T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

KOLOREKTAL KANSER HASTALARINDA *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* YOLAĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Momen KANJEE

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Çiğdem YÜCE KAHRAMAN

ERZURUM-2024

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİ ve TEZİ İLE İLGİLİ BİLGİLER

Adı, Soyadı : Momen KANJEE

Anabilim Dalı : Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı ve Atanma Tarihi: Doç.Dr. Çiğdem YÜCE KAHRAMAN
12 / 04 / 2023

Sınav tarihi:
10 / 01 / 2025

Tezin Konusu ve Başlığı : Kolorektal Kanser Hastalarında *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* Yolağının Değerlendirilmesi

Belirlenme Tarihi : 22 / 01 / 2023

Tezin Niteliği : ☒ Tıpta Uzmanlık Tezi
☒ Klinik Çalışmalar ( ) Prospektif ( ) Retrospektif ( ) Kesitsel
☐ Laboratuvar Çalışmaları ( ) Invitro (Cansız) Çalışmaları ( ) Hayvan Çalışmaları

Tez Sınavının Nasıl Yapıldığı: ☒ Yüz yüze katılım sağlanarak ☐ Online (Jürinin teşkil edilmesinde kurum dışından belirlenecek olan jüri üyesi, aynı il sınırları içerisinde bulunmadığından, tez sınavı dijital ortamda yapılmıştır.)

II. KARAR

Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliğinin 19. maddesi gereğince yapılan tez savunma sınavının tamamlanması sonucunda adı geçenin tezinin, jüri üyelerince "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak;

☒ Kabulüne

1.Tez Sınavı ☐ Reddine (Eksikliklerin tamamlanması ve gerekli düzeltmelerin yapılması için uzmanlık öğrencisine, TUEY'nin 19. Maddesinin 6. fıkrası gereğince altı aylık ek bir süre verilmesine)

2.Tez Sınavı ☐ Reddine (TUEY'nin 19. Maddesinin 7. fıkrası gereğince, uzmanlık öğrencisinin uzmanlık öğrenciliği ile ilişiğinin kesilmesine)

☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

III. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

IV. JÜRİ ÜYELERİ

	Unvanı Adı Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurum Bilgisi	İmza
Jüri Başkanı	Doç.Dr. Çiğdem YÜCE KAHRAMAN	Tıbbi Genetik	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Jüri Üyesi	Prof.Dr. Öztürk ÖZDEMİR	Tıbbi Genetik	Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi	
Jüri Üyesi	Dr.Öğr.Üyesi Ömer YAKAR	Tıbbi Genetik	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **i**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **iv**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **v**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ÖZET ..... **x**
ABSTRACT ..... **xi**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Kalın Bağırsağın Anatomisi 3
2.2. KRK'nin Epidemiyolojisi 3
2.3. KRK'nin Etiyopatogenezi 5
2.3.1. KRK ve Epigenetik 8
2.4. KRK'nin Risk Faktörleri 9
2.4.1. Kalıtsal KRK Sendromları 11
2.5. Klinik Bulgular 13
2.6. Tanı ve Tarama Testleri 13
2.7. Evreleme 14
2.8. Tedavi Seçenekleri 14
2.9. Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) 16
2.9.1. Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) 17
2.9.2. MikroRNA'lar (miRNA'lar) 20
2.9.3. Kompetitif Endojen RNA (ceRNA) Hipotezi 23
2.9.4. *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* Yolağı 25
2.9.4.1. *LINC00958* (*BLACAT2*) 25
2.9.4.2. *miR-3619-5p* 25
2.9.4.3. β-katenin (*CTNNB1)* 26
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER **28**
3.1. Hastaların Seçilmesi ve Kayıtların Tutulması 28
3.2. Total RNA İzolasyonu 29

3.3. cDNA Sentezi (lncRNA ve mRNA) 32
3.4. cDNA Sentezi (miRNA) 33
3.5. qPCR Aşaması 34
3.6. Verilerin Analizi 36
4. BULGULAR 38
4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri 38
4.2. KRK Tanılı Hastalardan Alınan Doku Örneklerinde *LINC00958, miR-3619-5p* ve *CTNNB1* Ekspresyon Analizi Sonuçları 43
4.2.1. *LINC00958*'in KRK Dokularındaki Ekspresyonu 47
4.2.2. *miR-3619-5p*'nin KRK Dokularındaki Ekspresyonu 49
4.2.3. CTNNB1'in KRK Dokularındaki Ekspresyonu 51
4.3. *LINC00958*/*miR-3619-5p*/*CTNNB1* Yolağının Korelasyon Analizi 54
5. TARTIŞMA 55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 68
KAYNAKLAR 71

TEŞEKKÜR

Öncelikle Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı'mızda her zaman yardımlarını ve desteğini hissettiren, bilimsel rehberlikleri kadar insani yaklaşımlarıyla da bizleri destekleyen ve gelecekteki mesleki hayatımda yararlanacağım bilgiler veren saygıdeğer Prof. Dr. Abdulgani TATAR hocama sonsuz şükranlarımı sunarım.

Gerçekleştirdiğim çalışmalarımın her aşamasında desteğini ve katkılarını esirgemeyen, kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Çiğdem YÜCE KAHRAMAN'a çok teşekkür ederim.

Hasta dahil edilme sürecinde emeği olan Doç. Dr. Esra DİŞÇİ'ye, laboratuvar çalışmalarında bana destek olan, başta Hasbi DİKBAŞ ve Ayşe Gökçe olmak üzere, projeme olan katkıları ve özverili çalışmalarıyla çok büyük yardımı gösteren ATAGEN ailesinin tüm çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Uzmanlık eğitimi sürecinde birlikte aynı bölümde çalışmaktan gurur duyduğum Dr. Ömer YAKAR, Dr. Pelin ERCOŞKUN, Dr. Kübra ADANUR SAĞLAM, Dr. Mustafa YILMAZ, Dr. Büşra SARUHAN ve Dr. Dilara AYDEMİR'e çok teşekkür ederim.

Tıbbi genetik uzmanlık eğitimi sürecinde büyük katkısı olan, yol göstericiliği ve aktardığı bilgiler için Dr. Neslihan CİNKARA'ya, araştırmalarımda ve laboratuvar çalışmalarımda yardımları olan Dr. Ziya BULDUK'a ayrıca teşekkür ederim.

Bana finansal desteği sağlayan Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, tezimde kullandığım malzemelerin teminiyle katkısı olan ve bu süreçte yardımcı olan NucleoGene firmasında çalışan Dr. Serdar ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her alanında, her çalışmamda bana maddi ve manevi destek veren babam Emad KANJEE'ye, annem Lina KANJEE'ye sonsuz teşekkür ederim. Sevgili kardeşlerim Lamia, Yousef ve Lara'ya ayrıca teşekkür ederim.

Türkiye'ye geldiğimden bugüne kadar benimle yakından ilgilenen, yardımcı olan ve her türlü desteği veren halam Halime EREN ve amcam Şükrü EREN'e de sonsuz minnettarlığımı ve şükranlarımı sunuyorum.

Hepinize sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum

Dr. Momen KANJEE

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. lncRNA ve mRNA için cDNA Reaksiyon Karışımının Hazırlanması 32
Tablo 2. miRNA için cDNA Reaksiyon Karışımının Hazırlanması 34
Tablo 3. qPCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanması 35
Tablo 4. qPCR'ın Döngü Basamakları 35
Tablo 6. Çalışmaya dahil edilen hastaların klinikopatolojik özellikleri 39
Tablo 7. Kontrol (komşu sağlıklı) dokuda qPCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri 43
Tablo 8. Kanserli dokuda qPCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri 45
Tablo 9. Hedef RNA'larda tespit edilen ortalama ΔCt ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri 46
Tablo 10. *LINC00958*'in Ekspresyonu ile Hastaların Klinikopatolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması 49
Tablo 11. *miR-3619-5p*'nin Ekspresyonu ile Hastaların Klinikopatolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması 51
Tablo 12. *CTNNB1*'in Ekspresyonu ile Hastaların Klinikopatolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması 53
Tablo 13. *LINC00958*/*miR-3619-5p*/*CTNNB1* Yolağının Korelasyon Analizinin Sonuçları 54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. (A) Kalın bağırsağın anatomisi, KRK'nin anatomik yerleşimine bağlı moleküler özellikleri ve diğer faktörlerle ilişkileri. (B) GİS duvarın anatomisi. 3
Şekil 2. Pasta grafikler; Tüm yaş gruplarında cinsiyeti ayırmaksızın 2022 yılının dünya çapındaki kanser insidansı (sağ) ve mortalitesinin (sol) dağılımını göstermektedir. 4
Şekil 3. KRK'nin oluşum mekanizmaları. 8
Şekil 4. KRK'deki ana epigenetik mekanizmalar 9
Şekil 5. KRK risk faktörlerinin özeti. 11
Şekil 6. Kolorektal polipozis sendromları. 12
Şekil 7. KRK'nin evreleri (solda) ve evrelere göre beş yıllık rölatif sağkalım (sağda). 14
Şekil 8. Biyobelirteç odaklı ve kanser evresine özgü terapötik yaklaşımlar. 15
Şekil 9. ncRNA'ların sınıflandırılması. 16
Şekil 10. KRK'de rol oynayan bazı ncRNA'lar ve etki mekanizmaları. 17
Şekil 11. lncRNA'ların KRK'deki işlevleri. 19
Şekil 12. miRNA biyogenez yolakları. 21
Şekil 13. KRK'de rol oynayan bazı miRNA'lar. 23
Şekil 14. ceRNA'nın mekanizması 24
Şekil 15. LINC00958'in karsinogenezdeki rolü ve çeşitli kanserlerdeki diğer ncRNA'larla ilişkisi. 25
Şekil 16. β-katenin'in düzenlenmesi ve çeşitli yolaklarla etkileşimi. 27
Şekil 17. Qiagen TissueLyser LT cihazı 29
Şekil 18. MaestroNano Micro-Volume spektrofotometre 30
Şekil 19. Total RNA izolasyonu basamakları 30
Şekil 20. Nüve NF 048 santrifüj cihazı 31
Şekil 21. Biosan Minicentrifuge-Vortex Combi-Spin cihazı 33
Şekil 22. PCR-thermal cycler, SensoQuest Labcycler Basic cihazı 34
Şekil 23. Qiagen Rotor-Gene Q Cihazı 36
Şekil 24. qPCR çalışmasına ait amplifikasyon eğrileri 43

Şekil 25. KRK ve kontrol doku gruplarında LINC00958, miR-3619-5p ve CTNNB1'in ekspresyonunun karşılaştırılması. (A) İki grup arasındaki ΔCt değerleri, (B) Genlerin rölatif kat değişimi geometrik ortalamaya göre gösterilmiştir. 47

KISALTMALAR DİZİNİ

5-FU	: 5-Flurourasil
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACS	: Amerikan Kanser Topluluğu; *"American Cancer Society"*
Ago	: Argonaute
AJCC	:*"American Joint Committee on Cancer"*
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli geni
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CAR-T	: Kimerik Antijen Resptörü T Hücresi
CCND1	: Cyclin D1 geni
cDNA	: Komplementer DNA
CEA	: Karsinoembriyonik Antijen
ceRNA	: Kompetitif Endojen RNA; ''*Competing Endogenous* RNA''
cfDNA	: Hücresiz serbest DNA; *"Cell Free DNA"*
CIMP	: CpG Adası Metilatör Fenotipi; *"CpG Island Methylator Phenotype"*
CIN	: Kromozomal İnstabilite
circRNA	: Sirküler RNA ; ''*circular* RNA''
Ct	: Döngü Eşiği; "*Cycle Threshold*"
ctDNA	: Dolaşımdaki Tümör DNA'sı; *"Circulating Tumor DNA"*
CTNNB1	: CATENIN, BETA-1
DM	: Diabetes Mellitus
dNTP	: deoksiribonükleotid trifosfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü; "*World Health Organization*"
EGF	: Epitelyal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
ERBB2/HER2	: ERB-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2 geni
FAP	: Familyal Adenomatöz Polipozis
FDA	: ABD'nin Gıda ve İlaç Dairesi; *"Food and Drug Administration"*
FIT	: Fekal İmmünokimyasal Test

FMT	: Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu
gFOBT	: guaiac Gaitada Gizli Kan Testi; *"guaiac Fecal Occult Blood Test"*
GİS	: Gastrointestinal sistem
GLOBOCAN	: "*Global Cancer Observatory*"
HCC	: Hepatosellüler karsinom
HNPCC	: Kalıtsal Nonpolipozis Kolorektal Kanser
IACR	: Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi; *''International Agency for Research on Cancer''*
İBH	: İnflamatuar Bağırsak Hastalığı
JPS	: Juvenil Polipozis Sendromu
KF	: Kistik Fibrozis
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KRK	: Kolorektal kanser
KT	: Kemoterapi
LN	: Lenf Nodu
lncRNA	: Uzun kodlamayan RNA; ''*long non-coding* RNA''
LOH 18q	: Kromozom 18q Heterozigotluk Kaybı
LRP	: Lipoprotein reseptör ilişkili protein
LS	: Lynch Sendromu
MAP	: *MUTYH* ile İlişkili Polipozis
miRNA	: mikroRNA
MMR	: Yanlış eşleşme onarım; "*Mismatch Repair*"
MRE	: miRNA Tanıma Elemanı; *"miRNA Recognition Element"*
mRNA	: "*messenger* RNA"
MSI	: Mikrosatellit İnstabilite
mt-sDNA	: Çok Hedefli Gaita DNA'sı; *"Multi-Targeted Stool DNA"*
NCCN	: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı; *"National Comprehensive Cancer Network"*
NCI	: Ulusal Kanser Enstitüsü; "*National Cancer Institute*"
ncRNA	: Kodlamayan RNA; ''*non-coding* RNA''
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
NSAİİ	: Non-Steroidal Anti-İnflamatuar İlaç

NTRK : Nörotrofik Tirozin Resptör Kinaz

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

PD-1 : Programmed Death-1

PJS : Peutz-Jeghers Sendromu

Pol II : Polimeraz II

Pri-miRNA : Primer mikroRNA

PTEN : Fosfataz ve Tensin Homolog

qPCR : Kantitatif Real-Time (gerçek zamanlı) Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RB : Retinoblastom

rRNA : Ribozomal RNA

RT : Radyoterapi

RTK : Reseptör Tirozin Kinaz

SS : Standart Sapma *"Standard Deviation"*

SEER : Gözetim, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar Programı "*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*"

siRNA : *"Small interfering* RNA*"*

SSPCS : Sessile Serrated Polyposis Cancer Syndrome

TNM : Tümör/Nod/Metastaz

tRNA : Transfer RNA

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

UTR : Untranslated Bölge; *"Untranslated Region"*

ÜK : Ülseratif kolit

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VKİ : Vücut Kilte İndeksi

XPO5 : Eksportin-5

ÖZET

Kolorektal Kanser Hastalarında *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* Yolağının Değerlendirilmesi

Giriş-Amaç: Kolorektal kanserler (KRK'ler), dünyada en yaygın üçüncü kanser türüdür ve kanser ölümlerinin ikinci en yaygın nedenidir. Kodlamayan RNA'ların (ncRNA) kanser gelişimi ve ilerlemesindeki rolünün araştırılması, kanser tedavisinde gelecekteki araştırmalar ve klinik uygulamalar için yol göstericidir. Bu çalışmada, KRK'li hastalardan alınan kanser ve komşu normal doku örnekleri arasında *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* yolağının ekspresyon seviyesi ve etkileşimleri değerlendirilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1*'in ifadesi ile hastaların klinikopatolojik özellikleri karşılaştıran ilk çalışma olacaktır.

Gereç-Yöntem: Genel cerrahi kliniğine KRK tanısı ile başvuran 40 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalardan ameliyat sırasında alınan KRK ve cerrahi sınırı negatif sağlıklı komşu doku örneklerinden total RNA izolasyonu yapılıp kantitatif real-time PCR (qPCR) yöntemi ile hedef genlerin ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: KRK dokularında *LINC00958* ve *CTNNB1*'in ekspresyon seviyelerini anlamlı düzeyde arttığı, *miR-3619-5p*'nin ise azaldığı tespit edilmiştir. Bu iki genin ekspresyon seviyeleri ile hastaların klinikopatolojik özellikleriyle karşılaştırıldığında cinsiyet ve tümör lokalizasyonu açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* yolağını hedefleyen terapötik müdahalelerin potansiyelini vurgulamakta ve KRK biyolojisi üzerine yeni bakış açıları sunmaktadır.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar, bu yolakların klinik önemini ortaya koymakta ve yeni biyobelirteçler ile hedefe yönelik tedavilerin geliştirilme potansiyelini vurgulamaktadır. Bu çalışma, KRK'de ncRNA'ların artan rolüne katkı sağlamakta ve kişiselleştirilmiş tıp alanındaki uygulamalara ışık tutmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *CTNNB1*, Gen Ekspresyonu, Kolorektal Kanser, *LINC00958, miR-3619-5p.*

ABSTRACT

Evaluation of the *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* Pathway in Patients with Colorectal Cancer

Introduction-Aim: Colorectal cancers (CRCs) are the third most common cancer type worldwide and the second leading cause of cancer-related deaths. Investigating the role of non-coding RNAs (ncRNAs) in cancer development and progression provides valuable insights for future research and clinical applications in cancer treatment. In this study, we evaluated the expression levels and correlation of the *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* pathway between cancerous and adjacent normal tissue samples obtained from CRC patients. To the best of our knowledge, this is the first study to compare the expression of *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* with the patients' clinicopathological characteristics.

Materials-Methods: Forty patients diagnosed with CRC were included in the study. Total RNA was isolated from CRC and adjacent tissues (with negative surgical margins) obtained during surgery. The expression analysis of the target genes was performed using quantitative real-time PCR (qPCR).

Results: The expression levels of *LINC00958* and *CTNNB1* were found to be significantly increased in CRC tissue samples, while *miR-3619-5p* expression was significantly decreased. When the expression levels of these genes were compared with the clinicopathological characteristics of the patients, significant differences were observed in terms of gender and tumor localization. These findings highlight the therapeutic potential of targeting the *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* pathway and offer novel insights into CRC biology.

Conclusion: The results demonstrate the clinical significance of these pathways and emphasize their potential in the development of new biomarkers and targeted therapies. This study contributes to the growing understanding of the roles of ncRNAs in CRC and sheds light on their applications in personalized medicine.

Keywords: Colorectal Cancer, *CTNNB1*, Gene Expression, *LINC00958*, *miR-3619-5p.*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK), multifaktöriyel bir hastalık olup en sık görülen kanser türlerinden biridir. Kanser, ortalama yaşam beklentisinin arttığı çağımızda bir halk sağlığı sorunu olarak görülmeye başlanmıştır. KRK'ler, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi'nin (IACR) 2022 yılı "Global Cancer Observatory" (GLOBOCAN) veri tabanına göre yaklaşık iki milyon vaka ile dünya çapında en sık görülen üçüncü kanser türüdür (1). Etkili tarama teknikleri, erken tanı ve tedavideki gelişmelerle birlikte hastalarının morbidite ve mortalitesi azalsa da yılda bir milyona yakın ölüme yol açan KRK'ler, erkek ve kadın bir arada değerlendirildiğinde kansere bağlı ölümlerinin ikinci en yaygın nedenidir (2). Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCI) Gözetim, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar Programı (SEER) verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) KRK hastalarının beş yıllık genel sağkalım oranı %65 olduğu ve tanı anındaki evreye bağlı değişkenlik gösterdiği vurgulanmıştır (3). KRK'lerin gelişimi ve ilerlemesinin altında yatan olası moleküler mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır.

Kodlamayan RNA'lar (*non-coding* RNA; ncRNA), insan genomunun büyük bir kısmını oluşturan, protein sentezlemeyen ancak gen ekspresyonu ve diğer hücresel süreçlerde önemli rol oynayan RNA molekülleridir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, ncRNA'ların kanser patogenezindeki rolüne odaklanmıştır (4). ncRNA'ların bir örneği uzun kodlamayan RNA'lar (*long non-coding RNAs;* lncRNA'lar), gen transkripsiyonunun düzenlenmesi, genomik bütünlüğün korunması, kromatin yeniden düzenlemesi, genomik imprinting, messenger RNA (mRNA) modifikasyonu, post-transkripsiyonel regülasyon, hücre farklılaşması ve gelişimi gibi çeşitli hücresel süreçlerde anahtar düzenleyiciler olarak ortaya çıkmıştır (5,6). Yapılan birçok çalışmada, lncRNA'ların tümörogenez üzerinde önemli düzenleyici etkileri keşfedilmiştir. KRK'de de olduğu gibi çeşitli kanserlerde değişken düzeyde eksprese edilmesi ve kanserin birçok basamağında rolünün tespiti, lncRNA'ları ilgi çekici hale getirmiştir. lncRNA'ların KRK gelişimindeki rolleri hala tam olarak aydınlatılmamış olsa da yapılan son çalışmalarda, lncRNA'ların kolon kanseri hücrelerinde artmış veya azalmış ifade düzeyleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (7). KRK ile ilişkili olabilecek güncel lncRNA'lardan biri olan *LINC00958*'in *(BLACAT2)*, mesane, endometriyal, over ve KRK gibi birden fazla kanser türünde

onkojenik özellikleri bildirilmiştir. Ayrıca, değişken *LINC00958* seviyelerinin, T evresi ve kötü prognoz ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (8).

mikroRNA'lar (miRNA'lar) ise, gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan küçük ncRNA'lardır. miRNA'lardan biri olan *miR-3619-5p*; retinoblastom (RB), over, mide, prostat, akciğer ve KRK gibi çeşitli kanserlerde araştırılmıştır (9). Yapılan bir çalışmada *miR-3619-5p*'nin Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) hücrelerinde β-katenin aracılı kanser büyümesinin ve invazyonunun baskılanmasında rol oynadığı ve KHDAK'de yeni bir kanser süpresörü olabileceği gösterilmiştir (10). Ayrıca β-katenin'in KRK'de de önemli rol oynadığına dair çalışmalar vardır (11,12).

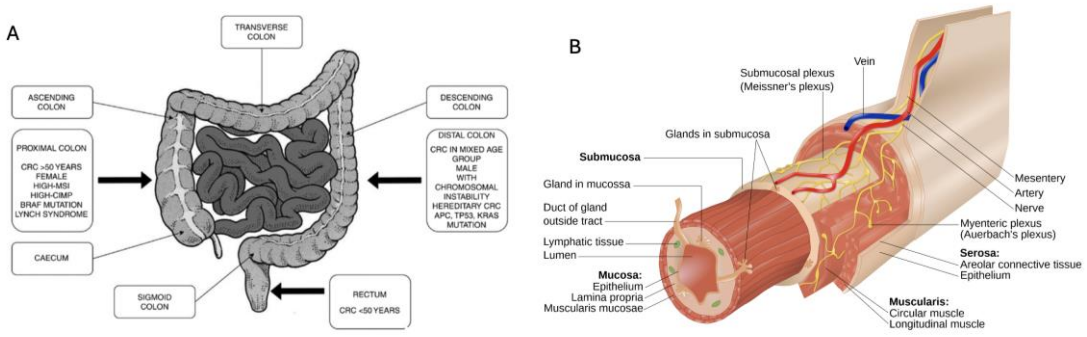
β-katenin, *CTNNB1* geni (OMIM *116806) tarafından kodlanan kadherin ile ilişkili bir zonula adherens proteinidir. Bu protein, hücre-hücre adezyonu, gen transkripsiyonunun düzenlenmesi, epitel oluşumu ve bakımı için kritik öneme sahiptir. Ayrıca, embriyogenezin çeşitli aşamalarında, yara iyileşmesinde ve tümör hücresi metastazında da rol oynamaktadır. Wnt sinyal yolağındaki rolü nedeniyle KRK, hepatosellüler karsinom (HCC), over kanseri, medulloblastom gibi birçok kanser ile ilişkilendirilmiştir. Bu yolaktaki mutasyonlar, sinyal yolağının sürekli uyarılmasına neden olup kontrolsüz epitel hücre proliferasyonu ile sonuçlanmaktadır . Özetle, ncRNA'ların kanser patogenezindeki rolünü anlamak ve prognozunu tahmin etmek için potansiyel biyobelirteçler olabileceği düşünülmektedir. ncRNA'ların kesin işlevini anlamak ve kanser tedavisindeki potansiyel uygulamalarını belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu ncRNA'ların değişen ekspresyonu ve birbiriyle etkileşimleri, KRK gelişimi ve ilerlemesine katkıda bulunduğu ve bu nedenle potansiyel olarak tanı ve tedavi hedefleri olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (10–13).

