *Transcriptional regulation of the human ST6GAL2 gene in cerebral cortex and neuronal cells.* Glycoconjugate journal, 2010. **27**(1): p. 99-114.

125. Varki, A. and T. Angata, *Siglecs—the major subfamily of I-type lectins.* Glycobiology, 2006. **16**(1): p. 1R-27R.

126. Varki, N.M. and A. Varki. *Heparin inhibition of selectin-mediated interactions during the hematogenous phase of carcinoma metastasis: rationale for clinical studies in humans*. in *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2002. New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corporation, c1974-.

127. Läubli, H., et al., *L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest.* Cancer research, 2006. **66**(3): p. 1536-1542.

128. Cheresh, D.A., R.A. Reisfeld, and A.P. Varki, *O-acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant.* Science, 1984. **225**(4664): p. 844-846.

129. Takashima, S., et al., *Quantitative analysis of expression of mouse sialyltransferase genes by competitive PCR.* Biochemical and biophysical research communications, 1999. **260**(1): p. 23-27.

130. Harduin-Lepers, A., et al., *The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach.* Glycobiology, 2005. **15**(8): p. 805-817.

131. Jeanneau, C., et al., *Structure-Function Analysis of the Human Sialyltransferase ST3Gal I ROLE OF N-GLYCOSYLATION AND A NOVEL CONSERVED SIALYLMOTIF.* Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(14): p. 13461-13468.

132. Harduin-Lepers, A., et al., *The human sialyltransferase family.* Biochimie, 2001. **83**(8): p. 727-737.

133. Datta, A.K. and J.C. Paulson, *The sialyltransferase sialylmotif participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc.* Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(4): p. 1497-1500.

134. Patel, R.Y. and P.V. Balaji, *Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases.* Glycobiology, 2006. **16**(2): p. 108-116.

135. Hakomori, S., *Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(16): p. 10231-10233.

136. Opat, A.S., C. van Vliet, and P.A. Gleeson, *Trafficking and localisation of resident Golgi glycosylation enzymes.* Biochimie, 2001. **83**(8): p. 763-773.

137. INOUE, M., et al., *Sialyl-Tn, sialyl-Lewis Xi, CA 19-9, CA 125, carcinoembryonic antigen, and tissue polypeptide antigen in differentiating ovarian cancer from benign tumors.* Obstetrics & Gynecology, 1992. **79**(3): p. 434-440.

138. Taniguchi, A., et al., *Characterization of the promoter region of the human Galβ1, 3 (4) GlcNAc α2, 3-sialyltransferase III (hST3Gal III) gene.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2003. **1626**(1): p. 92-96.

139. Kim, Y.-J., et al., *Molecular cloning and expression of human α2, 8-sialyltransferase (hST8Sia V).* Biochemical and biophysical research communications, 1997. **235**(2): p. 327-330.

140. Christodoulou, C., et al., *Phase II study of temozolomide in heavily pretreated cancer patients with brain metastases.* Annals of Oncology, 2001. **12**(2): p. 249-254.

141. Poste, G. and I.J. Fidler, *The pathogenesis of cancer metastasis.* Nature, 1980. **283**(5743): p. 139-146.

142. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer.* Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(7): p. 1420-1430.

143. Franks, L., *LATENCY AND PROGRESSION IN TUMOURS THE NATURAL HISTORY OF PROSTATIC CANCER.* The Lancet, 1956. **268**(6951): p. 1037-1039.

144. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.* Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-572.

145. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions.* Nature reviews Molecular cell biology, 2006. **7**(2): p. 131-142.

146. Ailles, L.E. and I.L. Weissman, *Cancer stem cells in solid tumors.* Current opinion in biotechnology, 2007. **18**(5): p. 460-466.

147. Kumar, S. and V.M. Weaver, *Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell.* Cancer and Metastasis Reviews, 2009. **28**(1-2): p. 113-127.

148. Rejniak, K.A., *Investigating dynamical deformations of tumor cells in circulation: predictions from a theoretical model.* Frontiers in oncology, 2012. **2**.

149. Chong, H.C., et al., *Matricellular proteins: a sticky affair with cancers.* Journal of oncology, 2012. **2012**.

150. Weinberg, R., *The biology of cancer*. 2013: Garland Science.

151. Miranda, E., et al., *Genetic and epigenetic changes in primary metastatic and nonmetastatic colorectal cancer.* British journal of cancer, 2006. **95**(8): p. 1101-1107.