Bu çalışmadaki amacımız, KRK ve komşu normal doku örnekleri arasında *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* yolağının ekspresyon seviyelerini ve birbirleriyle olan ilişkilerini araştırmaktır. Literatürde, KRK'de *LINC00958/miR-3619-5p ve miR-3619-5p/CTNNB1* ilişkisinin ayrı ayrı değerlendirildiği çalışmalar olmakla birlikte, çalışmamız *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* ekseninin birlikte çalışıldığı ilk çalışma olacaktır. Çalışmamızın ileride bu alanda yapılacak çalışmalara da ışık tutacağı öngörmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalın Bağırsağın Anatomisi

Kalın bağırsak, ileoçekal bileşkeden başlayan ve anüse kadar uzanan gastrointestinal sistem (GİS) adı da verilen sindirim sisteminin son kısmıdır (14). Kolon, yaklaşık 1,5 metre uzunluğunda olup ince bağırsaktan geçen sindirilemeyen gıdalardan suyu emerek dışkı haline getirir. Kolonun duvarı 4 ana katmandan oluşmaktadır; iç boşluğundan (lümen) dışa doğru mukoza, submukoza, muscularis propria (kas tabakası) ve seroza tabakaları bulunur (Şekil 1) (15). Kolon, anatomik olarak çekum, apendiks, çıkan (asendan), transvers kolon, inen (desendan) ve sigmoid kolon segmentlerinden oluşmaktadır (Şekil 1) (16). Bununla birlikte, sağ ve sol kolon olarak ikiye ayrılabilir; sağ kolon çekum, çıkan kolon ve sağ 2/3 transvers kolon, sol kolon ise sol 1/3 transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolondan oluşmaktadır (17). Rektum ise kalın bağırsağın son bölümüdür. Rektosigmoid bileşkede başlar ve anüs seviyesinde sonlanır.



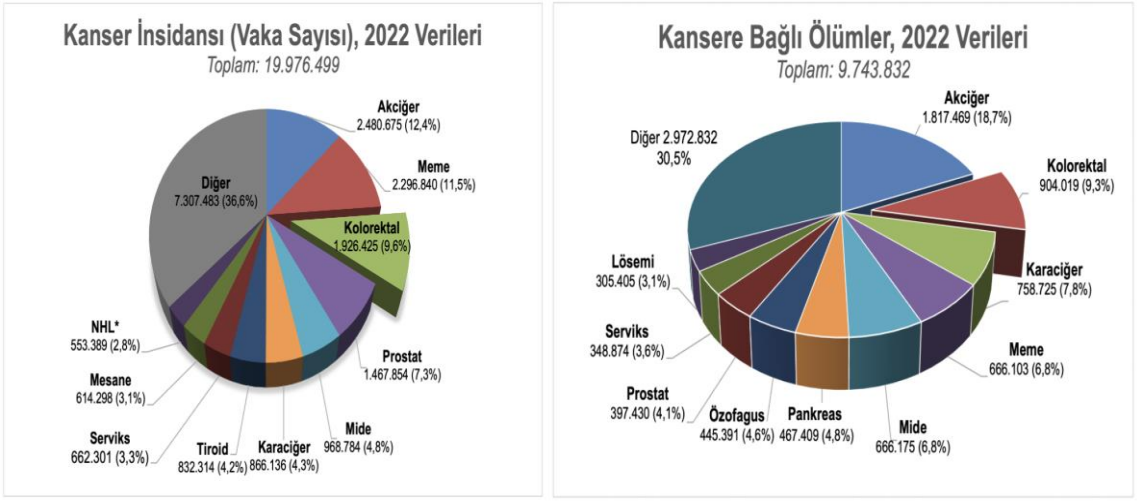
Şekil 1. (A) Kalın bağırsağın anatomisi, KRK'nin anatomik yerleşimine bağlı moleküler özellikleri ve diğer faktörlerle ilişkileri (18). (B) GİS duvarın anatomisi (19).

2.2. KRK'nin Epidemiyolojisi

Kolon ve rektum kanserlerini kapsayan KRK'ler, kansere bağlı morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biri olarak önemli bir halk sağlığı sorununu teşkil etmektedir. KRK'ler, DSÖ'nün son verilerine göre tüm kanser vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturan, dünya çapında erkekler arasında akciğer ve prostat kanserleri ardından, kadınlar arasında ise meme ve akciğer kanserlerinden sonra en sık görülen

üçüncü kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin ikinci nedenidir (1). Tahminlere göre, bireylerin yaşam boyu KRK'ye yakalanma riski %4-5'tir ve hastalığın insidansı erkeklerde kadınlara göre daha fazladır (2,20). Nüfus artışı, yaşlanma, fiziksel inaktivite, sağlıksız beslenme alışkanlıkları ve obezite gibi risk faktörlerinin artışı nedeniyle KRK insidansının önümüzdeki yıllarda 1,5-2 kat artacağı öngörülmektedir (21–24). Bunun yanı sıra, son araştırmalarda erken başlangıçlı KRK insidansının dünya genelinde hızlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (25–27). Günümüzde ise KRK, 50 yaş altındaki kansere bağlı ölümlerde erkeklerde birinci, kadınlarda ise ikinci sırada yer almaktadır (27).

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın istatistiklerine göre KRK, her iki cinsiyette de DSÖ verilerine benzer şekilde üçüncü sırada yer almaktadır (28). Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) ölüm nedeni istatistiklerine göre kanserler, dolaşım sistemi hastalıklarını takiben ikinci en sık ölüm nedeni olduğu ve kansere bağlı ölümlerin %7,7'sinin kolon kanserinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (29). Şekil 2'de DSÖ'nün GLOBOCAN 2022 kanser istatistikleri, dünyadaki en sık görülen kanserlerin insidansları ve mortalitelerinin dağılımı göstermektedir.



Şekil 2. Pasta grafikler; Tüm yaş gruplarında cinsiyeti ayırmaksızın 2022 yılının dünya çapındaki kanser insidansı (sağ) ve mortalitesinin (sol) dağılımını göstermektedir. *NHL. Non-Hodgkin Lenfoma. Kaynak. Globocan 2022 (version 1.1)-08.02.2024; Cancer TODAY (IARC); https.//gco.iarc.who.int/.

2.3. KRK'nin Etiyopatogenezi

KRK'ler genellikle kolon veya rektumun mukozasındaki epitelyal polipler olarak başlamakta, biriken genetik ve epigenetik değişiklikler nedeniyle maligniteye ilerleyebilmektedir (30). Etiyolojisinde genetik faktörlerinin yanı sıra çevresel ve yaşam tarzı gibi çeşitli faktörler rol oynamaktadır. KRK'ler sporadik, kalıtsal ve kolitle ilişkili olarak üç ana kategoriye ayrılabilmektedir (31). KRK'lerin büyük bir kısmı sporadiktir ancak yaklaşık %5-10'u Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP) ve Lynch sendromu (LS) gibi kalıtsal kansere yatkınlık sendromlarıyla ilişkilendirilmiştir (32). Tipik olarak adenomatöz polipler veya sapsız serrated lezyonlar olarak başlayıp zaman içinde kademeli olarak ilerlemektedir (33). KRK gelişimi, prekanseröz polip, adenom, karsinom ve invazif kanser olarak dört ana aşamaya ayrılabilir (34). Adenomatöz polipler en sık görülen polip tipidir ve kansere dönüşme potansiyeli taşımaktadır. Adenomatöz poliplerin malign adenokarsinoma dönüşmesi yaklaşık 10 yıl sürmektedir (35,36). KRK'ler patolojik olarak adenokarsinom, nöroendokrin, skuamöz hücreli, adenoskuamöz, iğsi hücreli ve undiferansiye karsinomlar şeklinde sınıflandırılabilir (37). Müsinöz ve taşlı yüzük hücreli alt tipleri olan adenokarsinomlar, tüm KRK vakalarının %90'ından fazlasını oluşturmaktadır (37). Birçok gen ve sinyal yolaklarının etkileşimi kolorektal kanser gelişimiyle ilişkilendirilmiş, ancak bu karmaşık süreç hala tam olarak aydınlatılamamıştır (35). KRK'ye yol açan heterojen moleküler olayların kombinasyonu, genetik mutasyonlar ve gen dizisi değişmeden gen ifadesinin düzenlenmesini içeren DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik değişikliklerden kaynaklanmaktadır (38). KRK örneklerinden yapılan güncel kohort çalışmalarda, somatik gen varyantlar sıklıkla *TP53, KRAS, APC, KDR, PIK3CA, SMAD4, BRAF, FBXW7, NRAS, MET* ve *PTEN* genlerinde görülmüştür (39).

KRK gelişimi, hücrelerin kontrolsüz çoğalması, anormal hücre farklılaşması, apoptozdan kaçış ve metastaz gibi bir dizi anormal süreci içermektedir (31). Adenom-karsinom dönüşümü üç ana genomik instabilite yolu ile bağlantılıdır: kromozomal instabilite (CIN), mikrosatellit instabilite (MSI) ve CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) (18,40). Kromozom sayısı ve yapısındaki değişikliklerle karakterize CIN, sporadik KRK vakaların yaklaşık %80'inde tespit edilen en yaygın genomik instabilitedir (18,41). Klasik adenom-karsinom modelinde KRK oluşumu *APC* genindeki mutasyonlarla başlar, bunu

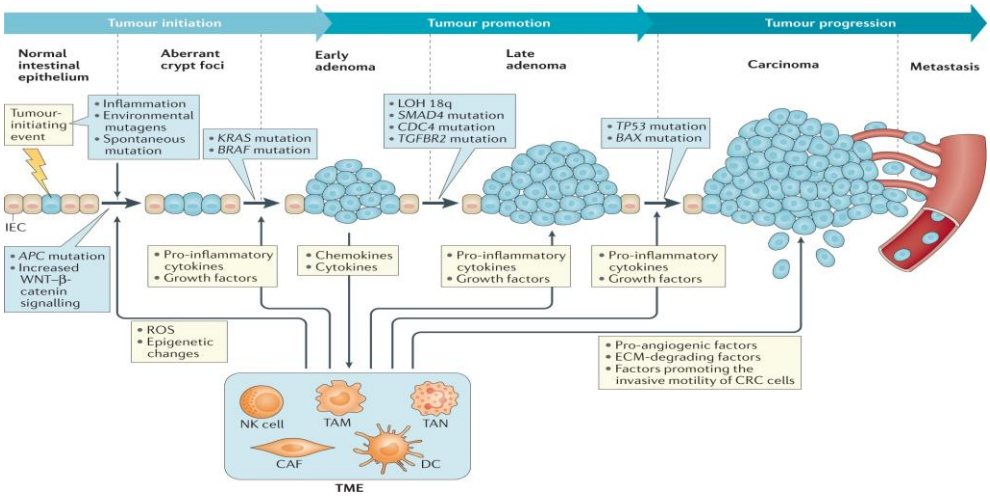
KRAS/NRAS genleri ve *SMAD4*'teki mutasyonlar izler ve *TP53* genindeki mutasyonlarla sonuçlanır (39,42). Alternatif bir yolakta ise, bazı KRK'lerde bulunan öncül lezyon olan serrated poliplerden gelişmektedir (CIMP ve sporadik MSI). CIN yolağı, *APC* genindeki bir mutasyonla başlar ve bunu *KRAS, PIK3CA* ve *SMAD4*'teki müteakip mutasyonların yanı sıra kromozom 18'deki heterozigotluk kaybı (LOH 18q) ve *TP53* geninin mutasyonu izler (40). İkinci en sık görünen genomik instabilite, KRK'lerin yaklaşık %15-20'sinde görünen MSI'dır (18). MSI, kusurlu bir DNA yanlış eşleşme onarım (mismatch repair; MMR) sisteminden kaynaklanmakta ve genom boyunca tekrarlayan DNA dizilerinin sayısında değişiklikler ile karakterizedir (18,43). MSI, genellikle daha yaşlı hastaların sporadik KRK'lerinde, MMR gen promotör bölgelerinin metilasyonuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (44,45). MSI tümörler, MSS'ye kıyasla farklı klinikopatolojik özellikler sergilemektedir; daha yaygın olarak proksimal kolonda yerleşmektedir. Ayrıca, daha yaygın olarak kötü differansiye ve müsinöz veya taşlı yüzük histolojik tipindedir (46). CIMP yolağı, gen promotör bölgelerinin anormal metilasyonuyla karakterize olup daha çok serrated polipler ile ilişkilidir ve başlıca KRK'lerin proksimal (sağ) kısmında görülmektedir (18,40).

Sinyal yolakları, hücre çoğalması, farklılaşma, sağkalım ve apoptoz, hücre göçü ve invazyonu gibi çok sayıda hücresel aktiviteyi düzenlemektedir. Sinyal yolaklarının disregülasyonu, KRK de dahil olmak üzere birçok kanser türünde sıklıkla gözlemlenmektedir. Moleküler sinyal yolaklarının anlaşılması, KRK'nin oluşumu ve ilerlemesinin anlaşılmasına fayda sağlayacaktır. KRK gelişiminde majör rol oynayan moleküler sinyal yolakları, hücre biyolojisinin temel düzenleyicileri olan Wnt/β-katenin, MAPK/ERK ve PI3K/AKT/mTOR eksenleridir. Bu sinyal yolaklarının deregülasyonu ve aşırı aktivasyonu, son zamanlarda KRK karsinogenezindeki araştırmaların yoğun odağı haline gelmiştir. Wnt/β-katenin yolağının, KRK'nin erken döneminde anormal şekilde aktive olması tümör oluşumu ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Wnt ligandlarının Frizzled ve düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP) reseptörlerine bağlanmasıyla aktive olan bu yolak, β-katenin yıkım kompleksini inhibe eder ve β-kateninin sitoplazmada birikmesine yol açar (18,47). Sitoplazmada biriken β-katenin, nükleusa geçerek *MYC* ve *Cyclin D1 (CCND1)* gibi hücre proliferasyonunda etkili genlerinin transkripsiyonel aktivasyonuna neden olmaktadır (47). Tüm KRK'lerin

yaklaşık %90'ında, ana başlatıcı olay, β-katenin düzenlenmesinde rol oynayan proteini kodlayan kromozom 5q22'de bulunan tümör supressör *APC* geninin kaybıdır (48). *APC* genindeki mutasyonlar bu düzenlemeyi bozarak β-kateninin çekirdekte birikmesine yol açmaktadır (36). Ayrıca, Wnt ligandlarının aşırı ekspresyonu veya Frizzled reseptörlerinin aktivasyonu da Wnt sinyalini arttırarak KRK oluşumunu tetikleyebilmektedir.

KRK'de rol oynayan bir diğer yolak ise MAPK/ERK Yolağıdır. RAS-RAF-MEK-ERK yolağı olarak da adlandırılan bu yolak, hücresel proliferasyon, farklılaşma ve sağkalımın yanı sıra otofajiyi düzenleyen kritik bir sinyal kaskadıdır. Epitelyal büyüme faktörünün (EGF) EGF reseptörüne (EGFR) bağlanmasıyla aktifleşen bu yolak, RAS-RAF-MEK-ERK proteinlerinin aktive olmasıyla ERK nükleusa geçip transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek Cyclin D gibi hücre proliferasyonunda rol oynayan genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır (49). *KRAS* ve *BRAF* mutasyonları gibi bu yolaktaki genetik değişiklikler, yolağın aşırı aktivasyonuna yol açarak KRK gelişimini tetiklemektedir ve daha agresif ve tedaviye dirençli tümörlerin gelişimiyle ilişkilendirilmiştir (40,50).

Öte yandan, PI3K/AKT/mTOR yolağı, hücresel büyüme, metabolizma, apoptoz ve protein transkripsiyonunu düzenleyen kritik bir sinyal yolağıdır (18,51). MAPK/ERK yolağında olduğu gibi Reseptör Tirozin Kinaz'lar (RTK) tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilen yolakta, PI3K'nin aktivasyonu PIP2'nin PIP3'e dönüşümünü, böylece AKT ve mTOR'un aktivasyonuna yol açarak hücre sağkalımını düzenler (49,51). PIP3, tümör supressör olan fosfataz ve tensin homolog (PTEN) enzimi tarafından defosforile edilerek inaktive olur (49). KRK'de, *PIK3CA* genindeki mutasyonlar ve *PTEN'in* komutasyonu veya fonksiyon kaybı, PIK/AKT yolağının aşırı aktivasyonuna yol açarak tümör büyümesini ve ilerlemesini tetikler (39). Ayrıca, PI3K/AKT/mTOR yolağındaki düzensizlikler, KRK hastalarında tedavi standartlarına direnç ve metastaz ile ilişkilidir (49,51).



Şekil 3. KRK'nin oluşum mekanizmaları (40).

2.3.1. KRK ve Epigenetik

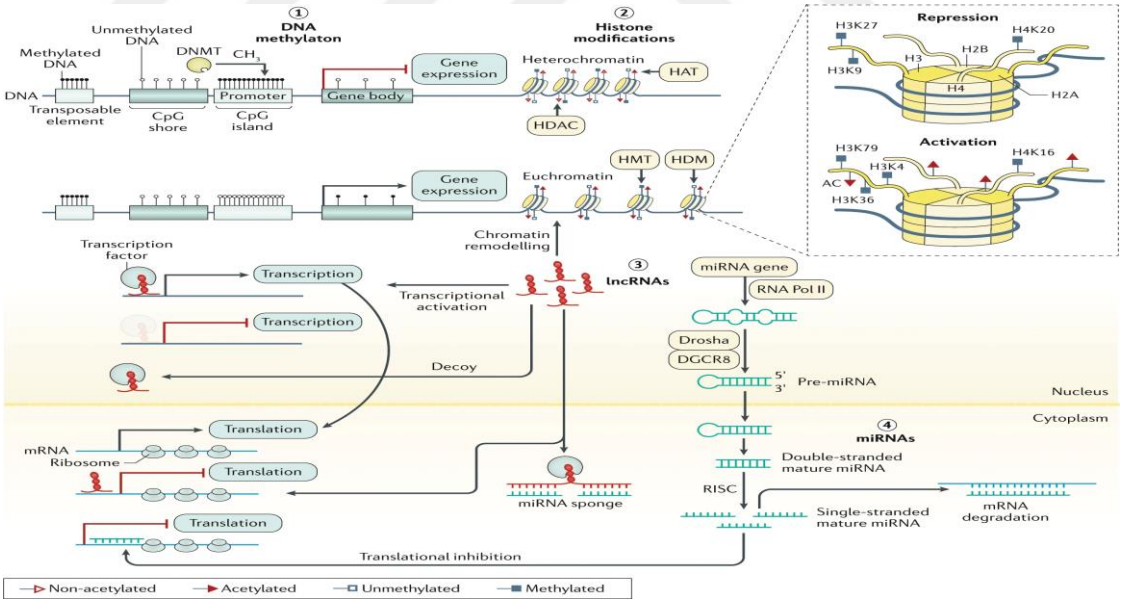
Son yıllarda, KRK dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişimi ve ilerlemesinin yalnızca genetik değişikliklerden değil, aynı zamanda epigenetik değişikliklerin bir kombinasyonundan kaynaklandığına dair kanıtlar artmıştır. Epigenetik, DNA dizisinde kalıcı değişikliklere yol açmayan ancak gen ifadesini değiştiren ve kalıtılabilen değişiklikleri ifade etmektedir (52). Yapılan çalışmalarda epigenetik düzenlemenin ilaç direncinden sorumlu olabileceği gösterilmiştir (53). Epigenetik mekanizmalar arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar (ncRNA) yer almaktadır (53,54).

DNA metilasyonu, genellikle gen promotör bölgelerindeki CpG adalarında meydana gelmektedir ve genel olarak tümör supresör genlerin susturulmasına veya onkogenlerin aktivasyonuna neden olmaktadır (52). KRK'de, DNA metilasyonundaki anormallikler sıkça görülmektedir. Örneğin, MSI, MMR sistemindeki bir kusur nedeniyle ortaya çıkmaktadır; bu kusur, MMR genlerinden birinde genetik bir varyanttan kaynaklanabileceği gibi *MLH1* geninin promotör bölgesindeki hipermetilasyon da genin susturulmasına yol açarak MSI'ye neden olabilir (54). Genom boyu DNA hipometilasyonu ise genellikle tekrarlayan DNA dizilerinde görülmektedir ve CIN'e neden olmaktadır. Hipometilasyon ayrıca *MYC* ve *RAS* gibi proto-onkogenleri doğrudan etkileyerek ekspresyonunu arttırabilmektedir (54).

Histon modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon gibi) kromatin yapısını değiştirerek gen ifadesini etkilemektedir (52). KRK'de en sık histon modifikasyonları; histon kuyruklarındaki lizin ve arginin rezidülerinin asetilasyonu/deasetilasyonu ve metilasyonu/demetilasyonudur (55). Örneğin, histon deasetilazların anormal aktivitesi, tümör supresör genlerin susturulmasına yol açarak KRK patogenezinde rol oynamaktadır (54).

MikroRNA'lar (miRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) gibi ncRNA'lar diğer RNA'lar, proteinler ve DNA ile etkileşime girip gen ifadesini modüle ederek KRK dahil çeşitli kanserlerde rol oynamaktadır (53). Bu ncRNA'ların fonksiyonlar ve birbiriyle olan etkileşimleri ilerideki bölümlerde detaylıca bahsedilecektir.

Sonuç olarak geri dönüşümlü olan bu epigenetik değişikliklerin potansiyel biyobelirteç veya terapötik hedefler olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4. KRK'deki ana epigenetik mekanizmalar (54).

2.4. KRK'nin Risk Faktörleri

KRK genetik yatkınlıklar, yaşam tarzı ve çevresel maruziyetler sonucunda oluşan multifaktöriyel bir hastalıktır. Altta yatan risk faktörleri arasında diyet ve yaşam

alışkanlıkları gibi değiştirilebilen faktörlerle birlikte tıbbi geçmiş ve aile öyküsü gibi değiştirilemeyen faktörler de vardır. Bu risk faktörlerinin tanınması, kanser erken teşhis, önleme ve tedavi açısından büyük önem taşımaktadır. İleri yaş (>50), KRK'nin önemli ve değiştirilemeyen bir risk faktörüdür; ancak 50 yaş altındaki bireylerde erken başlangıçlı KRK insidansı giderek artmaktadır (56). Bir diğer değiştirilemeyen risk faktörü ise erkek cinsiyetidir; erkeklerin KRK insidansı ve mortalitesi, kadınlara göre yaklaşık 1,5 kat daha yüksektir (1,35). Amerikan Kanser Topluluğu (American Cancer Society; ACS) verilerine göre bazı etnik gruplar KRK açısından daha yüksek risk altındadır; örneğin Aşkenazi Yahudileri, siyah ırk, yerli Amerikalılar ve Alaska Yerlileri (31,57).

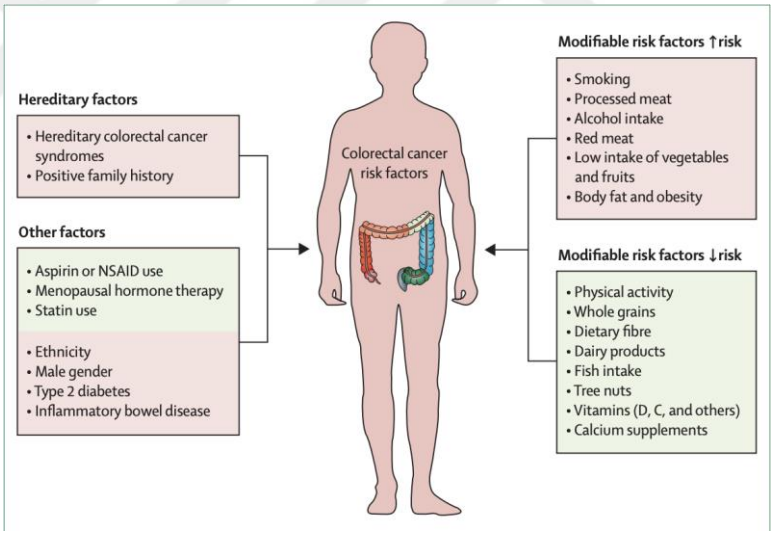
Değiştirilebilen risk faktörleri arasında ise fiziksel inaktivite, sigara ve alkol kullanımı ile batı tarzı diyet (kırmızı et, işlenmiş gıdalar, düşük lifli beslenme) öne çıkmaktadır (35,38,58–62). Ayrıca, obezite ve yüksek vücut kitle indeksi (VKİ) de KRK riskini artıran faktörlerdir (63,64). Buna karşın, yüksek lif içeren gıdalar, süt ürünleri ve D vitamini tüketiminin KRK'ye karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (19,35,57–63).

Radyasyona maruz kalma öyküsü (radyoterapi) olan hastalarda, GİS neoplazmlarının gelişme riskinin arttığı bildirilmiştir (35,65,66). Öte yandan, aspirin gibi non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların (NSAİİ) ve postmenopozal dönemde hormon replasman tedavisi kullanımının KRK riskini azalttığı gösterilmiştir (66,67).

KRK riskini arttıran bazı hastalıklar da bulunmaktadır. Örneğin, Diabetes Mellitus (DM), KRK riskini 2-3 kat artıran metabolik bir hastalık olup, hiperglisemi, hiperinsülinemi ve inflamasyon gibi çeşitli mekanizmalarla kanser gelişiminde rol oynamaktadır (68,69). Öte yandan, inflamatuar bağırsak hastalığı (İBH) olan bireylerde, özellikle ülseratif kolitte (ÜK), kronik inflamasyon nedeniyle KRK gelişme riskinin 2-6 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (70,71). Kistik fibrozis (KF) hastalarında ise, mukozal yapının etkilenmesi nedeniyle KRK riskinin genel popülasyona göre 5-10 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır (72). Ailede KRK öyküsünün, özellikle birinci derece akrabalarda veya erken yaşta (<60) tanı konmuş vakalarda riski 2-4 kat arttığı saptanmıştır (36,61,66,73).

Son olarak, bağırsak mikrobiyotası veya mikrobiyom, GİS'te yaşayan ve metabolizmayı etkileyen çeşitli mikroorganizmaların oluşturduğu ekosistem olarak tanımlanmaktadır. Sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotası, epitelin korunması, şekillendirilmesi ve bağışıklık sistemi yanıtında önemli görevler üstlenmektedir (74,75). Yapılan son çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının disregülasyonunun kanser dahil çeşitli hastalıklarda önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (36,73,75,76). Mikrobiyotanın modülasyonu için diyet, probiyotik/prebiyotik kullanımı ve fekal mikrobiyota transplantasyonu (FMT) gibi farklı stratejiler araştırılmış; probiyotiklerin KRK önlemede ve kemo/radyoterapiye bağlı komplikasyonların azaltılmasında önemli etkiye sahip olduğu saptanmıştır (74,75).

Şekil 5'te KRK ile ilişkili bazı risk faktörleri özetlenmiştir. Bu risk faktörlerinin tanınması, KRK'nin erken teşhisi ve önlenmesi açısından kritik öneme sahiptir.

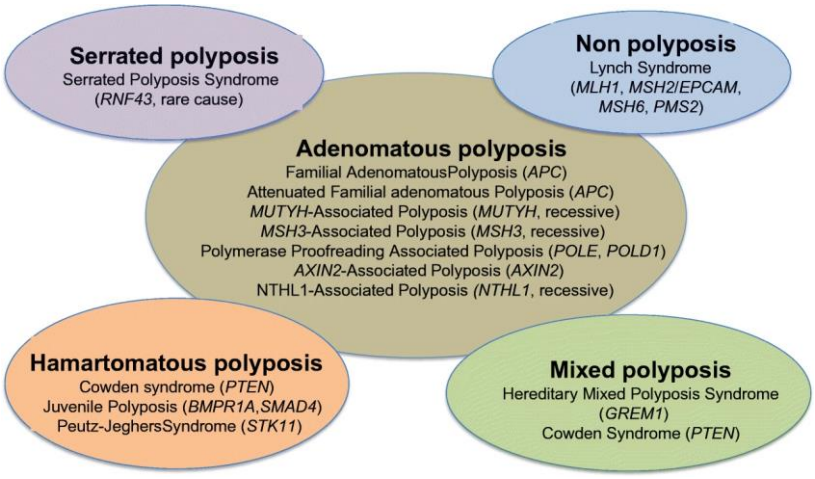


Şekil 5. KRK risk faktörlerinin özeti (77).

2.4.1. Kalıtsal KRK Sendromları

Kalıtsal KRK sendromları, kalıtılabilen germline varyantlar nedeniyle artmış KRK riski ile karakterize bir grup hastalıktır. Bu varyantlar bireylerin KRK geliştirme olasılığını önemli ölçüde arttırmaktadır. KRK'lerin büyük çoğunluğu (%80) sporadiktir. Özellikle erken başlangıçlı KRK vakalarında bu oran artmakla birlikte yaklaşık %10-20'si kalıtsal sendromlarla ilişkilendirilmiştir (32,41,73,78). Kalıtsal KRK sendromları

arasında en iyi bilinen ve en yaygın olanları *APC* ve MMR genlerindeki varyantlardan kaynaklanan FAP ve LS (kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser; HNPCC) sendromudur (41). Daha az sıklıkla *MUTYH* ile ilişkili polipozis (MAP), Peutz-Jeghers sendromu (PJS), Juvenil polipozis sendromu (JPS), Cowden sendromu, Li-Fraumeni sendromu ve sessile serrated polyposis cancer syndrome (SSPCS) gibi birçok kalıtsal hastalığın da KRK ile ilişkisi bildirilmiştir (Şekil 6) (79,80). LS, otozomal dominant kalıtılan MMR genlerindeki (*MSH2, MLH1, MSH6* ve *PMS2*) varyantlardan kaynaklanmaktadır ve tüm KRK vakalarının %3'ünden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (45,81). LS'ye bağlı KRK genellikle sağ kolonda, genç bireylerde ve senkron/metakron tümörlerle ortaya çıkmaktadır (44). Bu bireylerde yaşam boyu KRK riski %80, endometriyal kanser riski ise %60'a kadar ulaşmaktadır (44). LS tanısı için Amsterdam II ve Bethesda kriterleri kullanılmakta olup potansiyel LS vakalarını saptamak için yeni tanılı KRK vakalarında MMR protein ekspresyonu ve/veya MSI test edilmesi önerilmektedir (45). LS tanısı genetik olarak kesinleşmiş bireylerde Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) ve Avrupa kılavuzları özel taramalar önermektedir. Öte yandan, FAP, adenomatöz polipozis koli *(APC)* genindeki varyantlarla ilişkilidir ve tüm KRK vakalarının yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır (42). Çocukluk veya ergenlik döneminde başlayan klasik FAP, yüzlerce ile binlerce adenomatöz polip ile karakterizedir ve müdahale edilmediğinde 40 yaşına kadar KRK gelişme riski neredeyse %100'dür (42,82). LS'den farklı olarak FAP'a bağlı gelişen KRK ağırlıklı olarak sol kolonu tutmaktadır (82). Bu sendromların tanı ve yönetiminde genetik testler ve düzenli tarama programları kritik öneme sahiptir.



Şekil 6. Kolorektal polipozis sendromları (80).

2.5. Klinik Bulgular

KRK taramaları sayesinde daha fazla vaka asemptomatik dönemde teşhis edilebilse de çoğu hasta ileri evrede ve semptomatik dönemde tanı almaktadır (32,83). Erken evrelerde hastalar genellikle asemptomatiktir, bu durum rutin taramanın önemini vurgulamaktadır. KRK'li hastalar gaitada kan, anemi, bağırsak alışkanlıklarında değişiklik, karın ağrısı, kilo kaybı ve ileri evrelerde obstrüksiyon veya perforasyon bulguları ile kliniğe başvurabilirler. Sağ/proksimal kolon tümörleri daha çok anemi ve karın ağrısıyla, sol kolon ve rektum tümörleri ise bağırsak alışkanlıklarındaki değişiklikler veya rektal kanama ile kendini gösterir (84). Bununla birlikte, vakalarının yaklaşık %25'i tanı anında metastatik hastalığa sahiptir, bu nedenle hastaları, metastatik hastalık belirtileri açısından değerlendirmek önemlidir (3,32).

2.6. Tanı ve Tarama Testleri

KRK tanısı, tıbbi öykü, fizik muayene ve tanısal yöntemlerin kombinasyonu ile konulmaktadır. Semptomların değerlendirilmesi ve tanısal kolonoskopi tanı için altın standart olarak kabul edilir. Rektum kanseri için dijital rektal muayene ve proktoskopi veya esnek sigmoidoskopi kullanılabilir. Laboratuvar testleri (karsinoembriyonik antijen (CEA), CA-19-9) tanı ve takipte destekleyicidir, ancak kesin tanı için yeterli değildir. Radyolojik görüntüleme, evreleme amacıyla ameliyat öncesinde yapılır.

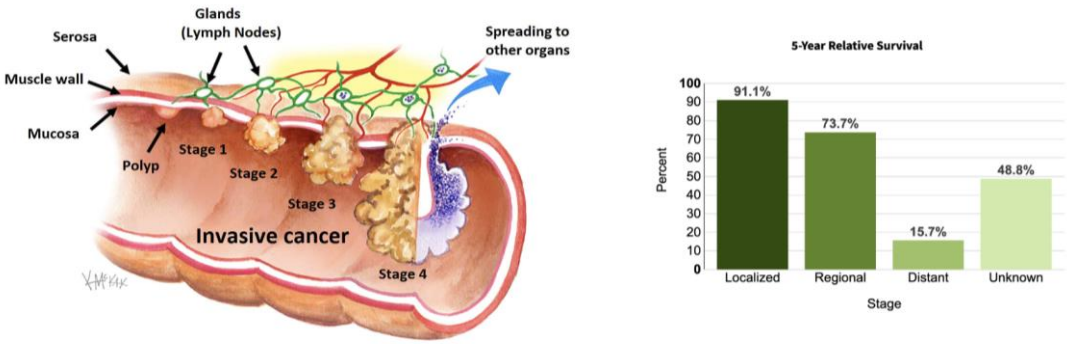
Kolonoskopi hem tarama hem de tanıda altın standarttır. Kolon boyunca anormallikleri tespit etme ve örnek alma imkanı sayesinde kolonoskopi KRK için patolojik incelemeyle birlikte altın standart tanı testi olarak kabul edilmektedir. Tipik olarak, kolonoskopi eşliğinde alınan biyopsi kanser tanısını doğrulamaktadır. Gaita tabanlı testler arasında guaiac gaitada gizli kan testi (gFOBT), fekal immünokimyasal test (FIT) ve çok hedefli gaita DNA'sı (mt-sDNA) testleri bulunmaktadır. 2014 yılında ABD'nin Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) onay alan mt-sDNA tabanlı Cologuard® testi, malign veya premalign kolorektal lezyonlarla ilişkili DNA mutasyonlarını, metilasyon belirteçlerini ve hemoglobini analiz eder (85,86), pozitiflik durumunda kolonoskopi ile doğrulanmalıdır. İnvaziv olmayan kan testlerinden Epi proColon® ve Guardant Shield™, dolaşımdaki tümör DNA'sından veya hücresiz serbest DNA'daki (ctDNA/cfDNA) genetik değişiklikleri saptamak için geliştirilmiş FDA onaylı KRK tarama yöntemleridir (78,87,88). Bilgisayarlı Tomografi (BT) Kolonografi

ise, kolonoskopiyi tolere edemeyen hastalar için bir alternatif sunar, ancak küçük lezyonları tespit etmeyebilir. Bazı özel durumlarda, örneğin İBH veya aile öyküsü olanlarda, tarama programlarının başlangıç yaşı ve sıklığı bireyselleştirilir; ailede erken yaşta KRK öyküsü olanlarda taramalara daha erken başlanması önerilmektedir (36).

2.7. Evreleme

Evreleme, KRK hastalarının prognoz ve sağkalımı belirlenmesi ve uygulanacak tedavi planlaması için kritik bir öneme sahiptir. American Joint Committee on Cancer'in (AJCC) TNM sınıflandırması, primer tümörün boyutu ve kolon/rektum duvarına invazyon derecesi (T), lenf nodu (LN) tutulumu (N) ve uzak metastaz (M) durumuna göre standart bir yaklaşım sunmaktadır. TNM sistemine göre KRK, yüzeysel kanserle sınırlı Evre 0'dan (Tis/N0/M0), metastatik Evre 4'e (herhangi bir T veya N, M1) kadar sınıflandırılmaktadır.

KRK genellikle lenfatik sistem, intraperitoneal yayılım veya kan yoluyla metastaz yapar. En sık metastaz yerleri karaciğer, akciğer ve periton'dur (32,84).



Şekil 7. KRK'nin evreleri (89) (solda) ve evrelere göre beş yıllık rölatif sağkalım (sağda) (3).

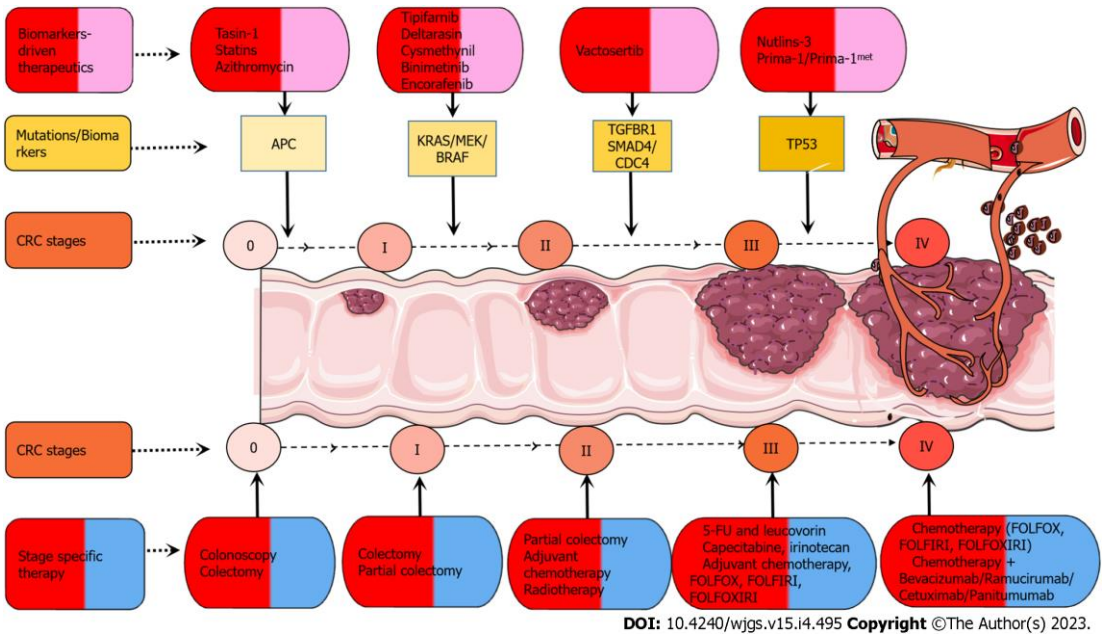
2.8. Tedavi Seçenekleri

KRK tedavisi, hastalığın evresi, patogenezi ve hastanın genel klinik durumuna göre planlanmaktadır. Cerrahi rezeksiyon, kanserin tamamen çıkarılması amacıyla en yaygın kullanılan yöntemdir. İleri evrelerde, kemoterapi (KT) (5-Flurourasil (5-FU), oksaliplatin, irinotekan gibi) ve radyoterapi (RT) adjuvan veya neoadjuvan olarak tümörün kitlesini azaltma, nüks riskini azaltma ve/veya semptomları hafifletmek

amacıyla palyatif olarak uygulanabilmekle beraber bu ajanların çeşitli kombinasyonları da kullanılmaktadır (90,91).

Hedefe yönelik tedaviler, *EGFR* inhibitörleri (cetuximab, panitumumab) ve anti-vasküler endotelyal büyüme faktörü (*VEGF)* inhibitörleri (bevacizumab, aflibercept) gibi ajanlar kullanılmaktadır (90,92). Ayrıca, *KRAS* G12C, *BRAF* V600E ve ERB-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2 (*ERBB2*; *HER2*) pozitifliği gibi spesifik mutasyonlara yönelik tedavi seçenekleri mevcuttur (92,93). Daha nadir görülen Nörotrofik Tirozin Reseptör Kinaz (*NTRK)* gen füzyonları için TRK inhibitörleri (larotrectinib, entrectinib) kullanılabilir (94). İmmünoterapi, özellikle MSI-H veya dMMR KRK'lerde etkili olup, bu hastalara da Programmed Death-1 (PD-1) inhibitörleri (pembrolizumab, nivolumab) veya CTLA-4 inhibitörleri (ipilimumab) kullanılabilmektedir (90,92).

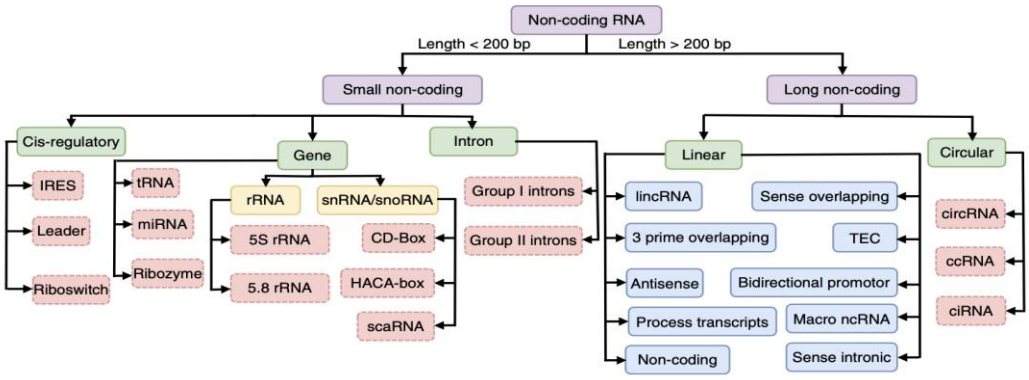
Yeni araştırmalar, kimerik antijen reseptörü T-hücresi (CAR-T) tedavisi, small interfering RNA (siRNA) ve lncRNA gibi RNA moleküllerini hedefleyen RNA terapötikleri, kanser aşıları ve onkolitik viral tedaviler gibi yenilikçi yaklaşımları içermektedir; ancak bu yöntemlerin KRK'de etkinliği hala araştırılmaktadır (90,92,95). CAR-T yöntemi kullanılarak hematolojik malignitelerde başarılı sonuçlar elde edilse de KRK gibi solid kanserlerde hala yeterli etki elde edilememiştir (92).



Şekil 8. Biyobelirteç odaklı ve kanser evresine özgü terapötik yaklaşımlar (90).

2.9. Kodlamayan RNA’lar (ncRNA’lar)

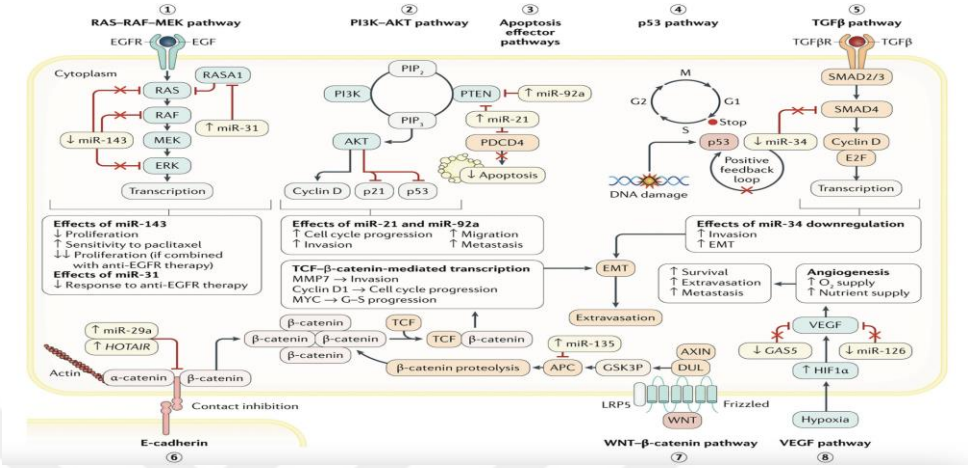
Protein kodlayan gen varyantlarının kanser oluşumunda önemli olduğu uzun zamandır bilinmektedir; bu protein kodlayan genler genomun sadece %2’lik kısmını kapsamaktadır. Öte yandan, kodlama yeteneği olmayan genomun kalan kısmının işlevi yakın bir zamana kadar bilinmemekteydi. Dizileme teknolojileri ve biyoenformatik alanındaki hızlı ilerlemeler, miRNA'lar ve lncRNA'lar dahil pek çok ncRNA'nın transkribe olabildiği göstermiştir. Buna rağmen ncRNA’ların sadece küçük bir kısmının işlevi bilinmektedir (96). ncRNA'lar, çeşitli kanserlerde onkojen veya tümör supressör genler olarak davrandığından potansiyel tanı veya tedavi biyobelirteçleri olarak kullanılma potansiyeli olduğu düşünülmektedir (97,98). Uzunlukları, yapıları ve biyolojik rollerine bakıldığında, ncRNA'lar oldukça heterojendir (96). Ayrıca, çeşitli biyolojik mekanizmalarla lokalize olduğu yerlere göre değişken işlevler gösterebilmektedir (97). ncRNA’lar, genellikle uzunluklarına göre 2 grupta sınıflandırılmaktadır; küçük ncRNA'lar ve lncRNA'lar (Şekil 9).



Şekil 9. ncRNA’ların sınıflandırılması (96).

Bol miktarda bulunan ve işlevsel olarak önemli bu ncRNA’lar arasında transfer RNA (tRNA’lar), ribozomal RNA'lar (rRNA'lar), miRNA’lar, sirküler RNA'lar (circRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lar (*long non-coding RNAs;* lncRNA’lar) gibi birçok küçük RNA türü bulunmaktadır. Protein kodlamayan, fakat çeşitli düzenleyici işlevlere katılan bu ncRNA moleküllerinin, kanser hastalarında anormal ekspresyon paternleri sergilediği bulunmuştur (30). Kapsamlı araştırmalar, çeşitli ncRNA alt tiplerinin, kontrolsüz hücre çoğalmasından metastatik potansiyele kadar KRK’nin ayırt

edici özelliklerini yönlendirmedeki rollerini saptamıştır (97). Benzer şekilde, anormal ncRNA ekspresyonunun, oluşumdan metastaza kadar KRK'nin farklı aşamalarıyla ilişkili olduğu çok sayıda çalışmada tespit edilmiştir.



Şekil 10. KRK'de rol oynayan bazı ncRNA'lar ve etki mekanizmaları (54).

2.9.1. Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar)

lncRNA'lar, RNA polimeraz II (Pol II) tarafından transkribe edilen, 200 baz çiftinden daha uzun, protein kodlamayan heterojen RNA grubu olup ncRNA'ların en büyük grubudur. lncRNA'ların sayısı hala tartışılmakla birlikte GENCODE projesinin 46. yayın (Mayıs 2024) verilerine göre insan genomu tarafından kodlanan 20,000'den fazla farklı lncRNA rapor edilmiştir. lncRNA'lar genomik konumlarına veya özelliklerine göre intergenik, intronik, diverjan (divergent), antisens, promotör ilişkili, transkripsiyon başlangıç bölgesi ilişkili lncRNA'lar ve enhancer lncRNA'lar gibi farklı şekillerde sınıflandırılabilmektedir (99–101).

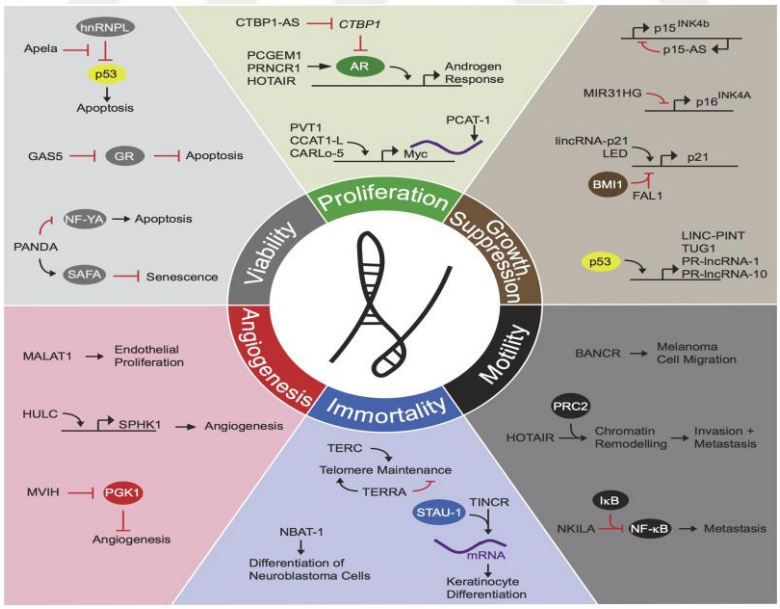
lncRNA'ların ekspresyonları hücre tipine özgüdür ve bazı istisnalar dışında mRNA'lara benzer bir şekilde splicing'e ve poliadenilasyona uğramaktadır (99). Hücre tipine ve çevresel koşullara bağlı olarak farklılık gösterse de lncRNA'ların genel olarak nükleusta, daha az bir kısmının ise sitoplazmada lokalize olduğu bilinmektedir (102). lncRNA'ların işlevselliği hücresel lokalizasyonlarına yakından bağlıdır. Nükleer lncRNA'lar gen ifadesinin düzenlenmesinde, kromatin modifikasyonu, transkripsiyonel düzenleme ve RNA işlemede önemli rol oynarken, sitoplazmik lncRNA'lar mRNA

stabilitesini, translasyonunu ve hücresel sinyal yollarını etkileyebilir (101,103). lncRNA'lar, genlerin ifadesini çeşitli mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Transkripsiyonel düzeyde, lncRNA'ların, transkripsiyonel protein kompleksi ile DNA arasında iskele görevi yaptığı düşünülmektedir (104). Ayrıca, KRK patogenezinde kritik öneme sahip miRNA'lar için moleküler sünger görevi yapabilir, böylece miRNA'ların hedef mRNA'lar için kullanılabilirliğini etkileyebilir (105). Başka bir deyişle, bu mekanizma ile lncRNA'ların, miRNA fonksiyonunun negatif düzenleyicisi ve bu bağlamda gen ifadesinin pozitif düzenleyicisi olarak hareket ettiği düşünülmektedir. Aynı zamanda bazı lncRNA'lar, miRNA'dan bağımsız olarak mRNA yıkımını uyarabilmektedir.