152. Nakao, K., et al., *Genetic changes in colorectal carcinoma tumors with liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization and DNA ploidy.* Cancer, 2001. **91**(4): p. 721-726.

153. Aragane, H., et al., *Chromosomal aberrations in colorectal cancers and liver metastases analyzed by comparative genomic hybridization.* International journal of cancer, 2001. **94**(5): p. 623-629.

154. Vekemans, K. and F. Braet, *Structural and functional aspects of the liver and liver sinusoidal cells in relation to colon carcinoma metastasis.* World journal of gastroenterology: WJG, 2005. **11**(33): p. 5095-5102.

155. Smedsrød, B., et al., *Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium.* Liver International, 2009. **29**(4): p. 490-501.

156. Haier, J. and G.L. Nicolson, *Tumor cell adhesion under hydrodynamic conditions of fluid flow.* Apmis, 2001. **109**(4): p. 241-262.

157. Haier, J. and G.L. Nicolson, *The role of tumor cell adhesion as an important factor in formation of distant colorectal metastasis.* Diseases of the colon & rectum, 2001. **44**(6): p. 876-884.

158. Hosch, S.B., et al., *Micrometastases from HBP malignancies and metastatic cancer.* Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery, 2002. **9**(5): p. 583-591.

159. Han, X., et al., *Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients.* PLoS One, 2012. **7**(8): p. e41335.

160. Chen, X., et al., *Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis.* Molecular biology reports, 2012. **39**(6): p. 6707-6714.

161. Kostić, Z., et al., *Detection of free cancer cells in peritoneal cavity in patients surgically treated for gastric adenocarcinoma.* Vojnosanitetski pregled, 2006. **63**(4): p. 349-356.

162. Jayne, D., *The molecular biology of peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer.* Annals of the Academy of Medicine, Singapore, 2003. **32**(2): p. 219-225.

163. Yonemura, Y., et al., *Inhibition of peritoneal dissemination in human gastric cancer by MMP-7-specific antisense oligonucleotide.* Journal of experimental & clinical cancer research: CR, 2001. **20**(2): p. 205-212.

164. Davies, D., et al., *Contribution of host-derived growth factors to in vivo growth of a transplantable murine mammary carcinoma.* British journal of cancer, 1994. **70**(2): p. 263.

165. Yonemura, Y., et al., *The natural history of free cancer cells in the peritoneal cavity,* in *Advances in peritoneal surface oncology*. 2007, Springer. p. 11-23.

166. Cavdar, Z., et al., *Role of gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9), vascular endothelial growth factor and endostatin on clinicopathological behaviour of rectal cancer.* Colorectal Disease, 2011. **13**(2): p. 154-160.

167. Yonemura, Y., et al., *Recent advances in the treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal cancers by nucleoside antimetabolites.* Cancer science, 2007. **98**(1): p. 11-18.

168. Sacchi, G., et al., *Possible role of milky spots in mesothelial transplantation.* The International journal of artificial organs, 2007. **30**(6): p. 520-526.

169. Lodish, H., et al., *Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi. A rate-limiting step in protein maturation and secretion.* Transport, 1988. **263**(5).

170. Gu, J. and N. Taniguchi, *Regulation of integrin functions by N-glycans.* Glycoconjugate journal, 2004. **21**(1): p. 9-15.

171. Dennis, J.W., et al., *UDP-N-acetylglucosamine: α-6-D-mannoside β1, 6 N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2002. **1573**(3): p. 414-422.

172. Bellis, S.L., *Variant glycosylation: an underappreciated regulatory mechanism for β1 integrins.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2004. **1663**(1): p. 52-60.

173. White, D.E., et al., *Targeted disruption of β1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction.* Cancer cell, 2004. **6**(2): p. 159-170.

174. Hedlund, M., et al., *α2-6–Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo.* Cancer research, 2008. **68**(2): p. 388-394.

175. Olio, F.D., et al., *Increased CMP-NeuAc: Galβ1, 4GlcNAc-R α2, 6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues.* International journal of cancer, 1989. **44**(3): p. 434-439.