Çeşitli çalışmalar, lncRNA'ların farklı seviyelerde gen ekspresyonu düzenlemesi, epigenetik modifikasyonlar, transkripsiyon süreçleri ve hücresel sinyalizasyon bağlamındaki işlevsel önemini tanımlamıştır (33,102,106). Güncel literatürde, lncRNA'ların tümörogenez üzerinde önemli düzenleyici etkileri bildirilmiştir. Kodlayıcı genlerde olduğu gibi, lncRNA'ların da kanser mikroçevresindeki değişimleri hastalık gidişatını etkilemektedir. Deregüle olan lncRNA'lar, kanser hücrelerinde farklı işlevler yürüterek tümörün büyümesini, ilerlemesini ve tedavi yanıtını olumlu ya da olumsuz yönde modüle etmektedir (33,106,107). Çeşitli kanserlerde değişken düzeyde eksprese edilmesi ve kanserin birçok basamağında rolünün tespiti, lncRNA'ları ilgi çekici hale getirmiştir. lncRNA'ların KRK gelişimindeki rolleri hala tam olarak anlaşılamamış olsa da patojenik rolü giderek daha fazla netlik kazanmaktadır. lncRNA'ların hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez, hücre sinyal iletimi ve uzak metastaz gibi süreçlere katılarak kanserlerin patogenezinde ve ilerlemesinde kritik rol oynadığı gösterilmiştir (97,98,108). *H19, HOTAIR, CCAT1, NEAT1 ve UCA1* gibi lncRNA'ların, post-translasyonel düzeyde *MYC* veya diğer Wnt/β-catenin gen ekspresyonunu hedefleyerek KRK'nin hücre proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonunda ilerleyici bir rol oynadığı saptanmıştır (34,104,109). *MEG3*'ün, PTEN'e bağımlı ubiquitin-proteazom sistemi aracılığıyla β-katenin degradasyonunu artırarak Wnt/β-katenin yolunu inhibe ettiği bulunmuştur (95). Yapılan diğer çalışmalarda, KRK tümör dokusundaki *LOC285194* ve *GAS5* gibi lncRNA'ların düşük ekspresyonunun (down-regülasyonu) ileri hastalık ve kötü prognozla ilişkili olduğu, *GAS5*'in up-regülasyonunun ise invazyon, proliferasyon

ve migrasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir (33,108). Ismail ve arkadaşlarının çalışmasında, *H19* lncRNA'nın KRK hücrelerinde artan ifade düzeylerinin, hücrelerin invazyon ve metastaz kapasitelerinin artmasına neden olduğu saptanmıştır (110). Benzer şekilde, *BANCR* lncRNA'nın KRK'deki yüksek ifade düzeylerinin metastaz ve kötü prognozla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (111). Ayrıca, *FOXC2-AS1* lncRNA'nın artan ifadesinin, lenfovasküler invazyon, TNM evresi, uzak metastaz ve KRK hastalarında kötü sağkalım ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (112).

Öte yandan, çeşitli lncRNA'lar, KRK tedavisi ile ilişkilendirilmiştir. *KCNQ1OT1*, *TUG1* ve *H19* lncRNA'ların anormal ekspresyonunun metotreksat direncini artırabileceği, *XIST* ve *ROR1* lncRNA'ların ise KRK'de çoklu ilaç direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (104,113). Ayrıca, lncRNA *H19*'un otofajiyi artırarak, *TUG1* lncRNA'nın ise apoptotik yolakları engelleyerek 5-FU direncinde rol oynadığı saptanmıştır (33,113). Öte yandan, up-regüle *LINC00261*, sisplatine karşı artan duyarlılıkla bağlantılıdır (33).



Şekil 11. lncRNA'ların KRK'deki işlevleri. (103)

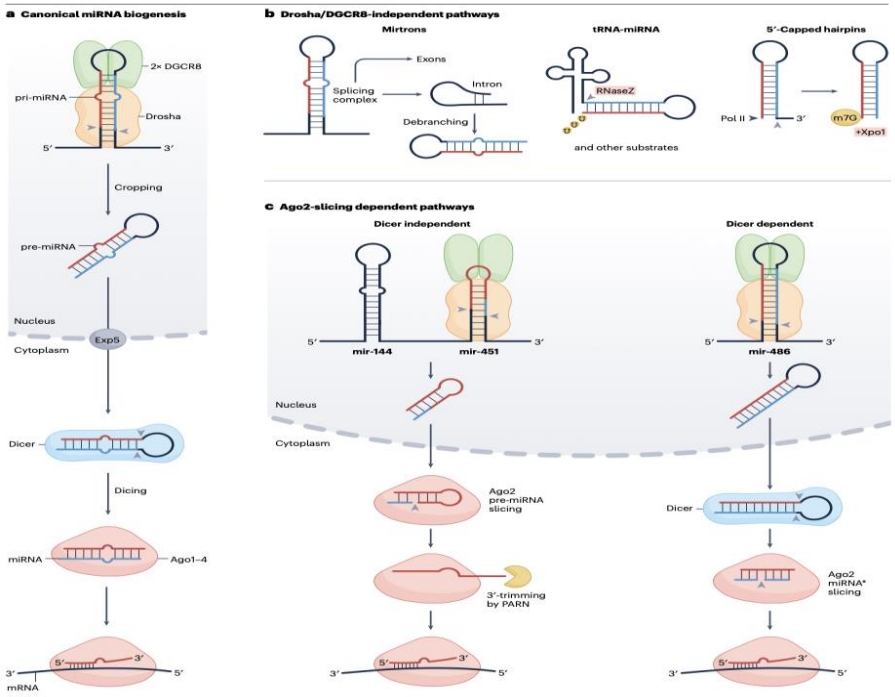
2.9.2. MikroRNA’lar (miRNA’lar)

miRNA'lar, onkojenez süreçlerini etkileyerek KRK’de önemli bir rol oynamaktadır. Tümör gelişimi üzerindeki etkileri nedeniyle tedavi ve tanı için potansiyel hedef olarak görülmektedir. miRNA'lar, ortalama 22 nükleotitten oluşan, gen ifadesinin düzenlemesinde rol oynayan, protein kodlamayan küçük RNA’lardır (114). İnsanda bugüne kadar 2000’den fazla olgun miRNA tanımlanmıştır (115). İnsan miRNA’ların çoğu kodlamayan transkriptlerden veya intronlardan RNA polimeraz II/III aracılığıyla transkribe olmaktadır ve sadece az bir kısmı protein kodlayan genlerin ekzonlarıyla örtüşmektedir. miRNA'lar, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz gibi süreçleri kontrol eden genlerin translasyonunu uygun şekilde düzenleyerek bu süreçlerde önemli rol almaktadır (54,116). miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3' UTR tamamlayıcı dizilerine bağlanarak gen ifadesini düzenlemektedir.

miRNA’ların oluşumu tipik olarak nükleusta primer miRNA (pri-miRNA)’nın iki RNase III enzimi (Drosha/DGCR8) tarafından kırpılarak miRNA prekürsör olan pre-miRNA’ya dönüştürülmesiyle başlamaktadır (114). Bunu takiben, pre-miRNA Eksportin-5 (XPO5) aracılığıyla sitoplazmaya taşınır. Aktarılan pre-miRNA, başka bir RNase III (Dicer) tarafından terminal kısmı yakınından kesilerek dubleks miRNA’ya çevrilir (114). Oluşan olgun miRNA dubleksi, Argonaute (Ago) protein ailesinin bir üyesine bağlanarak passenger ipliği degrade olur ve olgun tek iplik işlevsel miRNA’ya dönüşür ve mRNA hedeflerine bağlanır. miRNA’lar tipik olarak hedef mRNA'ın 3’ untranslated bölgesine (UTR) bağlanmakta, böylece hedef mRNA'nın translasyonunu engelleyerek ya da yıkımlarını tetikleyerek protein sentezini etkilemektedir (115). miRNA’nın 5’ ucundaki 2-8 bazlık tohum dizisi (seed sequence) bölgesi, miRNA’nın mRNA’yı tanımasına yardımcı olur.

Öte yandan, miRNA’lar translasyon arttırıcı olarak görev yapabilirler. Örneğin, *miR-369*'un *TNF* ve *FXR1'*e bağlanarak translasyonu aktive ettiği tespit edilmiştir (115). Bazı durumlarda ise miRNA işlevinin, hücre döngüsüne bağlı olarak baskılama ve aktivasyon arasında değiştiğini gösterilmiştir (115). Bir miRNA, birden fazla mRNA’yı hedefleyebilir ve böylece geniş çaplı bir genetik düzenleme ağı oluşturur (115). Klasik

yolak dışında Drosha veya Dicer'den bağımsız alternatif yolaklar da mevcuttur (114). miRNA biyogenez yolakları Şekil 12'de özetlenmiştir.



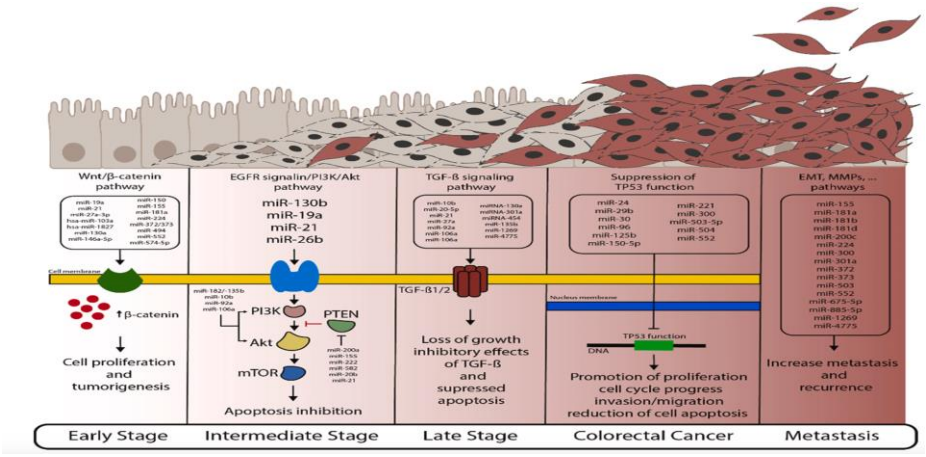
Şekil 12. miRNA biyogenez yolakları (114).

Çeşitli RNA moleküllerinin ömrü büyük ölçüde farklılık gösterir ve aynı RNA'nın dinamikleri çevre koşullarına bağlı olarak önemli ölçüde değişebilir. Örneğin, mRNA'nın ortalama yarı ömrü 2-4 saat iken, birçok miRNA'nın yarı ömrü birkaç gün ila haftalar arasında değişmektedir. Olgun miRNA'ların bu stabilitesinin, ekzoribonükleazlardan onları koruyan Ago proteinleri ile olan güçlü ilişkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (114). miRNA'ların etkileyici stabilitesi ve kolay tespit edilebilirliği, miRNA'lara önemli bir avantaj sağlar.

miRNA'ların düzenleyici işlevlerinin normal hücre faaliyetleri için ne kadar önemli olduğu göz önüne alındığında, düzensizliğinin insan hastalığına neden olması beklenmedik bir durum değildir. miRNA'ların disregülasyonu kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Kanserdeki miRNA'ların dengesizliği genellikle nüks, yakın veya uzak metastazın başlaması veya hastanın genel sağ kalımının azalmasını içeren kötü sonuçlarla

bağlantılıdır. Karsinogenezdeki kilit sinyal yollarını modüle ederek tümörün türüne, evresine ve mikroçevresine bağlı olarak onkojen veya tümör baskılayıcı olarak davranabilmektedir (115,116). Tümörlerde miRNA'lar up-regüle veya down-regüle olabilmektedir. Kanser hücrelerinde gözlenen artmış aktivite, genellikle up-regüle olan onkojenik miRNA'lar tarafından tetiklenebilirken, azalmış aktivite down-regüle olan tümör baskılayıcı miRNA'ların sonucu olabilmektedir (117). Yapılan çalışmalarda, KRK hastalarında anormal ekspresyonu olan *miR-155, miR-21, miR-106* ve *miR-144* onkojenik özelliklere sahipken, *let7-g, miR-34a, miR-143* ve *miR-145*'in ise tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü saptanmıştır (118–121).

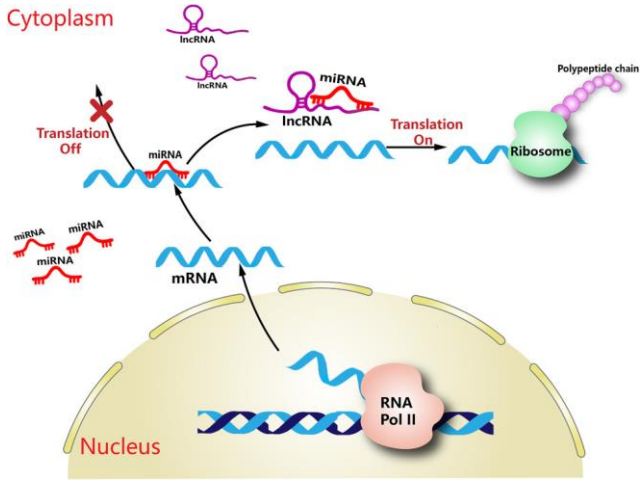
Birçok miRNA'nın, KRK'lerde hücre proliferasyonu ile ilişkili hücre siklusunun checkpoint aşamalarında düzenleyiciler olarak hareket ettiği ya da apoptoz inhibitörleri olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (122). *miR-135* ve *miR-21* gibi bazı miRNA'lar, KRK patogenezinde önemli rol oynayan Wnt/β-catenin yolağındaki genleri etkileyerek, ileri tümör evresi ve kötü prognozla ilişkili Wnt sinyalinin artmasına neden olmaktadır (123–125). miRNA'lar, KRK'nin tedavi yanıtı ve prognoz tahmininde de rol oynamaktadır. Örneğin, *miR-31-3p'in* metastatik KRK'de Cetuximab gibi anti-EGFR tedavisine yanıtın bir göstergesi olduğu bulunmuştur (115,121). *miR-21-5p,* 5-FU direnci ve radyosensitivite, *miR-425-5p* ise kemorezistans ile ilişkili bulunmuştur (126). Ayrıca, dolaşımdaki (circulating) *miR-21*'in, klinik seyri ve tedavi yanıtını tahmin etmedeki potansiyeli KRK hastalarının yönetiminde diagnostik ve prognostik biyobelirteç olarak umut vaat etmiştir (120,127). Buna ek olarak, KRK modellerinde *miR-155* gibi belirli miRNA'ların genotipe özgü miRNA ekspresyon modelleri gösterdiği, tanısal ve prognostik belirteçler olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (123). Başka bir çalışmada, *miR-34a*'nın up-regülasyonunun metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (121).



Şekil 13. KRK'de rol oynayan bazı miRNA'lar (120).

2.9.3. Kompetitif Endojen RNA (ceRNA) Hipotezi

ceRNA ağı hipotezi, mRNA'lar, psödogenler, lncRNA'lar ve circRNA'lar gibi farklı RNA'ların ortak miRNA'lara bağlanmak için rekabet ettiğini ve sonuçta hedef genlerin ve birbirlerinin ifadesini düzenleyebileceğini varsaymaktadır (128,129). miRNA'lar, mRNA'larda bulunan miRNA tanıma elemanlarına (miRNA recognition elements; MRE'ler) parsiyel olarak bağlanmaktadır (34). Bu MRE'ler tipik olarak 5'UTR, kodlama dizilerinde ve özellikle ncRNA ve mRNA'da olduğu gibi çeşitli RNA'nın 3'UTR bölgelerinde bulunmaktadır (34). MRE'lere sahip birçok RNA transkriptinin (ceRNA) miRNA ifadesini ve işlevini modüle eden rekabetçi inhibitörler (miRNA süngerleri) olarak hareket ettiği ve miRNA'ların birincil hedef mRNA'larına bağlanmasını engellediği öne sürülmüştür (34). Bu miRNA süngerleri, MRE için endojen mRNA'larla rekabet ederek miRNA'ların hedef genlerini düzenlemek için kullanılabilirliğini azaltmaktadır. Özetle, iki RNA molekülü ortak MRE'yi paylaştığında, potansiyel olarak aynı miRNA için rekabet edecektir. Dolayısıyla, bir ceRNA'nın ifadesi up-regüle olarak düzenlendiğinde, daha fazla miRNA'yı bağlayacaktır ve ortamdaki serbest miRNA miktarı azalacaktır; miRNA süngeri gibi işlev görecektir. Aynı MRE'yi paylaşan mRNA'ya ise daha az miRNA bağlanabilecektir. Dolayısıyla, miRNA baskısından kurtulan bu mRNA'lar daha aktif hale gelecektir. Bu rekabet dinamiği, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.



Şekil 14. ceRNA'nın mekanizması (130).

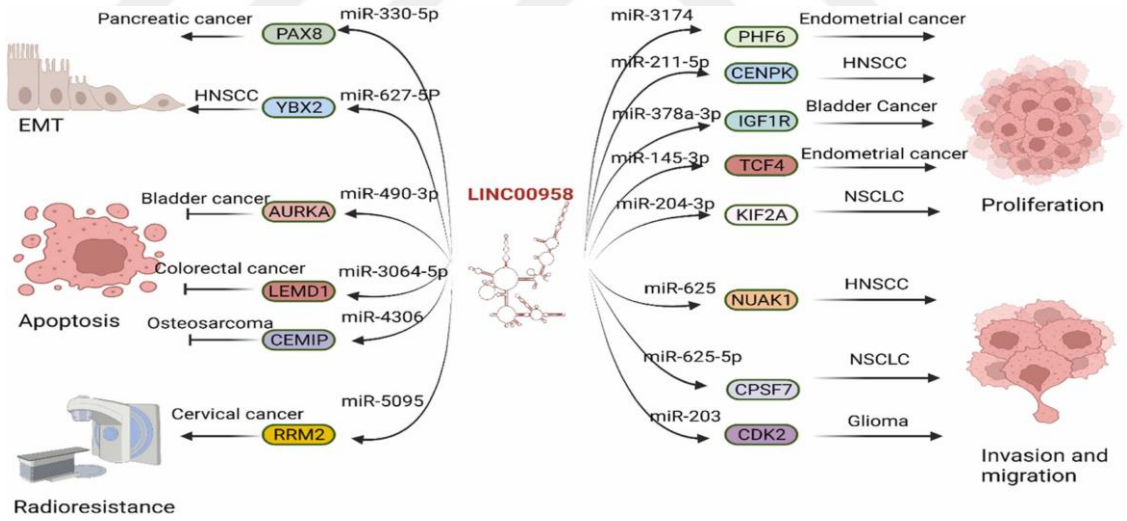
Günümüzde ceRNA mekanizmasının, kanserin gelişiminde rol oynadığı birçok çalışmayla kanıtlanmıştır. Örneğin, lncRNA *H19*'un, KRK'de epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) ve tümör büyümesini desteklediği bulunmuştur (131). Bunu, tümör supressör olan *miR-138* ve *miR-200a*'yla rekabet ederek sekestre ettiğini, böylece EMT'de rol oynayan *VIM, ZEB1* ve *ZEB2* genlerinin ifadesini up-regüle ederek gerçekleştirdiği gösteren çalışmalar vardır (128). ceRNA ağlarının patogenez, metastaz ve tedaviye direnç gelişimi gibi KRK'deki çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynadığı keşfedilmiştir (34,132). lncRNA *MIR4435-2HG*'nin (*LINC00978*), *miR-206/YAP1* sinyal yolunu düzenleyerek KRK'nin ilerlemesi ve metastazını yönlendirmede rol oynadığı gözlemlenmiştir (132). Benzer şekilde, lncRNA *UICLM, miR-215* için rakip bir ceRNA olarak davranarak KRK karaciğer metastazını kolaylaştırmaktadır (133). Başka bir çalışmada, lncRNA *HOTAIR'ın miR-93/ATG12* aksını düzenleyerek KRK'de radyasyon direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (134).

Bir gene benzeyen ancak protein kodlamayan bir RNA olan psödogen, miRNA bağlamak için fonksiyonel geniyle rekabet edebilen bir ceRNA türüdür. Yapılan bir çalışmada, psödogen olan *PTENP1* 3' UTR'nin aşırı ekspresyonu *PTEN* ifadesini arttırarak kanser proliferasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir (128). Aynı çalışmada, *PTENP1*'in susturulmasının, *PTEN* ifadesini azaltarak kanser hücresi proliferasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Özetlemek gerekirse, up-regüle olan lncRNA'lar, miRNA'ların negatif düzenleyicisi ve bu bağlamda gen ekspresyonunun pozitif düzenleyicisi olarak hareket etmektedir (135).

2.9.4. *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* Yolağı

2.9.4.1. *LINC00958* (*BLACAT2*)

lncRNA'lar, gen ifadesini düzenleme ve karsinogenezdeki muhtemel rolleri nedeniyle kanser çalışmalarında büyük ilgi görmüştür. KRK ile ilişkili olabilecek güncel lncRNA'lardan biri olan *LINC00958*'in *(BLACAT2)*, birden fazla kanser türünde onkojenik özellikleri bildirilmiştir (8,136). Mesane, akciğer, baş-boyun, HCC, meme, endometrium, serviks ve KRK gibi çeşitli kanserlerdeki etkisi araştırılmıştır (Şekil 15) (8,136). *LINC00958*'in kanserdeki etkileri esas olarak spesifik miRNA'ları bağlaması ve böylece hedef genlerin ekspresyonunu artırarak ceRNA olarak işlev görmesinden kaynaklanmaktadır. Yüksek *LINC00958* seviyeleri, ileri tümör evreleri ve daha kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (8,136). PI3K/AKT ve Wnt/β-katenin dahil olmak üzere sinyal yolakları ve KRK gelişimindeki rolü, *LINC00958*'i tedavi ve prognoz biyobelirteçi olarak araştırmaya değer bir hedef haline getirmiştir (8,137,138).



Şekil 15. LINC00958'in karsinogenezdeki rolü ve çeşitli kanserlerdeki diğer ncRNA'larla ilişkisi (8).

2.9.4.2. *miR-3619-5p*

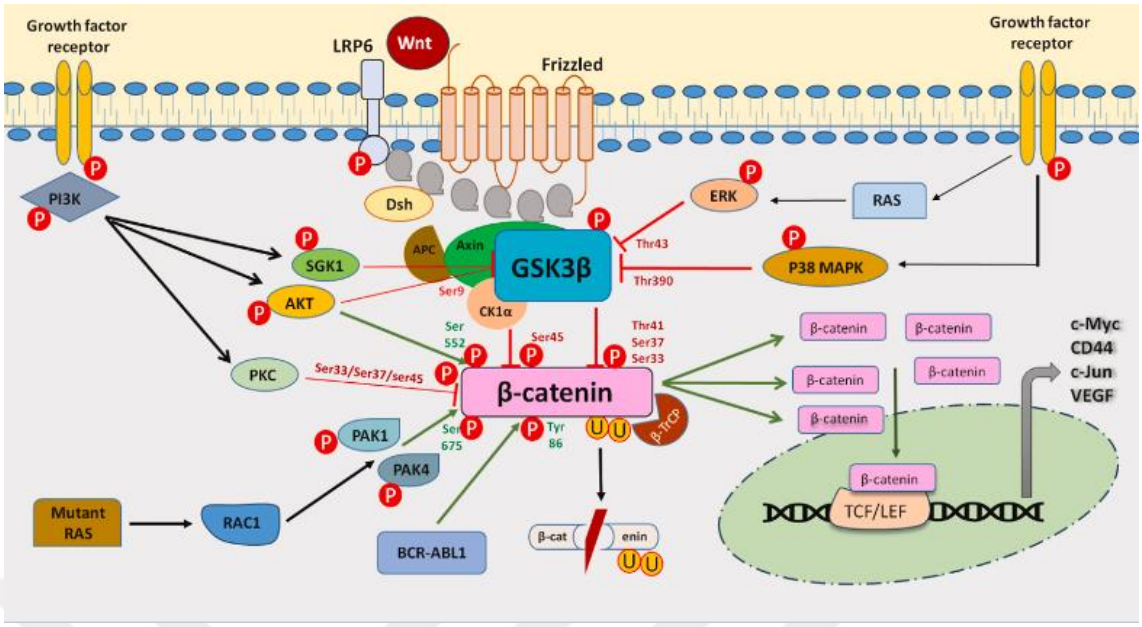
miRNA'ların oynadığı karmaşık düzenleyici rollerin anlaşılması, kanser biyolojisine katkılarının aydınlatılmasında çok önemlidir. Bu miRNA'lar arasında *miR-3619-5p*, çeşitli onkojenik yolaklar içinde önemli bir modülatör olarak ortaya çıkmıştır.

miR-3619-5p özellikle hücre çoğalması, apoptoz ve metastazda çok önemli olan hedef genlerin post-transkripsiyonel düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Güncel çalışmalar, *miR-3619-5p*'nin karsinogenez ve metastazda düzenleyici rolünü aydınlatmayı hedeflemiştir. *miR-3619-5p*'nin, RB, over, mide, prostat, mesane, karaciğer, akciğer ve KRK gibi çeşitli kanserlerdeki geniş ceRNA ağlarına dahil olduğu gösterilmiştir (9,139,140).

miR-3619-5p'nin, KRK dokularında down-regüle edildiğinde özellikle de Wnt/β-katenin yolağının disregülasyonu ile daha kötü hasta prognozu, artan hücresel proliferasyon ve invazyon gibi ileri malignite özellikleriyle ilişkili bulunmuştur (10,12). *miR-3619-5p* ekspresyon seviyeleri ile KRK hücre proliferasyonu ve migrasyonu arasındaki ters korelasyon, bu miRNA'nın KRK'de bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü düşündürmektedir (12).