176. Gessner, P., et al., *Enhanced activity of CMP-NeuAc: Galβ1-4GlcNAc: α2, 6-sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients.* Cancer letters, 1993. **75**(3): p. 143-149.

177. Kemmner, W., D. Krück, and P. Schlag, *Different sialyltransferase activities in human colorectal carcinoma cells from surgical specimens detected by specific glycoprotein and glycolipid acceptors.* Clinical and Experimental Metastasis, 1994. **12**(3): p. 245-254.

178. Dall'Olio, F., et al., *Postnatal development of rat colon epithelial cells is associated with changes in the expression of the β1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the synthesis of Sda antigen of α2, 6-sialyltransferase activity towards N-acetyl-lactosamine.* Biochemical Journal, 1990. **270**(2): p. 519-524.

179. Vertino-Bell, A., et al., *Developmental regulation of β-galactoside α2, 6-sialyltransferase in small intestine epithelium.* Developmental biology, 1994. **165**(1): p. 126-136.

180. Dall'olio, F., et al., *α2, 6 sialylation of N-acetyllactosaminic sequences in human colorectal cancer cell lines. Relationship with non-adherent growth.* International journal of cancer, 1991. **47**(2): p. 291-297.

181. Roth, J., et al., *Differential expression of cell surface sialoglycoconjugates on wild-type and cultured Ehrlich tumor cells as revealed by quantitative lectin-gold*

ultrastructural cytochemistry. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(24): p. 11353-11357.

182. Dall'Olio, F., *The sialyl-α2, 6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role.* Glycoconjugate journal, 2000. **17**(10): p. 669-676.

183. Dall'Olio, F., N. Malagolini, and F. Serafini-Cessi, *The expression of soluble and cell-bound α2, 6 sialyltransferase in human colonic carcinoma CaCo-2 cells correlates with the degree of enterocytic differentiation.* Biochemical and biophysical research communications, 1992. **184**(3): p. 1405-1410.

184. Antony, P., et al., *Epigenetic inactivation of ST6GAL1 in human bladder cancer.* BMC cancer, 2014. **14**(1): p. 901.

185. Schultz, M.J., et al., *ST6Gal-I sialyltransferase confers cisplatin resistance in ovarian tumor cells.* Journal of ovarian research, 2013. **6**(1): p. 25.

186. Dalziel, M., et al., *Ras oncogene induces β-galactoside α2, 6-sialyltransferase (ST6Gal I) via a RalGEF-mediated signal to its housekeeping promoter.* European Journal of Biochemistry, 2004. **271**(18): p. 3623-3634.

187. Videira, P.A., et al., *ST3Gal. I sialyltransferase relevance in bladder cancer tissues and cell lines.* BMC cancer, 2009. **9**(1): p. 357.

188. Picco, G., et al., *Over-expression of ST3Gal-I promotes mammary tumorigenesis.* Glycobiology, 2010. **20**(10): p. 1241-1250.

189. Cui, H.X., et al., *ST3Gal III modulates breast cancer cell adhesion and invasion by altering the expression of invasion-related molecules.* Oncology Reports, 2016. **36**(6): p. 3317-3324.

190. Lu, J., et al., *Expression of N-Acetylglucosaminyltransferase III Suppresses α2, 3-Sialylation, and Its Distinctive Functions in Cell Migration Are Attributed to α2, 6-Sialylation Levels.* Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(11): p. 5708-5720.

191. Swindall, A.F., et al., *ST6Gal-I protein expression is upregulated in human epithelial tumors and correlates with stem cell markers in normal tissues and colon cancer cell lines.* Cancer research, 2013. **73**(7): p. 2368-2378.