2.9.4.3. β-katenin (*CTNNB1)*

CATENIN, BETA-1 geni (*CTNNB1*; OMIM* 116806) tarafından kodlanan β-katenin, epitel hücrelerin adhezyonu, gen transkripsiyonu, ve çeşitli sinyal yolaklarındaki işlevi nedeniyle kritik öneme sahiptir (141). Wnt yolağı ile ilişkili gen ifadesi, nükleer efektör olan β-katenin tarafından iletilmektedir (48). β-katenin'in disregülasyonu, başta KRK olmak üzere birçok kanser ile ilişkilendirilmiştir. Bugüne kadar β-katenin'in up-regülasyonunun KRK hücrelerinde proliferasyon, apoptozdan kaçış, migrasyon, invazyon ve tedaviye direnç gibi süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir (142,143). Ayrıca, KRK'de β-katenin'in artmış ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur (143). Bu nedenle, yolağın çeşitli bileşenleri potansiyel terapötik/prognostik hedefler olarak araştırılmaktadır (48,144). KRK'de β-katenin seviyelerinin artmasına neden olan en yaygın mutasyonlardan biri *APC* geninde meydana gelmektedir. *APC* mutasyonlarında Wnt yolağındaki yıkım kompleksi işlevselliğini kaybederek β-katenin'in stabilizasyonuna ve onkojenik Wnt hedef genlerinin aktivasyonuna yol açmaktadır (145). *CTNNB1* genindeki, özellikle genin hot-spot bölgesi olan ekzon 3'teki, mutasyonlar da β-katenin disregülasyonuna ve proteinin sürekli aktivasyonuna neden olmaktadır (146,147).



Şekil 16. β-katenin'in düzenlenmesi ve çeşitli yolaklarla etkileşimi (143).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hastaların Seçilmesi ve Kayıtların Tutulması

Çalışmamız vaka-kontrol modeliyle tasarlanmış olup araştırma için gerekli etik onay, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan alınmıştır (sayı: B.30.2.ATA.0.01.00/400, karar no ve tarihi: 49; 02.05.2023). Çalışma kapsamında, 18-80 yaş aralığında KRK tanısı konulmuş 40 hastanın dahil edilmesi hedeflenmiştir. Çalışmaya katılan tüm hastalardan yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır. Mayıs 2023 ile Kasım 2024 tarihleri arasında, Genel Cerrahi kliniğinde KRK tanısı kesinleşmiş hastalardan cerrahi müdahale sırasında 40 kanser doku örneği alınmıştır. RNA ekspresyonlarının karşılaştırılabilmesi amacıyla, aynı operasyon esnasında patolog tarafından tümör negatif olarak tanımlanmış komşu bölgelerden 40 normal doku örneği de toplanmıştır. Tüm numuneler, rezeksiyon sonrası hemen Eppendorf tüpüne, lncRNA, miRNA ve mRNA izolasyonu ve analizi yapılana kadar -80'de saklanmıştır.

Çalışmaya Alınma Kriterleri:

1. KRK tanısı almış olması.
2. Bu çalışmaya katılmayı kabul etmesi ve onam formunu imzalamış olması.
3. Sonuçları etkileyecek herhangi başka bir kronik hastalığının olmaması.

Dışlanma Kriterleri:

1. Kemoterapi almış olması
2. Başka neoplazi öyküsü olması (KRK dışında)
3. RNA düzeylerini değiştirebilecek uzun süreli tedavi almış olması.

lncRNA-miRNA-mRNA etkileşim verilerini analiz ederken, etkileşimleri miRDB ve TargetScan gibi hedef tahmin yöntemi kullanılarak tahmin edildi.

Hastaların dahil edilme ve dışlanma kriterleri dikkate alınarak seçilen hastaların dokularından elde edilen total RNA, komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldıktan sonra kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemiyle analiz edildi.

Bu analizde *LINC00958, miR-3619-5p ve CTNNB1* genlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi. Ekspresyon analizinin doğru yapılabilmesi için normalizasyon amacıyla çeşitli kontrol genleri kullanıldı; lncRNA ve mRNA için *GAPDH*, miRNA için ise *U6* genleri kontrol geni olarak seçilmiştir.

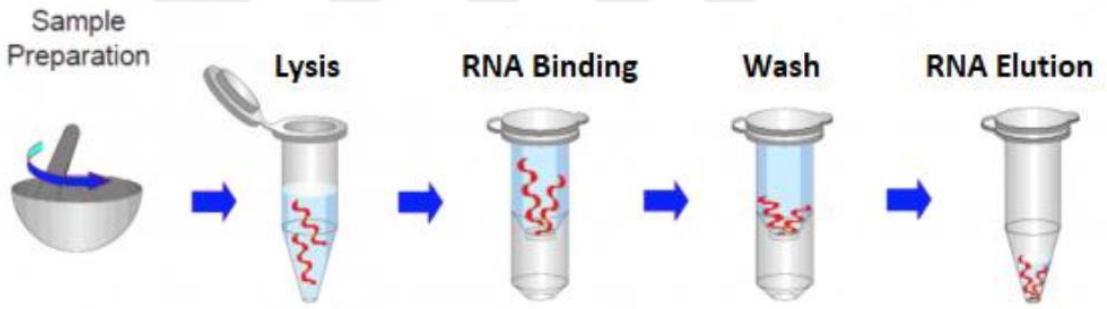
Aynı zamanda hastaların laboratuvar ve klinik verileri tıbbi kayıtları incelenerek kaydedildi. Verilerin gizliliği açısından azami hassasiyet gösterildi.

3.2. Total RNA İzolasyonu

Alınan doku örnekleri, Qiagen TissueLyser LT (Şekil 17) kullanılarak üretici tavsiyelerine göre Lysis Buffer içinde boncuk kullanarak homojenize edildi. Sonrasında, total RNA izolasyonu, QuickExTotal RNA Extraction Kit'i (NucleoGene, İstanbul, Türkiye; katalog no: NGE032) kullanılarak yapıldı. Bu kit, spin kolon ve özel lizis tamponu ile doku örneklerinden elde edilen RNA'ların bozulmadan izole edilmesini sağlar. İzolasyon işleminin tamamlanmasıyla, total RNA yüksek verimlilik ve saflıkta elde edildi. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonunu ve saflığı MaestroNano Micro-Volume spektrofotometre (Şekil 18) cihazı ile ölçüldü, A260/A280 absorpsiyon oranını kontrol ederek izole edilmiş standardize RNA'lar -80°C'de saklandı. Total RNA izolasyon basamakları Şekil 19'da özetlendi.

Şekil 17. Qiagen TissueLyser LT cihazı

Şekil 18. MaestroNano Micro-Volume spektrofotometre



Şekil 19. Total RNA izolasyonu basamakları

Total RNA izolasyonu için kullanılan QuickEx Total RNA Extraction Kit'in protokolü aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır;

1. Örnek ile lizis tamponunun tam olarak karıştığından emin olduktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Daha sonra katı partiküller kolonu tıkayacağından 14,000 xg'de 2 dakika boyunca santrifüje edildi (Şekil 20). Süpernatant dikkatlice çekilip yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Lizis tamponunda parçalanmış örneğe eşit miktarda etanol (%95-100) eklendi ve 1 dakika boyunca vortekslenip iyice karıştırıldı.
3. Karışımı bir *Collection* tüpündeki *Spin* kolona aktarıldı ve 11,000 xg'de 30

saniye boyunca santrifüjlendi. *Collection* tüpünü boşaltıp *Spin* kolonu *Collection* tüpüne geri yerleştirildi.

4. RNaz içermeyen bir tüpe 5 µl DNaz l (6 U/L) ve 45 µl DNaz l buffer eklendi ve hafifçe ters çevirerek karıştırıldı. Karışım kolon matriksine yavaşça eklendi. On beş dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. *Spin* kolona 400 µl yıkama l buffer eklendi ve 11,000 xg'da 30 saniye boyunca santrifüjlendi.
6. Tekrar *Spin* kolona 400 µl yıkama l buffer eklendi ve 11,000 xg'de 30 saniye boyunca santrifüjlendi. *Collection* tüpü boşaltıldı ve *Spin* kolonu *Collection* tüpüne tekrar yerleştirildi.
7. *Spin* kolona 700 µl yıkama ll buffer eklenip 14,000 xg'de 1 dakika santrifüjlendi. *Collection* tüpü atıldı ve *Spin* kolonu nükleaz içermeyen yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
8. RNA'yı elde etmek için 100 µl Elüsyon buffer'i doğrudan *Spin* kolonunun merkezine eklenip 11,000 xg'de 2 dakika santrifüjlendi. Yüksek konsantrasyonlu RNA elde etmek için 100 µl Elüsyon kullanıldı.

Aksi belirtilmediği takdirde üretici firmanın önerdiği gibi tüm adımları oda sıcaklığında ve santrifüj işlemi 10,000-16,000 xg'de 1 dakika boyunca gerçekleştirildi.

Şekil 20. Nüve NF 048 santrifüj cihazı

3.3. cDNA Sentezi (lncRNA ve mRNA)

İzole edilen total RNA'dan lncRNA ve mRNA cDNA'sı elde etmek için cDNA Synthesis Kit'i (5X) (NucleoGene, İstanbul, Türkiye; katalog no: NGMM019) kullanıldı. Bu kit, konsantre master mix, tampon, deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP)'ler, $MgCl_2$, primerler, RNaz inhibitör proteini, qScript ters transkriptaz ve stabilizatörleri içermektedir. qScript, MMLV ters transkriptazın bir RNaz H(+) türevidir ve güvenilir cDNA sentezi için optimize edilmiştir. Üretici firmanın protokolü izlenerek aşağıdaki aşamalar sırasıyla yapıldı;

1. Kullanılacak malzemeler buz üzerine yerleştirilerek oda ısısına gelene kadar çözdürüldü. Ardından içeriği tüpün dibine toplanması için kısaca vorteklenip santrifüjlendi (Şekil 21).
2. Reaktiflerin karışımı buz üzerinde hazırlandı (tablo 1). Karışım, PCR mikro-tüplere dağıtıldı ve her tüpe RNA örneği eklendikten sonra pipetleyerek hafifçe karıştırıldı ve ardından santrifüjlendi.
3. Hazırlanmış karışımlar sırasıyla 25°C'de 5 dakika, 50°C'de 30 dakika, 85°C'de 5 dakika ve son olarak 4°C'de PCR-thermal cycler Labcycler Basic (SensoQuest) cihazında (Şekil 22) inkübe edildi.
4. cDNA sentezi tamamlandıktan sonra, PCR amplifikasyonu için volümün 1/5-1/10'unu (2-4 µL) kullanıldı. Ardından Real-time qPCR protokolü ile devam edildi.

Tablo 1. lncRNA ve mRNA için cDNA Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Bileşenler	**Miktar**
NucleoGene cDNA Synthesis Kit (5X)	4 µl
RNA	Değişken
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Total hacim	**20 µl**

3.4. cDNA Sentezi (miRNA)

İzole edilen total RNA'dan miRNA cDNA'sı elde etmek için microRNA cDNA Synthesis Kit'i (NucleoGene, İstanbul, Türkiye; katalog no: NGMM022) kullanıldı. Bu kit, Poli(A) Polimeraz, dNTP'ler, rekombinant RNaz inhibitör proteini, qScript ters transkriptaz, stabilizatörler, 2x Reaksiyon Karışımı ve microRNA Enzim Karışımı içerir ve miRNA'nın ters transkripsiyonu için hepsi bir arada, kullanıma hazır bir üründür. Kalıp RNA'ya başlangıçta bir poli(A) kuyruğu ekleyip ardından bir adaptör primeri kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirmektedir. Üretici firmanın protokolü izlenerek aşağıdaki aşamalar sırasıyla yapıldı;

1. Kalıp RNA'yı ve tüm reaktifleri buz üzerinde çözdürüldükten sonra, hafifçe vortekslenerek karıştırıldı (Şekil 21). Ardından tüplerdeki sıvıyı toplamak için kısa santrifüj yapıldı.

Şekil 21. Biosan Minicentrifuge-Vortex Combi-Spin cihazı

2. Aşağıdaki reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı (Tablo 2). Bileşenlerin karışması için yavaşça pipetleyerek kısa santrifüj yapıldı.

Tablo 2. miRNA için cDNA Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Bileşenler	**Miktar**
2x Reaksiyon Karışımı	10 µl
mikroRNA Enzim Karışımı	1 µl
RNA	Değişken
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Total hacim	**20 µl**

3. Hazırlanmış karışımlar sırasıyla 37°C'de 30 dakika, 50°C'de 30 dakika, 95°C'de 5 dakika ve son olarak 4°C'de PCR-thermal cycler Labcycler Basic (SensoQuest) cihazında (Şekil 22) inkübe edildi. Ardından Real-time qPCR protokolü ile devam edildi.

Şekil 22. PCR-thermal cycler, SensoQuest Labcycler Basic cihazı

3.5. qPCR Aşaması

1. Sentezlenen cDNA'nın PCR amplifikasyonu için üretici firmanın protokolüne uygun bir şekilde qPCR reaksiyonu aşağıdaki tablo 3'te gösterildiği gibi hazırlandı.

2. Pipetleme ve mikrosantrifüjle reaksiyonların iyice karışması sağlandı.
3. Örnekler Qiagen Rotor-Gene Q qPCR cihazına (Şekil 23) aktarıldı ve 72'lik platform kullanılarak Tablo 4'teki protokole göre çalıştırıldı.

Tablo 3. qPCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Bileşenler	**Miktar**
qPCR Sybr Green Master Karışımı	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
cDNA (2-5 kat seyreltilmiş)	Değişken
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Total hacim	**20 µl**

LINC00958, miR-3619-5p ve *CTNNB1* özgü primerler ve referans genler (lncRNA ve mRNA için *GAPDH*, miRNA için *U6*), NucleoGene firması tarafından GENE EXPRESSION ASSAY (NucleoGene, İstanbul, Türkiye; katalog no: NGOT005) kullanılarak tasarlanmıştır.

Tablo 4. qPCR'ın Döngü Basamakları

Sıcaklık	**Süre**	**Siklus Sayısı**
95°C	15 dakika	1
95°C	15 saniye	40
60°C	30 saniye	
72°C	45 saniye	

Real-time qPCR işlemi sonrasında, her bir örnek için floresan ışıma miktarını gösteren Ct (Döngü Eşiği; Cycle threshold) değeri hesaplandı. Ct değerleri, ileride veri analizi için kullanılmak üzere elektronik olarak kaydedildi.

Şekil 23. Qiagen Rotor-Gene Q Cihazı

3.6. Verilerin Analizi

lncRNA (*LINC00958*), miRNA (*miR-3619-5p*) ve mRNA (*CTNNB1*) ekspresyon seviyelerini qPCR'de ölçmek amacıyla üretici firmanın talimatları doğrultusunda 40 kanserli doku ve 40 eşleşen komşu sağlıklı dokuda olmak üzere toplam 400 reaksiyon gerçekleştirildi. qPCR verilerinin rölatif kantifikasyon yöntemiyle normalizasyonu için *GAPDH* (lncRNA ve mRNA için) ve *U6* (miRNA için) endojen kontrol genleri kullanıldı.

qPCR işlemi sırasında amplifikasyon ilerledikçe SYBR Green boyasının yaydığı floresans, Real-Time qPCR cihazı tarafından kaydedildi ve her örneğin başlangıç konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen Ct değeri cihaz tarafından otomatik olarak kaydedildi. Rotor-Gene Yazılım programında, tümör ve normal doku grubu olarak kabul edilen 40 çift örneğin Ct değerleri ve Ct eğri grafikleri analiz edilip kaydedildi.

Elde edilen veriler kullanılarak, lncRNA, mRNA ve miRNA ekspresyon değişiklikleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) yöntemiyle hesaplandı. Livak metodu, ΔΔCt (Delta Delta Ct) metodu olarak da bilinir, qPCR verilerinin analizinde bir genin iki farklı koşul (sağlıklı ve kanserli doku) arasındaki rölatif ekspresyon farklarını karşılaştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Ct değeri ise, genin ekspresyon seviyesinin bir göstergesidir; düşük Ct değerleri yüksek gen ekspresyonunu, yüksek Ct değerleri ise düşük ekspresyonu gösterir (148). Bu yöntemde, önce ΔCt (ΔCt = hedef genin Ct değeri - kontrol geninin Ct değeri)

formülü kullanılarak hesaplanır. Ardından, ΔΔCt hesaplanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (ΔΔCt = örneğin ΔCt değeri -kontrollerin ortalama ΔCt değeri) formülüyle 2 grup arasındaki kat değişimi (fold change) elde edilir (149).

Çalışma kapsamında veriler tanımlayıcı istatistiklerle özetlendi ve hedef RNA ekspresyon düzeyleri için ortalama değerler hesaplandı. Kanser ve sağlıklı doku grupları arasındaki istatistiksel analizler GraphPad Prism 10 ve SPSS 30 programları kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edildi. Değişkenler arası ilişkilerin değerlendirilmesinde normal dağılım gösteren değişkenlerde Pearson Korelasyon Analizi ve normal dağılım göstermeyen değişkenlerde Spearman's Korelasyon Analizi kullanıldı.

Değişkenlerin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uymayan değişkenler için parametrik olmayan testler için (Spearman korelasyon analizi, Kruskal-Wallis testi) tercih edildi. Ayrıca, kategorik parametreleri için Ki-kare testi ve Fisher's exact testi tercih edildi. Kullanılan cihaz ve ürünler Tablo 5'te özetlendi.

Tablo 5. Kullanılan cihaz ve ürünler

ÜRÜN / CİHAZ ADI	İŞLEVİ
Mikropipet (pipet)	Çeşitli ölçekler için üretilen ve ayarlanabilir bir hacim göstergesi olan ve sıvı maddelerin hassas bir şekilde ölçmek ve aktarmak için kullanılan alettir/araçtır.
Pipet Uçları	Mikropipetlerin ucuna takılan, sıvının taşınmasını sağlayan steril uçlardır. Filtreli ve filtresiz tipleri vardır.
Eppendorf Tüp	Katı ve sıvı numunelerin hazırlanması, karıştırılması, santrifüjlenmesi, taşınması ve depolanması için tek kullanımlık polipropilen tüplerdir.
Spin kolonu (column)	Spin kolonlar, nükleik asitleri tutarak saflaştırılmasına yardımcı olur.
Collection Tüp	Spin kolonların santrifüjlenmesi sırasında filtreden geçen atıkları toplayan steril olmayan tüplerdir.
SensoQuest Labcycler Basic	DNA ve RNA amplifikasyonu için kullanılan PCR cihazıdır (Thermal cycler).
Qiagen Rotor-Gene Q	qPCR cihazıdır. Örneklerin amplifikasyonunu gerçek zamanlı ve floresan sinyaller kullanarak kantitatif olarak ölçebilen PCR cihazıdır. Birçok kullanım alanı vardır. Bu çalışmada gen ekspresyon analizi için kullanılmıştır.
Qiagen TissueLyser LT	Doku örnekleri hızlı ve etkili bir şekilde parçalanmasını ve homojenize edilmesini sağlayan cihazdır.
Biosan Minicentrifuge-Vortex Combi-Spin	Vorteks ve spin (santrifüj) işlemleri için kullanılmıştır.
Nüve NF 048	18.000xg'nin üzerinde çalışan rotora sahip santrifüj cihazıdır.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunun Özellikleri

Çalışmamıza Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalına başvuran KRK tanılı 40 hasta dahil edildi. Hastaların yaş aralığı 35-80 olup yaş ortalaması 65,6 (standart sapma (SS)= 10,9) idi. Hastaların 14'ü (%35) erkek ve 26'sı (%65) kadın, her cinsiyetin yaş ortalaması ise sırasıyla 61,4 (35-75) ve 67,9 (35-80) idi. Sadece 3 hasta 50 yaşın altındaydı (%7,5).

Kanserlerin lokalizasyonu açısından değerlendirildiğinde 20'si (%50) sol/distal kolon, 15'i (%37,5) sağ/proksimal kolon ve 5'si (%12,5) rektumdaydı. Klinik evrelemeye bakıldığında hastaların 7'si (%17,5) evre I, 12'si evre II (%30) ve 12'sı (%30) evre III'tü. Uzak metastazı olan 9 hasta ise evre IV'tü (%22,5).

Tüm hastalar histopatolojik olarak adenokarsinom tipindeydi. Bunlardan 5'i (%12,5) müsinöz adenokarsinom alt tipindeydi.

MSI durumuna bakıldığında örneklerin çoğu MSS (34/40; %85) olarak bulundu. Kalan 6 örnekten ise 3'ü (%7,5) MSI-H (yüksek instabilite), kalan 3'ü ise (%7,5) MSI-L (düşük instabilite) idi.

Değişkenler arasındaki ilişki, Spearman Korelasyon testi, Ki-kare testi, Fisher's Exact testi ve Mann-Whitney U Testi kullanılarak değerlendirilmiştir ancak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Tablo 6'da hastaların demografik ve klinikopatolojik özellikleri özetlenmiştir.

Tablo 6. Çalışmaya dahil edilen hastaların klinikopatolojik özellikleri

No.	Yaş	Cinsiyet	Tümör Yeri	Patolojik Tanı	TN*	Uzak Metastaz	Klinik Evre	MSI
1	64	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T4aN2a	+	4	MSS
2	71	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T4bN0	-	2	MSI-H (*MLH1-PMS2*)
3	42	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N2b	-	3	MSS
4	58	K	Sol Kolon	Müsinöz Adenokarsinom	T3N2b	-	3	MSS
5	79	K	Sol Kolon	Müsinöz Adenokarsinom	T4aN0	+	4	MSS
6	56	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
7	66	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N1c	-	3	MSS
8	61	K	Sol Kolon	Müsinöz Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
9	76	K	Sağ Kolon	Müsinöz Adenokarsinom	T4aN1	-	3	MSS
10	71	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS

Tablo 6. (Devamı)

No.	Yaş	Cinsiyet	Tümör Yeri	Patolojik Tanı	TN*	Uzak Metastaz	Klinik Evre	MSI
11	62	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
12	35	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
14	64	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T4bN2a	+	4	MSS
15	67	E	Rektum	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
16	80	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN1b	+	4	MSS
17	80	K	Rektum	Adenokarsinom	T2N0	-	1	MSS
18	61	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T2N0	-	1	MSI-L (*PMS2*)
19	66	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
20	75	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN1a	-	3	MSS
21	60	K	Rektum	Adenokarsinom	T2N0	-	1	MSS

Tablo 6. (Devamı)

No.	Yaş	Cinsiyet	Tümör Yeri	Patolojik Tanı	TN*	Uzak Metastaz	Klinik Evre	MSI
22	66	E	Rektum	Adenokarsinom	T3N1c	-	3	MSS
23	70	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSI-L (*PMS2*)
24	64	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN0	+	4	MSS
25	67	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
26	80	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T2N0	-	1	MSS
27	80	K	Rektum	Adenokarsinom	T2N1	-	3	MSI-L (*MSH2*)
28	61	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N1	+	4	MSS
29	66	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN1a	-	3	MSI-H (*MLH1-PMS2*)
30	75	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
31	60	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N1b	+	4	MSS

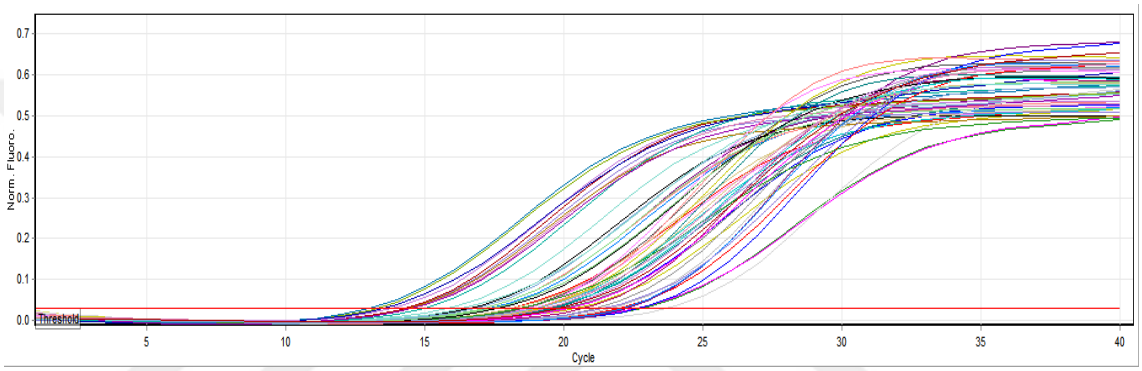
Tablo 6. (Devamı)

No.	Yaş	Cinsiyet	Tümör Yeri	Patolojik Tanı	TN*	Uzak Metastaz	Klinik Evre	MSI
32	66	K	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T2N0	-	1	MSS
33	77	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N1a	-	3	MSS
34	65	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T1N0	-	1	MSS
35	65	K	Sol Kolon	Müsinöz Adenokarsinom	T4aN2b	+	4	MSS
36	74	E	Sağ Kolon	Adenokarsinom	T3N0	-	2	MSS
37	80	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N1b	-	3	MSS
38	35	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4bN0	+	4	MSI-H *(MLH1-PMS2)*
39	64	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T4aN1c	-	3	MSS
40	58	E	Sol Kolon	Adenokarsinom	T3N1a	-	3	MSS
41	58	K	Sol Kolon	Adenokarsinom	T1N0	-	1	MSS

**Patolojik evreleme AJCC'nin 8. versiyonuna göre değerlendirilmiştir.*
E: Erkek, K: Kadın, T:Tümör N: Lenf nodu, MSI: Mikrosatellit İnstabilitesi, MSS: Mikrosatellit Stabil, MSI-H: Yüksek Mikrosatellit İnstabilitesi, MSI-L: Düşük Mikrosatellit İnstabilitesi.

4.2. KRK Tanılı Hastalardan Alınan Doku Örneklerinde *LINC00958, miR-3619-5p* ve *CTNNB1* Ekspresyon Analizi Sonuçları

KRK tanılı hastalardan elde edilen kanser ve eşleşen kontrol (sağlıklı) doku örneklerinin her birinden *LINC00958, miR-3619-5p* ve *CTNNB1*, normalizasyon içinse *GAPDH* ve *U6* genlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. *LINC00958* ve *CTNNB1* için *GAPDH*, *miR-3619-5p* için ise *U6* geni referans gen olarak kullanıldı. Şekil 24'te bir qPCR çalışmasına ait amplifikasyon eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 24. qPCR çalışmasına ait amplifikasyon eğrileri

qPCR çalışmaları sonucunda komşu kontrol ve tümör doku gruplarında çalışılan RNA'ların Ct değerleri sırasıyla Tablo 7 ve 8'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Kontrol (komşu sağlıklı) dokuda qPCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri

Örnek Kodu	*LINC00958* Ct	*miR-3619-5p* Ct	*CTNNB1* Ct	*GAPDH* Ct	*U6* Ct
S1	24.48	20.43	25.55	17.57	25.89
S2	26.69	24.16	26.2	21.47	28.25
S3	21.93	23.73	24.26	22.95	28.59
S4	25.42	22.93	26.09	25.83	27.4
S5	20.17	22.09	20.43	16.79	26.19
S6	25.36	24.8	25.28	23.17	29.5
S7	24.17	25.09	25.99	22.66	29.98
S8	21.97	25.51	23.15	20.07	31.22
S9	21.01	24.87	20.17	18.46	28.35
S10	20.16	21.27	20.53	18.64	26.87

Tablo 7. (Devamı)

S11	**22.28**	**24.5**	**22.92**	**20.92**	**29.47**
S12	21.65	23.51	21.09	19.55	28.73
S14	22.98	24.69	23.47	20.33	28.74
S15	22.15	20.39	22.11	20.77	22.87
S16	23.5	18.59	23.44	18.21	20.98
S17	24.36	-*	24.14	21.88	-*
S18	24.21	18.76	23.73	21.22	20.33
S19	25.88	19.87	26.35	23.3	22.18
S20	26.34	23.17	26.34	23.87	22.91
S21	21.36	16.96	22.49	16.61	18.86
S22	18.83	18.59	19.43	16.87	19.89
S23	23.93	16.35	21.36	22.43	18.8
S24	22.94	-*	21.57	21.04	-*
S25	22.46	14.76	21.27	21.04	19.23
S26	23.49	-*	20.76	21.5	-*
S27	23.81	15.28	24.18	21.85	21.68
S28	25.31	14.11	22.12	22.97	19.51
S29	23.41	17.91	23.1	22.51	24.34
S30	21.44	14.31	21.38	17.48	19.9
S31	23.88	14.12	24.56	22.89	21.36
S32	26.28	13.8	23.13	24.2	20.07
S33	20.68	16.29	20.86	19.58	21.35
S34	25.36	15.31	23.94	23.65	21.04
S35	23.5	15.13	22.87	22.3	21.7
S36	27.43	14.28	23.43	24.25	21.44
S37	22.9	16.52	22.87	20.4	21.03
S38	21.84	15.9	20.81	21.22	21.54
S39	24.35	20.96	21.17	22.8	22.55
S40	23.9	15.71	19.35	21.21	16.98
S41	22.92	16.06	21.64	22.56	18.24

** Çalışmalarda sonuç elde edilememiştir.*

Tablo 8. Kanserli dokuda qPCR çalışmasından elde edilen Ct değerleri

Örnek Kodu	*LINC00958* Ct	*miR-3619-5p* Ct	*CTNNB1* Ct	*GAPDH* Ct	*U6* Ct
T1	24.23	23.53	24.82	17.38	27.48
T2	24.41	21.35	24.06	22.27	27.05
T3	24.29	24.05	25.35	25.19	27.84
T4	22.85	22.52	23.4	25.29	26.25
T5	22.95	23.07	23.18	23.39	26.07
T6	28.02	23.05	21.27	24.72	23.05
T7	20.14	23.95	20.07	23.17	28.03
T8	21.81	23.12	21.27	21.56	26.92
T9	20.85	23.72	20.33	17.98	27.06
T10	20.14	21.53	19.77	23.23	23.29
T11	20.87	22.24	20.76	17.99	26.42
T12	20.73	20.87	20.14	21.71	25.86
T14	20.1	21.8	20.33	17.5	21.8
T15	20.01	22.06	20.61	17.55	22.24
T16	23.47	21.01	23.81	20.06	24.02
T17	25.57	-*	24.51	21.87	-*
T18	25.35	17.63	23.48	22.89	18.74
T19	23.95	17.48	23.49	23.08	19.29
T20	26.62	22.99	26.48	23.69	22.42
T21	23.22	19.41	23.64	19.65	22.28
T22	19.38	17.69	20.08	16.6	19.23
T23	22.17	17.31	21.75	20.35	20.41
T24	22.5	-*	22.79	21.37	-*
T25	23.38	14.59	20.8	22.13	17.7
T26	24.52	-*	23.1	22.95	-*
T27	22.79	13.39	22.82	21.36	19.9
T28	26.42	15.06	23.57	25.74	19.99
T29	25.33	17.33	22.54	23.16	19.08
T30	25.31	13.69	24.38	24.02	20.45
T31	23.91	15.13	24.36	23.03	21.38
T32	24.63	15.98	21.08	23.23	18.28
T33	25.24	16.23	21.21	23.83	18.75
T34	25.84	15.08	22.65	24.55	18.07
T35	24.29	16.22	20.69	23.04	19.74
T36	24.15	15	22.3	22.38	21.38
T37	25.27	19.68	21.03	25.09	22.17
T38	22.28	16.46	21.53	20.67	22.61
T39	24.18	15.73	19.44	22.11	19.38
T40	22.74	16.14	19.86	21.86	18.29
T41	24.27	15.2	21.7	22.73	19.92

** Çalışmalarda sonuç elde edilememiştir.*

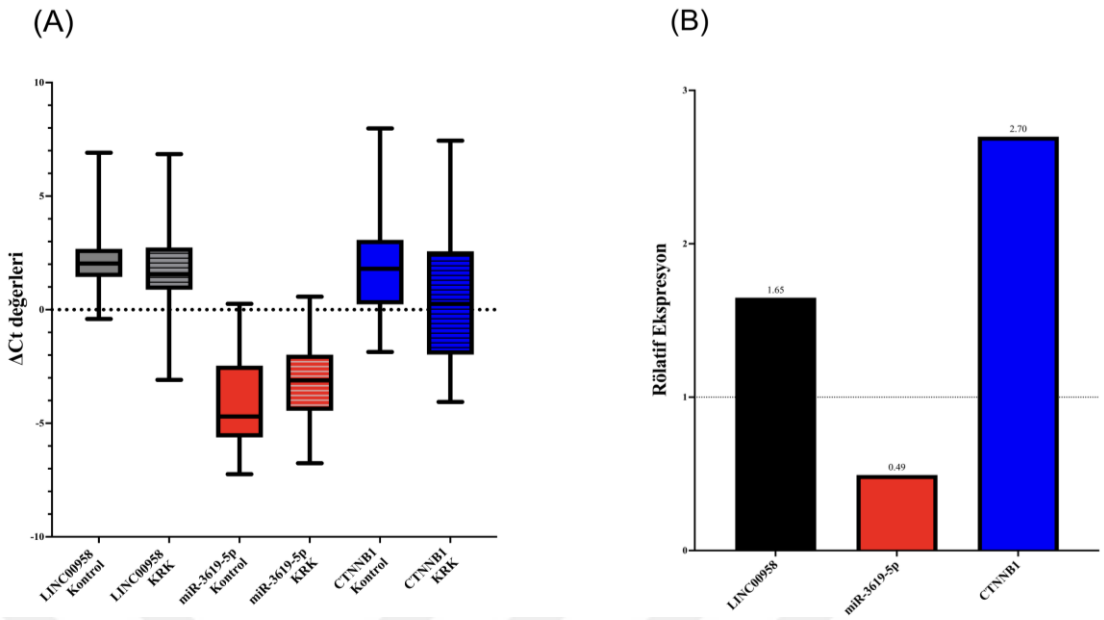
LINC00958, miR-3619-5p ve *CTNNB1*'nin ekspresyonunu değerlendirmek için Livak yöntemi kullanıldı. Kanser ve kontrol doku gruplarının hedef RNA'ların ekspresyon seviyelerinin hesaplamaları ΔCt yöntemi ile yapıldı. Bunu takiben, ΔCt değerleri arasındaki farkı hesaplanarak ΔΔCt değerleri elde edildi. Bu değerlerin logaritması alınarak, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile, kanserli doku ile bitişik kontrol doku ekspresyon düzeyleri arasındaki kat değişimi (fold change) hesaplandı (Tablo 9). Elde edilen ortalama ΔCt ve kat değişimi değerleri Tablo 9'da gösterildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

Tablo 9. Hedef RNA'larda tespit edilen ortalama ΔCt ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

	Ortalama ΔCt		**Ortalama Fold Change** ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			
	Kontrol Dokusu (Min,maks değer)	**Kanserli Doku** (Min,maks değer)	**Kontrol Dokusu** (Min,maks değer)	**Kanserli Doku** (Min,maks değer)	***Rölatif Değişim***†† (Min,maks)	***p* değeri**
LINC00958	2,33 *(-0,41 - 6,91)*	1,61 *(-3,09 - 6,85)*	1,44 *(0,04 - 6,69)*	4,58 *(0,04 - 42,87)*	1,65 *(0,35-24,42)*	***0,0362***
miR-3619-5p*	-4,30* *(-7,24 - 0,26)*	-3,29* *(-6,76 - 0,57)*	1,84* *(0,04 - 7,66)*	1,07* *(0,03 - 5,49)*	0,49* *(0,04 - 5,82)*	***0,0025***
CTNNB1	1,80 *(-1,86 - 7,98)*	0,37 *(-4,06 - 7,44)*	2,46 *(0,01 - 12,66)*	9,09 *(0,02 - 58,16)*	2,70 *(0,18-92,41)*	***0,0006***

†† *Rölatif Değişim (fold change) hesaplarken geometrik ortalama kullanılmıştır.*
* *miR-3619-5p*'nin hesaplamalarına 37 *hasta dahil edilmiştir.*

Sağlıklı ve tümör dokularında hedef genlerin kat değişim değerleri karşılaştırıldı. Kat değişim değerlerinin normal dağılıma uymadığı Shapiro-Wilk testi ($p < 0,05$) ile tespit edildi. Bu nedenle, iki grup arasındaki farklar, Student-t testi yerine non-parametrik yöntem olan Wilcoxon testi kullanılarak analiz edildi. Rölatif kat değişimleri geometrik ortalama baz alınarak hesaplandı. Gen ekspresyon çalışmalarında, özellikle qPCR verilerinin üslü doğası ve ekspresyon değişimlerinin oransal ölçümler olması nedeniyle, aykırı değerlerden daha az etkilenen ve verilerin log-normal dağılımını daha iyi yansıtan geometrik ortalama kullanılmıştır. Her üç hedef genin ekspresyon farklılıkları (kat değişimi) istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$).



Şekil 25. KRK ve kontrol doku gruplarında LINC00958, miR-3619-5p ve CTNNB1'in ekspresyonunun karşılaştırılması. (A) İki grup arasındaki ΔCt değerleri, (B) Genlerin rölatif kat değişimi geometrik ortalamaya göre gösterilmiştir.

4.2.1. *LINC00958*'in KRK Dokularındaki Ekspresyonu

LINC00958 düzeyleri 40 eşleştirilmiş örnek çiftinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemiyle karşılaştırıldı. KRK dokularındaki *LINC00958*'in ekspresyonunda, eşleştirilmiş normal dokulara kıyasla **1,65** kat artış görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (n=40, ***p=0,0362***) (Tablo 9, Şekil 25). *LINC00958*'in ekspresyonu hastaların 27'sinde (%67,5) yüksek, 13'ünde (%32,5) ise düşüktü. *LINC00958*'in ekspresyon düzeyleri ile hastaların demografik ve klinik özellikleri arasındaki ilişki incelendi. *LINC00958*'in ekspresyon seviyeleri hastaların yaş, cinsiyet, tümör yeri, patolojik tanı, klinik evre, T-evresi, LN metastaz varlığı, uzak metastaz varlığı ve MSI durumuna göre analiz edildi (*Tablo 10)*. Değişkenler arasında istatistiksel anlamlılık sınırı *p <0,05* olarak kabul edildi.

Hastaların yaşları ortanca değere (66) göre iki gruba ayrıldı. *LINC00958*'in ekspresyon düzeyleri ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir frak bulunmadı (*p=0,577*). Her iki yaş grubunda da yüksek *LINC00958* ekspresyonu daha yaygındı.

Cinsiyet açısından bakıldığında, kadınlarda *LINC00958*'in yüksek ekspresyonu belirgin şekilde daha yaygındı (5 düşük, 21 yüksek), erkeklerde ise düşük ve yüksek

ekspresyonlar arasında büyük bir fark bulunmamakla birlikte düşük ekspresyon seviyesi daha fazlaydı (8 düşük, 6 yüksek). Cinsiyet ile *LINC00958* ekspresyonu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (***p=0,031***).

Tümör lokalizasyonu, kolon ve rektum olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tümör lokalizasyonu ile *LINC00958* düzeyleri değerlendirildiğinde, kolon tümörlerinde *LINC00958*'in yüksek ekspresyonu belirgin şekilde daha yaygın bulundu. Buna karşılık, rektum tümörlerinde düşük *LINC00958* ekspresyonu daha fazla gözlemlendi. Tümör yeri ile *LINC00958* ekspresyonu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (***p=0,031***).

Tüm KRK örnekleri histopatolojik olarak adenokarsinom tipindeydi. Ancak hastaların beşi müsinöz adenokarsinom alt tipindeydi. Patolojik tanı açısından anlamlı bir farklılık olup olmadığını test etmek için, örnekler müsinöz adenokarsinom ve adenokarsinom olarak iki gruba ayrıldı. *LINC00958*'in ekspresyonu her iki grupta da belirgin bir şekilde daha yüksek bulundu. Yapılan analizlerde her iki patolojik tanı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (*p=1*).

TNM evresi açısından bakıldığında hastalar şu şekilde sınıflandırıldı; T-evresi olarak düşük (T1-2) ve yüksek (T3-4), N; LN Metastazı varlığı veya yokluğu, M ise uzak metastaz varlığı veya yokluğu. T-evresine bakıldığında, hem düşük (T1-2) hem de yüksek evre (T3-4) tümörlerde yüksek *LINC00958* ekspresyonu daha yaygındı. Ancak, T evresi ile *LINC00958* ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (*p=1*). LN metastazı ve uzak metastaz açısından benzer sonuçlar elde edildi (sırasıyla *p=0,435, p=1*).

Klinik evre, erken (I-II) ve ileri (III-IV) evre olarak iki gruba ayrıldı. Hem erken hem ileri evrede *LINC00958*'in yüksek ekspresyonu daha yaygındı, ancak iki grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (*p=0,906*).

MSI durumuna göre hastalar MSS ve MSI olarak iki gruba ayrıldı. MSI durumu ile *LINC00958*'in ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (*p=0.643*).

Tablo 10. *LINC00958*'in Ekspresyonu ile Hastaların Klinikopatolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması

			LINC00958		
Değişkenler		**n=40**	**Düşük**	**Yüksek**	***p*-değeri**
Yaş	<66	19	7	12	*0,577*
	≥66	21	6	15	
Cinsiyet	Erkek	14	8	6	***0,031****
	Kadın	26	5	21	
Tümör Yeri	Kolon (sol+sağ)	35	9	26	***0,031****
	Rektum	5	4	1	
Patolojik Tanı	Adenokarsinom	35	12	23	*1*
	Müsinöz Adenokarsinom	5	1	4	
Klinik Evre	Erken (I-II)	19	6	13	*0,906*
	İleri (III-IV)	21	7	14	
T-Evresi	T1-2	8	3	5	*1*
	T3-4	32	10	22	
LN Metastazı	Var	18	7	11	*0,435*
	Yok	22	6	16	
Uzak Metastaz	Var	9	3	6	*1*
	Yok	31	10	21	
MSI durumu	MSS	34	12	22	*0,643*
	MSI (L/H)	6	1	5	

Not: istatistiksel anlamlılık değeri p<0,05. LN: Lenf nodu, MSI: Mikrosatellit İnstabilitesi, MSS: Mikrosatellit Stabil, MSI-H: Yüksek Mikrosatellit İnstabilitesi, MSI-L: Düşük Mikrosatellit İnstabilitesi.

4.2.2. *miR-3619-5p*'nin KRK Dokularındaki Ekspresyonu

Çalışmaya dahil edilen 40 hastadan 3'ünde qPCR analizinde sonuç elde edilemediğinden sadece 37 hasta değerlendirilmeye alındı. *miR-3619-5p* düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemiyle karşılaştırıldı. KRK dokularındaki *miR-3619-5p*'nin ekspresyonunda, eşleştirilmiş normal dokulara kıyasla **0,49** kat azalma görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (n=37, ***p=0,0025***) (Tablo 9, Şekil 25). *miR-3619-5p*'nin ekspresyonu hastaların 28'inde (%75,7) düşük, 9'unde (%24,3) ise yüksek gözlemlendi. *miR-3619-5p*'nin ekspresyon düzeyleri ile hastaların demografik ve klinik özellikleri arasındaki ilişkisi incelendi. *miR-3619-5p*'nin ekspresyon seviyeleri hastaların yaş, cinsiyet, tümör yeri, patolojik tanı, klinik evre, T-evresi, LN metastaz varlığı, uzak metastaz varlığı ve MSI durumuna göre analiz edildi (*Tablo 11)*. Değişkenler arasında istatistiksel anlamlılık sınırı *p <0,05* olarak kabul edildi.

Hastaların yaşları ortanca değere (66) göre iki gruba ayrıldı. *miR-3619-5p*'nin ekspresyon düzeyleri ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (*p=0,714*). Her iki yaş grubunda da düşük *miR-3619-5p*'nin ekspresyonu daha yaygın olarak tespit edildi.

Her iki cinsiyette de düşük *miR-3619-5p* ekspresyonunun daha yaygın olduğu saptanmasına rağmen cinsiyet ile *miR-3619-5p* ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi (*p=0,705*).

Tümör lokalizasyonu, kolon ve rektum olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tümör yeri ile *miR-3619-5p* ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (*p=1*). Ancak hem kolon hem de rektum bölgelerinde düşük ekspresyonun baskın olduğunu gözlemlendi.

Tüm KRK örnekleri histopatolojik olarak adenokarsinom tipindeydi. Ancak hastaların beşinde müsinöz adenokarsinom alt tipindeydi. Patolojik tanı açısından anlamlı bir farklılık olup olmadığını test etmek için örnekleri müsinöz adenokarsinom ve adenokarsinom olarak iki gruba ayrıldı. Patolojik tanıya göre *miR-3619-5p* ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (*p=0,307*). Müsinöz adenokarsinomlarda yüksek *miR-3619-5p* ekspresyonu hiç gözlemlenmeyip örneklerin tamamında düşük ekspresyon saptandı.

TNM evresi açısından bakıldığında hastalar şu şekilde sınıflandırıldı; T-evresi olarak düşük (T1-2) ve yüksek (T3-4), N; LN Metastazı varlığı veya yokluğu, M ise uzak metastaz varlığı veya yokluğu. T-evresine bakıldığında, hem düşük (T1-2) hem de yüksek evre (T3-4) tümörlerde düşük *miR-3619-5p* ekspresyonu daha baskın olsa da T evresi ile *miR-3619-5p* ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (*p=0,620*). LN metastazı ve uzak metastaz açısından benzer sonuçlar elde edildi (sırasıyla *p=0,447, p=0,373*).

Klinik evre, erken (I-II) ve ileri (III-IV) evre olarak iki gruba ayrıldı. Hem erken hem ileri evrede *miR-3619-5p*'nin düşük ekspresyonu daha yaygındı, ancak klinik evre ile *miR-3619-5p* ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi (*p=0,703*).

MSI durumuna göre hastalar MSS ve MSI olarak iki gruba ayrıldı. MSS grubunda düşük ekspresyonun daha baskın olmasına karşın MSI grubunda düşük ve yüksek ekspresyon eşit sayıda bireyde görüldü. Ancak, MSI durumu ile *miR-3619-5p*'nin ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (*p=0,140*).

Tablo 11. *miR-3619-5p*'nin Ekspresyonu ile Hastaların Klinikopatolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması

			miR-3619-5p		
Değişkenler		**n=37**	**Düşük**	**Yüksek**	***p*-değeri**
Yaş	<66	18	13	5	*0,714*
	≥66	19	15	4	
Cinsiyet	Erkek	14	10	4	*0,705*
	Kadın	23	18	5	
Tümör Yeri	Kolon (sol+sağ)	33	25	8	*1*
	Rektum	4	3	1	
Patolojik Tanı	Adenokarsinom	32	23	9	*0,307*
	Müsinöz Adenokarsinom	5	5	0	
Klinik Evre	Erken (I-II)	17	12	5	*0,703*
	İleri (III-IV)	20	16	4	
T-Evresi	T1-2	6	4	2	*0,620*
	T3-4	31	24	7	
LN Metastazı	Var	18	15	3	*0,447*
	Yok	19	13	6	
Uzak Metastaz	Var	8	5	3	*0,373*
	Yok	29	23	6	
MSI durumu	MSS	31	25	6	*0,140*
	MSI (L/H)	6	3	3	

Not: istatistiksel anlamlılık değeri p<0,05. LN: Lenf nodu, MSI: Mikrosatellit İnstabilitesi, MSS: Mikrosatellit Stabil, MSI-H: Yüksek Mikrosatellit İnstabilitesi, MSI-L: Düşük Mikrosatellit İnstabilitesi.

4.2.3. CTNNB1'in KRK Dokularındaki Ekspresyonu

CTNNB1 düzeyleri 40 eşleştirilmiş örnek çiftinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemiyle karşılaştırıldı. KRK dokularındaki *CTNNB1*'in ekspresyonunda, eşleştirilmiş normal dokulara kıyasla **2,70** kat artış görüldü. Bu fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu (n=40, ***p=0,0006***) (Tablo 9, Şekil 25). *CTNNB1*'in ekspresyonu hastaların 29'unde (%72,5)

yüksek 11'inde (%27,5) ise düşük saptandı. *CTNNB1*'in ekspresyon düzeyleri ile hastaların demografik ve klinik özellikleri arasındaki ilişkisi incelendi. *CTNNB1*'in ekspresyon seviyeleri hastaların yaş, cinsiyet, tümör yeri, patolojik tanı, klinik evre, T-evresi, LN metastaz varlığı, uzak metastaz varlığı ve MSI durumuna göre analiz edildi (Tablo 12). Değişkenler arasında istatistiksel anlamlılık sınırı p <0,05 olarak kabul edildi.