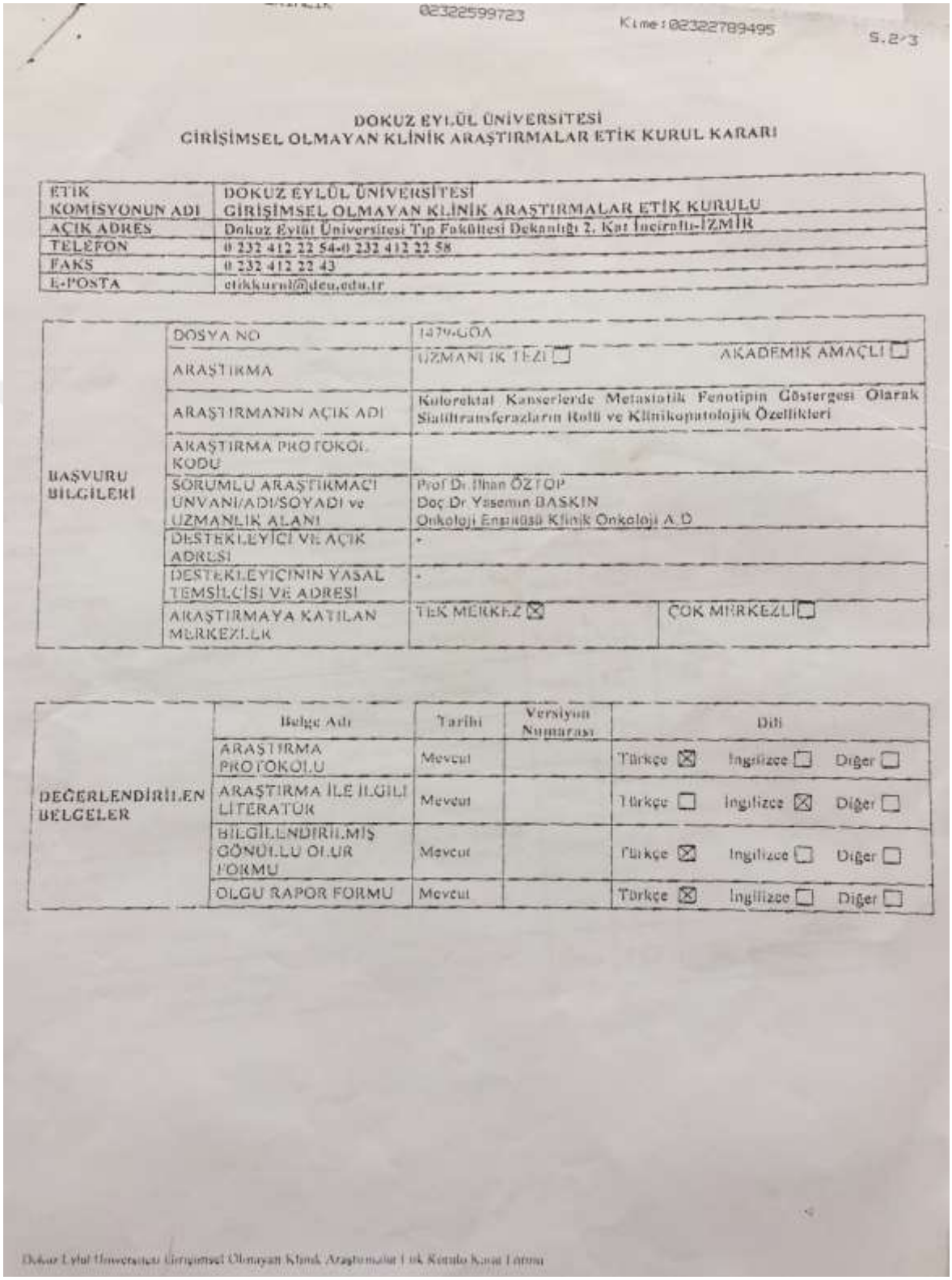
192. Tateno, H., et al., *Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray.* Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(23): p. 20345-20353.

193. Sakuma, K., M. Aoki, and R. Kannagi, *Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial–mesenchymal transition.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(20): p. 7776-7781.

194. Du, J., et al., *Dynamic sialylation in transforming growth factor-β (TGF-β)-induced epithelial to mesenchymal transition.* Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(19): p. 12000-12013.