Hastaların yaşları ortanca değere (66) göre iki gruba ayrıldı. Her iki yaş grubunda yüksek *CTNNB1*'in ekspresyonu daha yaygındı. Ancak, *CTNNB1*'in ekspresyon düzeyleri ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir frak bulunmadı (*p=0,873*).

Cinsiyet açısından bakıldığında, kadınlarda *CTNNB1*'in yüksek ekspresyonu belirgin şekilde yaygın görünmekle birlikte erkeklerde düşük ve yüksek ekspresyon oranları eşit olarak saptandı. Cinsiyet ile *CTNNB1*'in ekspresyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu (***p=0,029***).

Tümör lokalizasyonu, kolon ve rektum olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tümör lokalizasyonu ile *CTNNB1*'in düzeyleri karşılaştırıldığında, kolon tümörlerinde *CTNNB1*'in yüksek ekspresyonu belirgin şekilde daha yaygın iken rektum tümörlerinde düşük *CTNNB1*'in ekspresyonu daha yaygın görüldü. Tümör lokalizasyonu ile *CTNNB1*'in ekspresyonu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (***p=0,015***).

Tüm KRK örnekleri histopatolojik olarak adenokarsinom tipindeydi. Ancak hastaların beşinde müsinöz adenokarsinom alt tipindeydi. Patolojik tanı açısından anlamlı bir farklılık olup olmadığını test etmek için örnekleri müsinöz adenokarsinom ve adenokarsinom olarak iki gruba ayrıldı. *CTNNB1*'in ekspresyonu her iki grupta da belirgin bir şekilde daha yüksekti. Ancak yapılan analizlerde her iki patolojik tanı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (*p=1*).

TNM evresi açısından bakıldığında hastalar şu şekilde sınıflandırıldı; T-evresi olarak düşük (T1-2) ve yüksek (T3-4), N; LN Metastazı varlığı veya yokluğu, M ise uzak metastaz varlığı veya yokluğu. T-evresine bakıldığında, hem düşük (T1-2) hem de yüksek evre (T3-4) tümörlerde yüksek *CTNNB1*'in ekspresyonu daha yaygındı. Ancak, T evresi

ile *CTNNB1*'in ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (*p=1*). LN metastazı ve uzak metastaz açısından benzer sonuçlar elde edildi (sırasıyla *p=0,173, p= 0,686*).

Klinik evre, erken (I-II) ve ileri (III-IV) evre olarak iki gruba ayrıldı. Hem erken hem ileri evrede *CTNNB1*'in yüksek ekspresyonu daha yaygındı, ancak iki grup arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (*p=0,385*).

MSI durumuna göre hastalar MSS ve MSI olarak iki gruba ayrıldı. Hem MSS hem de MSI grubunda *CTNNB1*'in yüksek ekspresyonu yaygın olarak görülmekle birlikte MSI grubunda sadece yüksek ekspresyon görüldü. Ancak, MSI durumu ile *CTNNB1*'in ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (*p=0,162*).

Tablo 12. *CTNNB1*'in Ekspresyonu ile Hastaların Klinikopatolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması

			CTNNB1		
Değişkenler		**n=40**	**Düşük**	**Yüksek**	***p*-değeri**
Yaş	<66	19	5	14	*0,873*
	≥66	21	6	15	
Cinsiyet	Erkek	14	7	7	***0,029****
	Kadın	26	4	22	
Tümör Yeri	Kolon (sol+sağ)	35	7	28	***0,015****
	Rektum	5	4	1	
Patolojik Tanı	Adenokarsinom	35	10	25	*1*
	Müsinöz Adenokarsinom	5	1	4	
Klinik Evre	Erken (I-II)	19	4	15	*0,385*
	İleri (III-IV)	21	7	14	
T-Evresi	T1-2	8	2	6	*1*
	T3-4	32	9	23	
LN Metastazı	Var	18	7	11	*0,173*
	Yok	22	4	18	
Uzak Metastaz	Var	9	3	6	*0,686*
	Yok	31	8	23	
MSI durumu	MSS	34	11	23	*0,162*
	MSI (L/H)	6	0	6	

Not: istatistiksel anlamlılık değeri p<0,05. LN: Lenf nodu, MSI: Mikrosatellit İnstabilitesi, MSS: Mikrosatellit Stabil, MSI-H: Yüksek Mikrosatellit İnstabilitesi, MSI-L: Düşük Mikrosatellit İnstabilitesi.

4.3. *LINC00958*/*miR-3619-5p*/*CTNNB1* Yolağının Korelasyon Analizi

Bu çalışmada, KRK'deki *LINC00958*, *miR-3619-5p* ve *CTNNB1* genlerinin ekspresyonu arasındaki olası etkileşimlerin anlaşılmasına yönelik korelasyon analizi gerçekleştirildi. Korelasyon analizinin sonucunda, *LINC00958* ile *CTNNB1* arasındaki güçlü bir pozitif korelasyon saptandı. Bu korelasyon istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu (***p=0,00005***). *LINC00958* ile *miR-3619-5p* arasında zayıf bir korelasyon bulundu. Ancak bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı değildi (*p>0,05*). *miR-3619-5p* ile *CTNNB1* arasında ise orta düzeyde negatif bir ilişki bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi (*p=0,05618*).

Tablo 13. *LINC00958*/*miR-3619-5p*/*CTNNB1* Yolağının Korelasyon Analizinin Sonuçları

	Korelasyon Katsayısı (r)	***p-değeri***
LINC00958* ve *miR-3619-5p	0,059	*0,729*
LINC00958* ve *CTNNB1	0,597	***0,00005***
miR-3619-5p* ve *CTNNB1	-0,317	*0,05618*

5. TARTIŞMA

KRK, dünya çapında hem erkekler hem de kadınlar arasında en sık görülen malignitelerden biridir. Çeşitli tedavi seçeneklerinde hızlı ilerlemeler kaydedilmiş olsa da KRK'den kaynaklanan ölüm oranı hala oldukça yüksektir. KRK'nin prognozu, yüksek lokal ve sistemik nüks oranları nedeniyle kötü olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, yeni prognostik ve terapötik stratejiler geliştirmek için KRK başlangıcı ve ilerlemesinde rol oynayan potansiyel moleküllerin daha fazla araştırılması gerekmektedir. lncRNA'lar ve miRNA'lar dahil olmak üzere çeşitli ncRNA'ların kanser biyogenezi üzerinde önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir (8). Özellikle, lncRNA'ların ve miRNA'ların oluşturduğu düzenleyici ağlar, pek çok kanser türünde araştırılmıştır. lncRNA'lar, miRNA'lar ile yarışarak mRNA'lar üzerinde etkili bir ceRNA görevi görebilir. Bu karmaşık etkileşimlerin daha iyi anlaşılması, kanser tedavileri için yeni yaklaşımlar geliştirilmesinin önünü açmıştır. Ortaya çıkan son kanıtlar, *LINC00958* ve *miR-3619-5p* gibi ncRNA'ların kanser gelişiminde rol oynayan çeşitli sinyal yolaklarıyla etkileşime girebileceğini ve potansiyel terapötik hedefler hakkında yeni bilgiler sunabileceğini göstermektedir (33). Bu etkileşimlerin anlaşılması, hedefe yönelik tedavilerin etkinliğini artırabilir ve prognoz hakkında bilgi verebilir.

lncRNA'lar protein kodlamamasına rağmen transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen regülasyonunda önemli roller oynamaktadır (102,105). Kanser biyolojisindeki rolleri, lncRNA'ya bağlı olarak tümör baskılama veya onkojenezi içermektedir. Farklı dokularda ve farklı koşullar altında lncRNA'ların özgün ekspresyon paternleri, potansiyel biyobelirteçler olarak hizmet edebileceklerini ve klinik hedefleme için bir temel sunabileceklerini göstermektedir (12,102).

Son yıllarda giderek artan bir ilgi gören *LINC00958*, KRK dahil olmak üzere HCC, akciğer, baş ve boyun, mide, mesane ve meme kanserleri gibi çeşitli malignitelerde değişken düzeylerde ifade edildiği ve tümör büyümesini, invazyonu, metastazı ve apoptoza karşı direnci arttırarak onkojenik özellikler sergilediği öne sürülmüştür (8,9). *LINC00958* diğer lncRNA'larda olduğu gibi, ceRNA ağlarının bir üyesi olarak çeşitli miRNA'ları süngerleyerek miRNA'nın hedef mRNA'larına bağlanmasını bozabilir ve böylece hücre proliferasyonu, apoptoz, metastaz ve diğer biyolojik olaylar üzerinde

belirgin etkiler gösterebilir. Örneğin, mesane kanserinde *LINC00958/miR-490-3p/AURKA* (150) ve *LINC00958/miR-378a-3p/IGF1R* (151); akciğer kanserinde *LINC00958/miR-204-3p/KIF2A* (152) ve *LINC00958/miR-625-5p/CPSF7* (153); baş ve boyun kanserlerinde *LINC00958/miR-627-5p/YBX2* (154) ve *LINC00958/miR-211-5p/CENPK* (155).

LINC00958'in keşfi ve kanserdeki ilk araştırmaları, mesane kanseri üzerine yapılan çalışmalarla başlamıştır. İlk olarak Seitz ve arkadaşları tarafından mesane kanseri hücre hatlarında ve dokularında RNA-sekanslama (RNA-sequencing) yöntemini kullanılarak *LINC00958*'in normal dokulara kıyasla anlamlı derecede yüksek ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir (156). Ayrıca hücre kültürü çalışmalarında *LINC00958*'in susturulmasının hücre canlılığını azalttığını, hücre göçü ve invazyonu engellediğini gösterilmiştir. Bu bulgular, *LINC00958*'in mesane kanserinde metastazı destekleyen bir onkojenik lncRNA olduğunu işaret etmiştir.

Altieri ve arkadaşlarının çocukluk çağı B hücreli akut lenfoblastik lösemi (B-ALL) hastalarında yaptıkları bir çalışmada, *LINC00958* ekspresyon düzeyinin T hücreli ALL (T-ALL) ve sağlıklı bireylerle kıyaslandığında, anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, *LINC00958*'in şaşırtıcı bir şekilde standart risk sahibi B-ALL hastalarında yüksek risk grubuna göre daha fazla ifade edildiği ve relaps gösteren standart riski olan hastalarda ekspresyon düzeylerinin daha da arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, B-ALL hücre kültürü fonksiyonel analizlerinde, *LINC00958*'in susturulmasının B-ALL hücre hatlarında proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir. Bu durum, *LINC00958*'in sadece bir biyobelirteç olarak değil, aynı zamanda kanser progresyonunda rol oynayan bir düzenleyici olarak da işlev görebileceğini düşündürmektedir (157).

LINC00958'in yüksek düzeyde ifade edilmesi oral skuamöz hücreli karsinomda (OSCC) kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Wang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *LINC00958*'in OSCC dokularında ve hücre hatlarında yüksek düzeyde ifade edildiği ve bu durum kötü prognoz ile ilişki olduğu bulunmuştur (158). Fonksiyonel analizlerde de *LINC00958*'in OSCC hücre proliferasyonunu ve invazyonunu artırırken apoptozu azalttığı ortaya konulmuştur. İlaveten, in vivo fare modellerinde *LINC00958*'in susturulmasının tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir. Benzer sonuçlar Li ve

arkadaşları tarafından da elde edilmiştir (159). Bu çalışmalarda *LINC00958*, çeşitli miRNA'larla etkileşime girerek ceRNA olarak işlev gördüğü kanıtlanmıştır.

Öte yandan kanser vakalarının büyük bir kısmını oluşturan akciğer kanserinde de *LINC00958* ekspresyonu araştırılmıştır. Örneğin, Wang ve arkadaşları çalışmasında *LINC00958*'in KHDAK'deki etkileri araştırılmış, kanser dokularında ve hücre hatlarında belirgin şekilde yüksek düzeyde eksprese edildiği bulunmuş ve bu durum hastalığın progresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, *LINC00958*'in susturulmasının KHDAK hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu in vitro olarak azalttığı ve in vivo tümör büyümesini baskıladığı gözlemlenmiştir (152). Aynı çalışmada *LINC00958*'in *miR-204-3p* ve *KIF2A* genleri ile ilişkisi araştırılmış, *LINC00958*'in *miR-204-3p*'yi baskılayarak *KIF2A* ekspresyonunu düzenlediği ve böylece kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu artırdığı gösterilmiştir. *LINC00958*'in susturulmasının, *miR-204-3p* seviyesini artırarak *KIF2A* ekspresyonunu baskıladığını ve böylece tümör büyümesini hem in vitro hem de in vivo modellerde önemli ölçüde azalttığı kanıtlanmıştır.

LINC00958'in rolü mide kanserinde de araştırılmıştır. Literatürde, *LINC00958*'in yüksek ekspresyonunun, tümör progresyonu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yang ve arkadaşlarının çalışmasında, *KIAA1429* tarafından m^6A modifikasyonu ile stabilize edilen *LINC00958*'in *GLUT1* mRNA stabilitesini artırarak glikoz alımını ve laktat üretimini arttırdığı ve böylece tümör proliferasyonuna katkıda bulunduğu saptanmıştır (160). Başka bir çalışmada ise *LINC00958*'in lenf nodu tutulumu, metastaz ve kötü genel sağkalım ile ilişkili olduğu, bağımsız bir prognostik faktör olarak işlev görebileceği bildirilmiştir (161). Bu bulgular, *LINC00958*'in mide kanseri biyolojisinin anlaşılmasında ve potansiyel bir terapötik hedef olarak değerlendirilmesinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir.

Zuo ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışmada, *LINC00958*'in HCC'de yüksek düzeyde ifade edildiği ve *miR-3619-5p*'yi hedefleyerek *HDGF* ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (162). Ayrıca, *LINC00958*'in artmış ekspresyonu kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir. İlaveten, bu çalışmada *LINC00958*'i susturan siRNA yüklü PLGA-PEG nanopartiküllerin geliştirilmesiyle *LINC00958*'in potansiyel bir terapötik hedef olabileceği gösterilmiştir. Bu nanopartiküller, *LINC00958* ekspresyonunu baskılayarak

tümör büyümesini, proliferasyonu ve invazyonu anlamlı derecede azaltmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak *LINC00958*'in HCC için prognostik bir belirteç olabileceği ve terapötik hedef olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

Çeşitli jinekolojik kanserlerde de *LINC00958*'in rolü araştırılmıştır. Rong ve arkadaşlarının çalışmalarında *LINC00958*'in ekspresyonunun meme kanserinde belirgin şekilde artış gösterdiği, *miR-378a-3p* için bir "moleküler sünger" olarak işlev gördüğü ve bu mikroRNA'nın baskılanması yoluyla *YY1* ekspresyonunu up-regüle ettiği gösterilmiştir (163). Bu bağlamda, *LINC00958/miR-378a-3p/YY1* aksı, meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozu baskılayan kritik bir yolak olarak düşünülmüştür. Xie ve arkadaşları *LINC00958*'yi over kanserinde incelemişlerdir (138). Çalışmalarında *LINC00958*'in *STAT1* transkripsiyon faktörü tarafından regüle edildiğini ve Wnt/β-Catenin sinyal yolaklarını aktive ederek tümör gelişimini hızlandırdığını bildirmişlerdir. *LINC00958*'in ekspresyonu over kanseri dokuları ve hücre hatlarında artış gösterdiğini, susturulduğunda ise, β-catenin, Cyclin D1 ve c-Myc gibi bu yolakta rol oynayan proteinlerin seviyelerini azalttığını tespit etmişlerdir. Böylece, tümör progresyonunda rol oynayan Wnt/β-Catenin sinyal yolunun baskılandığı gösterilmiştir. Sonuç olarak *LINC00958*'nin aşırı ekspresyonu, over kanserinin progresyonunu hızlandırdığı, bu durumun Wnt/β-Catenin sinyal yolunun modülasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Jiang ve arkadaşları, endometriyal kanserde *LINC00958/miR-145-3p/TCF4* eksenini araştırmış, *LINC00958*'in kanser ilerlemesi ve hastaların olumsuz genel sağkalımıyla bağlantılı bir onkojenik lncRNA olduğunu bildirmişlerdir (164). Bu çalışmada, *LINC00958*'in kanser dokularında ve hücre hatlarında aşırı eksprese edildiği ve yüksek ekspresyonunun daha kötü genel sağkalım, ileri evre ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Moleküler düzeyde, *LINC00958*'in *miR-145-3p*'yi bağlayarak baskıladığı ve bu baskılamanın hedef geni olan *TCF4*'ün up-regülasyonuna yol açtığı saptanmıştır.

Tian ve arkadaşları *LINC00958/miR-185-5p/RSF-1* ekseni serviks kanserinde araştırmışlardır (165). *LINC00958* ekspresyonunun sisplatin dirençli hücrelerde daha yüksek olduğu ve *LINC00958*'in susturulması sisplatin duyarlılığını artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, *LINC00958*'in *miR-185-5p*'yi bağlayarak *RSF-1* ekspresyonunu

artırdığını, bunun da *AKT1/GSK3β/VEGFA* yolağını aktive ederek sisplatin direncini ve tümör anjiyogenezini desteklediği gösterilmiştir. Wang ve arkadaşlarının çalışmasında da serviks kanserinde *LINC00958*'in, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve metastatik kapasitesini artırdığı ortaya konulmuştur (166). *LINC00958*'in bu etkisini *miR-625-5p*'yi sünger gibi bağlayarak *LRRC8E'nin* up-regülasyonu yoluyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir (166).

LINC00958'in KRK'deki rolü hakkında ise literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Güncel literatürde *LINC00958*'in KRK'deki ilişkisi beş çalışmada değerlendirilmiştir. Bu çalışmalardan birinde, Ren ve arkadaşları, *BLACAT2 (LINC00958)* seviyelerini KRK hastalarından alınan doku örneklerinde değerlendirmişler ve bu lncRNA'nın yüksek ekspresyonunun kanserin ileri evre, metastaz, proliferasyon ve ilaç direncine katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (167).

Zhou ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *LINC00958/miR-145-3p/CDK1* yolağı araştırılmıştır (168). KRK'de up-regüle olan *LINC00958* doğrudan *miR-145-3p'*yi baskılayarak kanserin progresyonunda katkıda bulunduğu saptanmıştır. Bu etkiyi *CDK1*'in ekspresyonunu up-regüle ederek gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise *LINC00958*'in *miR-422a* ile etkileşimi araştırılmıştır (98).

Liang ve arkadaşları 63 KRK hasta örneğiyle yaptıkları bu çalışmada, *LINC00958'in* KRK'de aşırı ekspresyonu, *MAPK1* geninin ekspresyonunu artırdığını, bu durumun hücre proliferasyonunu tetiklediğini, apoptozu ve radyoterapiye direnç sağladığını kanıtlamışlardır. Bu etki, *LINC00958*'in *miR-422a*'yı hedefleyerek baskılamasıyla gerçekleştiği bildirmişlerdir. Ayrıca, yüksek *LINC00958* seviyelerinin ileri evre ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, *LINC00958*'in KRK'nin prognozu ve tedavisinde bir biyobelirteç veya hedef molekül olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Luo ve arkadaşlarının çalışmasında, *LINC00958*/*miR-3064-5p*/*LEMD1* yolağı KRK'de araştırılmıştır (137). *LINC00958*'in KRK hücrelerinde *miR-3064-5p*'yi süngerleyerek *LEMD1*'in ekspresyonunu artırdığı, böylece PI3K/AKT sinyal yolağını

aktive ederek hücre büyümesini, migrasyonu ve invazyonunda katkıda bulunduğu gösterilmiştir.

Sun ve arkadaşlarının çalışmasında ise *LINC00958*'nın KRK hücre hatlarındaki rolü ve *miR-3619-5p* ile ilişkisi incelenmiştir (9). *LINC00958*'in KRK hücre hatlarında artmış ekspresyonunun *miR-3619-5p*'yi baskılayarak hücre proliferasyonu, invazyonu ve göçünü artırdığı saptanmıştır. *LINC00958*'in susturulmasının, hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu azaltırken, apoptoz oranını arttırdığı tespit edilmiştir. Moleküler düzeyde, *LINC00958*'in *miR-3619-5p*'yi hedef aldığı Lusiferaz testi (Luciferase reporter assay) ile doğrulanmıştır. Ancak bu çalışmada sadece hücre hatları kullanılmış ve hasta dokusu incelenmemiştir.

Sonuç olarak, *LINC00958* KRK dahil çeşitli kanser türlerinde önemli bir onkojenik ncRNA olarak rol oynamaktadır (8,136). Kanser hücrelerinde artmış *LINC00958* ekspresyonu, hücre proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonunu artırırken, apoptozu baskıladığı daha önce bahsedilen çalışmalarda kanıtlanmıştır. Ayrıca, *LINC00958*'in çeşitli miRNA'ları "süngerleyerek" hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyen ceRNA olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. Böylece, çeşitli sinyal yolaklarını (PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT3, Wnt/β-catenin gibi) aktive ederek tümör progresyonunu hızlandırmaktadır (8). Klinik olarak, *LINC00958*'in yüksek düzeyde eksprese edilmesi, kötü prognoz, yüksek TNM evresi ve erken LN metastazı ile ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular, *LINC00958*'in potansiyel ve hedeflenebilir bir biyobelirteç olduğunu olarak önemini vurgulamaktadır (8,136).

Bizim çalışmamızda yapılan analizler sonucunda KRK dokularındaki *LINC00958*'in ifadesi kontrol bitişik sağlıklı dokuya kıyasla anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğunu tespit ettik ($p<0,05$). Bu durum *LINC00958*'in KRK'de up-regüle olduğunu ve onkojenik bir rol oynadığını düşündürmektedir. Bu sonuç literatürde mevcut çalışmalar ile uyumluydu. *LINC00958* ekspresyonunun klinik etkilerini değerlendirmek için *LINC00958*'in ekspresyonunu hastaların klinik verileriyle karşılaştırdık. Tümör lokalizasyonu ve cinsiyet ile *LINC00958* ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken ($p<0,05$) yaş, patolojik tanı, klinik evre, T-evresi, LN metastazı, uzak metastaz ve MSI durumu ile *LINC00958* ifade düzeyleri arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı (*p>0,05*). Literatürde KRK'de *LINC00958*'in ekspresyonu ile cinsiyet arasında anlamlı bir fark daha önce bildirilmemiştir. *LINC00958* ekspresyon seviyelerinin kadınlarda erkeklere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulduk (*p<0,05*). Bu farklılık, *LINC00958*'in ekspresyonunun genetik, epigenetik, hormonal veya cinsiyetle ilişkili biyolojik mekanizmalar tarafından düzenlenebileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda ileri çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Öte yandan, kolon tümörleri (sağ ve sol kolon) ile rektal tümörler arasında *LINC00958*'in ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulduk (*p<0,05*). İlginç bir şekilde rektum kanseri örneklerin çoğunda (%80) beklenenin aksine düşük *LINC00958* ekspresyonu saptadık. Buna karşılık, yüksek *LINC00958* ekspresyonu kolon tümörlerinde %74,3, rektumda ise %20 oranında gözlemledik. Bu fark kolon ve rektumun anatomik olarak birbirine yakın olmasına rağmen farklı embriyolojik kökenlere sahip olmalarına veya kolon ve rektum tümörlerinde moleküler yolakların farklı seviyelerde aktive olmasına (örneğin, Wnt/β-katenin yolu kolon tümörlerinde daha aktif olabilir) bağlı olabilir. Ancak rektum kanserinin örnek sayısı az olduğundan bu durum dikkatlice yorumlanmalıdır. Çalışmamızda *LINC00958*'in ekspresyon düzeyleri hem erken hem de ileri evre tümörlerde yüksek olma eğilimindeydi ancak klinik evre, T evresi ve metastaz durumu ile *LINC00958*'in ekspresyonu arasında anlamlı bir fark bulamadık. Literatürde, farklı çalışmalarda klinik evre ve metastaz durumu ile *LINC00958*'in ifadesi arasında anlamlı bir ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ancak, çalışmamızda *LINC00958*'in bu değişkenlerle ilişkili olmaması, çalışmanın örnek büyüklüğü, hasta popülasyonu veya tümörün moleküler özelliklerine bağlı (örneğin, MSS durumu) olarak değişkenlik gösterebileceği düşünmekteyiz. Örnek büyüklüğü özellikle daha az görünen metastaz gibi olayların istatistiksel anlamlılık için yetersiz olabilir. Daha büyük hasta grubu ile çalışmak, bu ilişkinin daha iyi değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır. Mikrosatellit durumuna bakıldığında hem MSS hem de MSI gruplarında yüksek *LINC00958* ekspresyonu daha yaygındı. Ancak MSI grubundaki örnek sayısının (n = 6) MSS grubuna göre çok daha düşük olması, bu analiz için yeterli gücü sağlamayacaktır. Sonuç olarak, *LINC00958*'in onkojenik rolü, KRK'de tanısal ve prognostik bir biyobelirteç olarak potansiyelini göstermektedir. Dahası, *LINC00958*'i hedeflemek yeni bir terapötik yaklaşım olarak hizmet edebilir.

miRNA'lar, yaklaşık 20-22 nükleotid uzunluğunda, gen ifadesini post-transkripsiyonel seviyede düzenleyen moleküllerdir (169). Bu düzenleme, hedef mRNA'larına bağlanarak translasyonun durdurulması veya mRNA'nın degradasyonu yoluyla gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda birçok farklı kanserde önemli roller oynayan miRNA'lar keşfedilmiştir. Kanser mekanizmalarının aydınlatılmasında miRNA'ların rolü üzerine yapılan çalışmalar, bu moleküllerin terapötik ve tanısal potansiyelini ortaya koymaktadır. miRNA'lar, hücresel süreçleri düzenlerken onkojenik veya tümör baskılayıcı olarak işlev görebildiği bilinmektedir (169). Çok sayıda çalışmada miRNA'ların KRK de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin düzenlenmesiyle ilişkilendirmiştir (122). KRK'de miRNA disregülasyonunun hastalığın ilerlemesi, tedaviye yanıt ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca, KRK'de aktif olan Wnt/β-katenin, EGFR ve TGF-β yolakları gibi önemli sinyal yolaklarının birçok basamağının çeşitli miRNA'larla modüle edildiği ve bu miRNA'ların kritik roller oynadığı gösterilmiştir (170). Bu nedenle, miRNA'ların kanser biyolojisindeki rollerinin anlaşılması klinik uygulamada hem tanı hem de tedavi açısından umut vadetmektedir.