8 EKLER

8.1 Etik Kurul Onayı



02322599723 Kime:02322789495 S.2-3

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO	1479-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kolorektal Kanserlerde Metastatik Fenotipin Göstergesi Olarak Sialiltransferazların Rolü ve Klinikopatolojik Özellikleri	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof Dr. İlhan ÖZTOP Doç Dr Yasemin BASKIN Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji A.D	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/17-05	Tarih: 17.04.2014
	Prof.Dr.İlhan ÖZTOP'un ve Doç.Dr.Yasemin BAŞKIN'ın sorumlusu olduğu "Kolorektal Kanserlerde Metastatik Fenotipin Göstergesi Olarak Sialiltransferazların Rolü ve Klinikopatolojik Özellikleri" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Hanu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Fee BÖBER	Pediatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Hüseyin BAŞKIN	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	—
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEÜ Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilgin ÇOMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım Ü.D)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNEL	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKUTUK	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Işıl TEKMEN	Histoloji ve Embriyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren INTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEÜ Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEÜ Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75 Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

8.2 Özgeçmiş

Adı Soyadı: Sezen Korkut

Doğum Tarihi: 01/04/1981

Öğrenim Durumu: Yüksek Lisans

DERECE	**BÖLÜM/PROGRAM**	**ÜNİVERSİTE**	**YIL**
LİSANS	BİYOLOJİ/ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK	EGE ÜNİVERSİTESİ	2012
Y. LİSANS	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ ABD	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ	HALEN SÜRMEKTEDİR

8.3 EK-3

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

ADI: Sezen **Anabilim/Bilim Dalı:** Temel Onkoloji

SOYADI: KORKUT **PROGRAMI:** Temel Onkoloji

ÖĞRENCİNO: 2012970158 **YÜKSEK LİANS**

8.4 TEZ KODU: DEU.HSI.MSC.2012970158

DANIŞMANI: Prof.Dr.İLHAN ÖZTOP

SUNUM	Tez başlığıçalışma konusu açık ve yeterli olarak tanımlamakta mıdır? Evet ☐ Düzeltilmesi gerekir ☐ Tez kolaylıkla okunup anlaşılıyor mu? Evet ☐ Kısmen düzeltilmesi gerekir ☐ Yeniden yazılması gerekir ☐ Tablo şekil ve grafikler tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış mı? Evet ☐ Düzeltilmesi Gerekir ☐ Kaynaklar Dizini Doğru ☐ Hatalı ☐ Açıklayınız
BÜTÜNLÜK	Tez bölümleri birbirlerine mantıksal ve analitik bir bütünlük ve akış içinde bağlanıyor mu? Evet ☐ Hayır ☐ Açıklayınız

ÖZGÜNLÜK VE YARATICILIK	Aday sizce bu çalışma sonunda bilimsel araştırma yapma, bilgiye erişme, değerlendirme ve yorumlama yeteneği kazanmış mıdır?
GİRİŞ	Araştırmaya konu olan problem tanımlanmıştır Evet☐ Hayır☐ Problemin çözümüne yönelik hipote açık olarak belirtilmiş ya da araştırma soruları tanımlanmış mıdır? Evet ☐ Hayır☐
GENEL BİLGİLER (LİTERATÜR BİLGİSİ)	Literatür bilgileri özümsenerek derlenmiş midir? Evet ☐ Hayır☐ Görüşlerinizi tez değerlendirme kriterlerine uygun olarak belirtiniz
GEREÇ VE YÖNTEM	Görüşlerinizi tez değerlendirme kriterlerine uygun olarak belirtiniz
BULGULAR	Görüşlerinizi tez değerlendirme kriterlerine uygun olarak belirtiniz
TARTIŞMA	Görüşlerinizi tez değerlendirme kriterlerine uygun olarak belirtiniz
SONUÇ VE ÖNERİLER	Sonuç/sonuçlar net olarak belirtilip başka hipotez ve/veya araştırma soruları ile ilişkilendirilmiş midir?

KAYNAKLAR	Kaynaklar uuygun yazılmış mı? Yeterli mi? Güncel kaynak var mı?
EKLER	Eksik var mı?
DİĞER	Tez hakkında önemli gördüğünüz diğer hususları belirtebilirsiniz
JÜRİ DEĞERLENDİRME SONUCU	Tarafımdan değerlendirilen bu tez, dokuz eylül üniversitesi lisansüstü eğitim-öğretim ve sınav yönetmeliği uyarınca Kabul edilebilir niteliktedir ☐ Ek süre verilerek düzeltilmesi gerekir ☐ Ret edilmesi gerekir ☐
JÜRİ ÜYESİNİN **Adı Soyadı** **Anabilim/Bilim Dalı** **Üniversite/Enstitüsü** **Tarih** **İmza**	