Bu miRNA'lardan biri olan *miR-3619-5p*'nin, KRK dahil birçok malignitede önemli bir düzenleyici olarak işlevi nedeniyle araştırma odağı haline gelmiştir. Bu miRNA, hedef genlerin ekspresyonunu değiştirerek hücre proliferasyonu ve invazyonu gibi kritik kanser süreçlerini modüle ettiği bilinmektedir (171).

Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *miR-3619-5p*'nin KRK dokularında düşük seviyelerde ifade edildiği saptanmıştır (171). Bu çalışma, *PVT1* lncRNA'ların *miR-3619-5p*'yi bağlayarak inhibe ettiği ve bu sayede *TRIM29* ekspresyonunu artırdığını ortaya koymuştur.

Kolon adenokarsinomunda potansiyel immünoterapi hedeflerinin ortaya çıkarılması amacıyla yapılan bir başka çalışmada, *miR-3619-5p*'nin kolon adenokarsinomunda ceRNA ağı içinde önemli bir düzenleyici miRNA olduğu bulunmuştur (172). Bu çalışmada *miR-3619-5p*'nin, çeşitli lncRNA'larla etkileşime girerek gen ekspresyonunu düzenlemesine olanak sağladığı belirlenmiştir.

Bununla birlikte, *miR-3619-5p* ile *CTNNB1* (β-katenin) ilişkisi çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Meme kanseri örneklerinde yapılan bir çalışmada *LINC00665*'in *miR-3619-5p*'yi bağlayarak tümör baskılayıcı etkisini engellediği ve *CTNNB1* geninin ekspresyonunu düzenleyerek β-katenin seviyelerini artırdığı belirlenmiştir (173).

Zhang ve arkadaşları, mesane kanserinde *miR-3619-5p*'nin biyolojik rolünü ve terapötik potansiyelini incelemiştir. Bu çalışmada *miR-3619-5p*'nin mesane kanseri dokularında ve hücre hatlarında düşük düzeyde ifade edildiği ve bu durumun tümör büyümesi, metastaz ve kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca *miR-3619-5p*'nin, tümör süpresör gen olan *p21*'in (*CDKN1A* olarak da bilinmektedir) ekspresyonunu artırarak hücre döngüsünü durdurduğu, β-katenin ve *CDK2*'nin ekspresyonunu azaltarak Wnt/β-katenin yolağını baskıladığı tespit edilmiştir.

Hepatosellüler karsinomda (HCC) yapılan bir başka çalışmada, sirküler RNA olan *circZFR*'nin *miR-3619-5p*/*CTNNB1* ekseninin üzerindeki etkisi araştırılmıştır (140). Bu çalışmada *circZFR*'nin, *miR-3619-5p*'yi bağlayarak bu *CTNNB1* üzerindeki baskılayıcı etkisini azalttığı ve Wnt/β-katenin yolağının aktive ettiği bildirilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada *miR-3619-5p*'nin KHDAK hücrelerinde β-katenin aracılı kanser büyümesinin ve invazyonunun baskılanmasında rol oynadığı ve KHDAK'de yeni bir kanser süpresör olabileceği gösterilmiştir (10). Bu çalışmada KHDAK'de *miR-3619-5p* düşük, β-katenin seviyeleri ise yüksek bulunmuş ve bu iki molekül arasında güçlü bir ters korelasyon bildirilmiştir. Bu ilişki biyoinformatik analizler ve hücre hatlarıyla yapılan deneylerde doğrulanmıştır.

Song ve arkadaşları, KRK hücrelerinde *LINC00882*/*miR-3619-5p*/*CTNNB1* aksını araştırmıştır (12). Bu çalışmada *LINC00882*'nin, *miR-3619-5p*'yi baskılayarak *CTNNB1* geninin up-regülasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. *miR-3619-5p* ekspresyon seviyeleri ile KRK hücre proliferasyonu ve migrasyonu arasındaki ters korelasyon, bu miRNA'nın KRK'de bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü düşündürmektedir (12).

Mevcut çalışmamızda, KRK dokularındaki *miR-3619-5p*'nin ekspresyonu kontrol sağlıklı dokuya kıyasla anlamlı bir şekilde daha düşük olduğunu bulduk ($p<0,05$). Bu durum *miR-3619-5p*'nin KRK'de down-regüle olduğunu göstermektedir. Bu sonuç literatürde mevcut çalışmalar ile tutarlıydı.

Çalışmamızda, *miR-3619-5p*'nin ekspresyon düzeyleri ile hiçbir klinik veya patolojik değişken arasında anlamlı bir ilişki saptamadık (tüm *p* değerleri $>0,05$). Cinsiyet açısından baktığımızda her iki cinsiyette de düşük *miR-3619-5p* ekspresyonu daha fazlaydı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Tümör lokalizasyonu açısından da kolon ve rektum tümörlerinde *miR-3619-5p* ekspresyon seviyeleri daha baskındı. İlginç bir şekilde adenokarsinomun alt tipi olan müsinöz adenokarsinom örneklerinin tümünde düşük *miR-3619-5p* ekspresyonu gözlemledik. Bu durum *miR-3619-5p* ekspresyonu ile patolojik tanı arasında potansiyel bir fark olabileceğini düşündürebilir, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmaması ve örnek sayısının çok az olmasından dolayı bu sonuç dikkatlice yorumlanmalıdır. Daha büyük örneklem ile bu ilişkilerin yeniden değerlendirilmesi öneririz. Klinik evre ile *miR-3619-5p* ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmasa da erken evrede yüksek ekspresyon oranının daha fazla olduğunu gözlemledik (%29,4 ve %20). Bu durum, *miR-3619-5p*'nin ekspresyon düzeylerinin tümör progresyonuyla belirgin bir farklılık göstermediğini düşündürse de tümör progresyonu üzerindeki potansiyel etkilerini anlamak için daha büyük örnekle incelenmesi öneririz. Mikrosatallit durumuna bakıldığında MSS grubunda düşük *miR-3619-5p* ekspresyonun baskın olduğunu (%80,6), buna karşılık olarak MSI grubunda düşük ve yüksek ekspresyonu eşit sayıda (%50) gözlemledik. Ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmaması, dikkatlice yorum yapılması gerektiğini gösterir.

Beta-katenin, CTNNB1 geni tarafından kodlanan kadherin ile ilişkili bir zonula adherens proteinidir. Wnt/β-katenin sinyal yolağı, KRK'nin gelişimi ve ilerlemesinde kritik bir rol oynamaktadır (174,175). Bu yolak, embriyonik gelişim, doku rejenerasyonu ve hücresel homeostaz gibi temel biyolojik süreçlerde yer almaktadır. Öte yandan patolojik aktivasyonu hemen hemen tüm KRK vakalarında görülmektedir (12,174). KRK gelişiminde, hücre çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalmasında çok önemli bir rol oynayan Wnt/β-katenin sinyal yolunun düzensizliği yer almaktadır. Spesifik olarak, β-katenin kodlayan *CTNNB1*'nin disregülasyonu, düzensiz hücre büyümesini teşvik ederek

karsinogeneze önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Yukarıda bahsedilen çalışmalarda belirtildiği gibi *CTNNB1*'in KRK dahil çeşitli kanserlerde up-regüle olduğu gösterilmiştir. Bu yolağın aktivasyonu, özellikle β-katenin birikimi ve nükleer transkripsiyon aktivasyonu yoluyla, kanserin başlaması ve ilerlemesinde kritik rol oynamaktadır. Ayrıca, Wnt/β-katenin sinyal yolağının, KRK hücrelerinde ilaç direnci (Kemoterapi ve immünoterapi) gelişiminde kritik bir rol oynadığı bildirilmiştir (175). Ayrıca, KRK hastalarında yüksek β-katenin ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (175).

Çalışmamızda, *CTNNB1* ekspresyonunun klinik etkilerini değerlendirmek için klinik verileriyle karşılaştırdık. *LINC00958*'ye benzer şekilde tümör lokalizasyonu ve cinsiyet ile *CTNNB1* ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken ($p<0,05$) yaş, patolojik tanı, klinik evre, T-evresi, LN metastazı, uzak metastaz ve MSI durumu ile *LINC00958* ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0,05$). *CTNNB1* ekspresyon seviyelerinin kadınlarda erkeklere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulduk ($p<0,05$). Kadınlarda *CTNNB1*'in yüksek ekspresyonu erkeklere göre belirgin şekilde daha yaygındır (sırasıyla %84,6 ve %50). Erkeklerde düşük ve yüksek ekspresyon oranları eşitken kadınlarda düşük ekspresyon oldukça nadir görülmektedir (%15,4). Bu farklılık, *CTNNB1*'in ekspresyonunun genetik, epigenetik, hormonal veya cinsiyetle ilişkili biyolojik mekanizmalar tarafından düzenlenebileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda ileri çalışmaların yapılması gereklidir. Öte yandan, kolon tümörleri (sağ ve sol kolon) ile rektum tümörleri arasında *CTNNB1*'in ekspresyonu açısından anlamlı bir fark tespit ettik ($p<0,05$). Yüksek *CTNNB1* ekspresyonu rektumda sadece %20 oranında gözlemledik. Bu fark kolon ve rektumun anatomik olarak birbirine yakın olmasına rağmen farklı embriyolojik kökenlere sahip olmalarına veya kolon ve rektum tümörlerinde moleküler yolakların farklı seviyelerde aktive olmasına (örneğin, Wnt/β-katenin yolu kolon tümörlerinde daha aktif olabilir) bağlı olabilir. Ancak rektum kanserinin örnek sayısı az olduğundan bu durum dikkatlice yorumlanmalıdır. *CTNNB1*'in yüksek ekspresyonu hem MSS hem de MSI bireylerde yaygın olarak görülmektedir, ancak tüm MSI olan örneklerde yalnızca yüksek ekspresyon saptadık. MSI durumu ile *CTNNB1* ekspresyonu

arasında anlamlı bir ilişki bulunmamakla birlikte, bu farklılığın daha büyük örneklem büyüklükleriyle incelenmesi gereklidir.

Hedef RNA'lar arasında korelasyonlar ele alındığında; *LINC00958* ve *CTNNB1* gen ekspresyonu arasında anlamlı düzeyde güçlü pozitif korelasyon saptandı. *LINC00958*'in *CTNNB1* ekspresyonunu artırıcı bir rol oynayabileceğini veya aynı yolakta yer aldığını düşündürmektedir. Bu sonuç, literatürdeki çalışmalar ile tutarlı olması bu hipotezi destekler niteliktedir.

Öte yandan, *LINC00958-miR-3619-5p* ve *miR-3619-5p-CTNNB1* arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı. *miR-3619-5p*'nin *CTNNB1* ile orta düzeyde negatif bir ilişki göstermesi, *CTNNB1* ekspresyonunu baskılayan bir mikroRNA olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu ilişki sınırda anlamsız bulunduğundan, daha büyük örneklemlerle test edilip doğrulanmasını önermekteyiz.

LINC00958 ile *miR-3619-5p* arasında ise anlamlı bir ilişki bulunmadı. Literatürdeki çalışmada (9), bu iki RNA arasında baskılayıcı bir ilişki olduğunu öne sürmektedir. Ayrıca çalışma yalnızca hücre hatlarında gerçekleştirilmiş ve hastadan alınan doku örnekleri üzerinde denenmemiştir (9). Bu durum, bulguların in vivo koşullara genellenebilirliğini sınırlamaktadır. Fakat çalışmamızda bu ilişki istatistiksel anlamsız olmasının yanı sıra zayıf pozitif korelasyon gözlemlendi. Bu durum, iki RNA'nın bağımsız olarak çalıştığını veya aralarındaki ilişkinin çok zayıf olduğunu düşündürebilir. Alternatif olarak, *LINC00958*'in *miR-3619-5p*'yi dolaylı olarak etkileyen başka faktörlerle düzenleniyor olabileceği düşünülebilir. Ancak unutulmamalı ki korelasyon, doğrudan bir sebep-sonuç ilişkisini göstermez. Literatürde negatif ilişki bulunmuş olsa bile, bu, farklı bir bağlamda pozitif bir korelasyon gözlenmesini dışlamaz. Bununla birlikte, çalışmada teknik hata veya küçük örneklem büyüklüğünden kaynaklı olabileceği de unutulmamalıdır.

LINC00958 ile *CTNNB1* arasındaki güçlü pozitif korelasyon, *LINC00958*'in *CTNNB1* ekspresyonunu doğrudan veya dolaylı olarak düzenlediği hipotezini desteklemektedir. Ancak, *LINC00958* ile *miR-3619-5p* arasında zayıf bir ilişki ve *miR-3619-5p* ile *CTNNB1* arasındaki negatif korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı

olmaması, bu ilişkilerin daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerektiğini göstermektedir. Bu eksenin biyolojik anlamını ve klinik önemini ortaya koymak için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

KRK tanılı hastalarda *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* yolağının klinik ve patolojik özellikler ile ilişkisinin ilk kez incelendiği bu çalışmanın sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir;

1- KRK dokularında *LINC00958 ve CTNNB1*'in ekspresyonunun up-regüle olduğu, *miR-3619-5p*'nin ise down-regüle olduğu saptandı. Bu ekspresyon farkları istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$).

2- KRK dokularında *LINC00958* ve *CTNNB1*'in ekspresyonunun cinsiyetler arasında farklılık gösterdiği, kadınlarda daha yaygın olduğunu ve cinsiyetin bu genin ekspresyonunda belirleyici bir faktör olabileceğini gözlemledik. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$).

3- KRK dokularında *LINC00958* ve *CTNNB1*'in ekspresyonunun tümör lokalizasyonuna göre farklılık gösterdiği, kolonda yüksek ekspresyonlarının daha yaygın olduğunu gözlemledik. Rektum kanserinde ise *LINC00958* ve *CTNNB1*'in ekspresyonu beklenenin aksine daha düşük bulundu. Bu farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). Bu fark kolon ve rektumun anatomik olarak birbirine yakın olmasına rağmen farklı embriyolojik kökenlere sahip olmalarına veya kolon ve rektum tümörlerinde moleküler yolakların farklı seviyelerde aktive olmasına bağlı olabilir. Ancak rektum kanserinin örnek sayısı az olduğundan bu durum dikkatlice yorumlanmalıdır.

4- *LINC00958, miR-3619-5p* ve *CTNNB1*'in ifadesi klinik evre, T evresi ve metastaz durumu arasında anlamlı bir fark bulamadık. Literatürde, farklı çalışmalarda klinik evre ve metastaz durumu ile bu RNA'ların ifadesi arasında anlamlı bir ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ancak, çalışmamızda ekspresyonun bu değişkenlerle ilişkili bulunmaması, çalışmanın örnek büyüklüğü, hasta popülasyonu veya tümörün moleküler özelliklerine bağlı (örneğin, MSS durumu) olarak değişkenlik gösterebileceğini düşünmekteyiz.

5- Mikrosatellit durumuna bakıldığında hem MSS hem de MSI gruplarında yüksek *LINC00958* ve *CTNNB1* ekspresyonu gözlemlense de MSI olan örneklerde bu oranı çok daha yüksek saptadık. Ancak, MSI grubundaki örnek sayısının ($n = 6$) MSS grubuna göre çok daha düşük olması, bu analiz için yeterli gücü

sağlamayacaktır. Bu farklılık istatistiki olarak anlamlı değildi (p>0,05). Öte yandan, MSS bireylerde *miR-3619-5p* düşük ekspresyonu daha yaygınken, MSI bireylerde düşük ve yüksek ekspresyon eşit oranda görüldü. Bu farklılığın anlamlı olup olmadığını netleştirmek için daha büyük örneklem boyutu ile incelenmesi gereklidir.

Sonuç olarak, *LINC00958*'in onkojenik rolü, KRK'de tanısal ve prognostik bir biyobelirteç olarak potansiyelini göstermektedir. Dahası, *LINC00958*'i hedeflemek yeni bir terapötik yaklaşım olarak hizmet edebilir. Bu bulgular, *LINC00958/miR-3619-5p/CTNNB1* yolağının KRK patogenezinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ancak *LINC00958* ve *miR-3619-5p*'nin potansiyel ceRNA ağı ilişkisi kanıtlanamamıştır. *CTNNB1*'in bu ağda merkezi bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Bu da *CTNNB1*'in, diğer miRNA ve lncRNA'larla olası etkileşimlerini araştırmaya değer bir hedef olarak öne çıkarmaktadır. Bu bulgulara göre; KRK'de *LINC00958*'i tanısal bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörmekteyiz. Daha kapsamlı bir ceRNA ağı oluşturmak için daha büyük örneklem boyutları ile bu ilişkilerin doğrulanması ve bu yolaktaki hedef genleri etkileyebilecek ek miRNA ve lncRNA'ların analizlerinin yapılmasını önermekteyiz.

Hasta gruplarının daha homojen seçilip sayılarının yeterli düzeyde çoğaltılarak ilgili yolaklarla birlikte değerlendirilmesi ve hücre kültürleri ile desteklenmesi gerekmektedir. Çalışmada yalnızca 40 hastanın verileri incelenmiştir. Farklı popülasyonlarda yapılmış yüksek örneklem sayılı çalışmalar olmadığı için elde edilen sonuçların, alt gruplandırması yapılarak detaylı yorumlanamamıştır. Ayrıca, hastaların genotipleri bütüncül olarak değerlendirilememiştir. Öte yandan, KRK oluşumunda patofizyolojide rol oynayan diğer etkenlerin (diyet, ailesel faktörler, alkol kullanımı, sigara alışkanlığı gibi) çalışmaya dahil edilmemesi, sonucu etkilemiş olabilir. Daha anlamlı sonuçlar elde edebilmek için tüm risk faktörlerinin beraber değerlendirildiği detaylı çalışmalar yapılabilir.

ncRNA'ların klinik hedefler olarak kullanımı için kanıt düzeyi yüksek çalışmalar gereklidir. Herhangi bir ilaca karşı toksisite veya yan etkiyi değerlendirmek için, fonksiyonel ve hayvan modellerinde daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. KRK'nin RNA biyolojisindeki mevcut verileri aydınlatmak için bu tür ceRNA

etkileşimlerinin deneysel çalışmalar ve biyoinformatik kanıtların kombinasyonu aracılığıyla doğrulanması önem arz etmektedir. Bu yolakta bulunan RNA'larla ilişkili devam eden ve gelecekteki araştırmalar, onkojenik mekanizmalara ilişkin anlayışımızı geliştirecek ve yenilikçi tedavi yaklaşımlarının önünü açacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024;74(3):229–63.
2. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1) [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.; 2024. Available from: https://gco.iarc.who.int/today
3. SEER [Internet]. [cited 2024 Sep 9]. Cancer of the Colon and Rectum - Cancer Stat Facts. Available from: https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html
4. J W, S Z, N M, Y H, R L, Gr Y. ncRNA-Encoded Peptides or Proteins and Cancer. PubMed [Internet]. 2019 [cited 2024 Sep 7]; Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31526596/
5. Bhan A, Mandal SS. Long Noncoding RNAs: Emerging Stars in Gene Regulation, Epigenetics and Human Disease. ChemMedChem. 2014;9(9):1932–56.
6. Curtale G, Citarella F. Dynamic Nature of Noncoding RNA Regulation of Adaptive Immune Response. Int J Mol Sci. 2013 Aug 22;14(9):17347–77.
7. Lin Y, Zhao W, Lv Z, Xie H, Li Y, Zhang Z. The functions and mechanisms of long non-coding RNA in colorectal cancer. Front Oncol. 2024 Jul 4;14:1419972.
8. Li H, Gao J, Liu L, Zhang S. LINC00958: A promising long non-coding RNA related to cancer. Biomed Pharmacother. 2022 Jul;151:113087.
9. Sun Y, Liu Y, Cai Y, Han P, Wang R, Cao L, et al. Downregulation of LINC00958 inhibits proliferation, invasion and migration, and promotes apoptosis of colorectal cancer cells by targeting miR-3619-5p. Oncol Rep [Internet]. 2020 Jul 29 [cited 2024 Sep 7]; Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2020.7707
10. Niu X, Liu S, Jia L, Chen J. Role of MiR-3619-5p in β-Catenin-Mediated Non-Small Cell Lung Cancer Growth and Invasion. Cell Physiol Biochem. 2015 Oct 30;37(4):1527–36.
11. Peker K, Basoglu M, Gursan N. Relationship Between β -Catenin Expression and Prognostic Parameters of Colorectal Carcinomas. Turk J Pathol. 2013;29(2):87.
12. Song B, Li H, Guo S, Yang T, Li L, Cao L, et al. LINC00882 Plays a Tumor-promoter Role in Colorectal Cancer by Targeting miR-3619-5p to Up-regulate CTNNB1. Arch Med Res. 2022 Jan 1;53(1):29–36.
13. Lee YJ, Kim WR, Park EG, Lee DH, Kim J min, Shin HJ, et al. Exploring the Key Signaling Pathways and ncRNAs in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2024 Apr 21;25(8):4548.
14. Standring S, Gray H, Anand N, Tunstall R. Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice. Forty-second edition. [Amsterdam]: Elsevier; 2021.

15. Rao JN, Wang JY. Intestinal Architecture and Development. In Morgan & Claypool Life Sciences; 2010 [cited 2024 Sep 10]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54098/

16. Galandiuk S, Netz U, Morpurgo E, Tosato SM, Abu-Freha N, Ellis CT. Colon and Rectum. In: Sabiston Textbook of Surgery_ The Biological Basis of Modern Surgical Practice. Twenty-first edition. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2022. p. 1320–9.

17. Duan B, Zhao Y, Bai J, Wang J, Duan X, Luo X, et al. Colorectal Cancer: An Overview. In: Morgado-Diaz JA, editor. Gastrointestinal Cancers [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 [cited 2024 Sep 3]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK586003/

18. Ahmad R, Singh J Kumar, Wunnava A, Al-Obeed O, Abdulla M, Srivastava S Kumar. Emerging trends in colorectal cancer: Dysregulated signaling pathways (Review). Int J Mol Med. 2021 Mar 1;47(3):14.

19. Goran tek-en. Gastrointestinal sistem duvarının anatomisi [Internet]. Available from: https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode,https://commons.wikimedia.org/wiki/File: Layers _of_the_GI_Tract_english.svg,

20. Sullivan BA, Noujaim M, Roper J. Cause, Epidemiology, and Histology of Polyps and Pathways to Colorectal Cancer. Gastrointest Endosc Clin N Am. 2022 Apr;32(2):177–94.

21. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. Transl Oncol. 2021 Jul 6;14(10):101174.

22. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. Gut. 2023 Feb;72(2):338–44.

23. Klimeck L, Heisser T, Hoffmeister M, Brenner H. Colorectal cancer: A health and economic problem. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2023 Oct;66:101839.

24. Li N, Lu B, Luo C, Cai J, Lu M, Zhang Y, et al. Incidence, mortality, survival, risk factor and screening of colorectal cancer: A comparison among China, Europe, and northern America. Cancer Lett. 2021 Dec 1;522:255–68.

25. Saraiva MR, Rosa I, Claro I. Early-onset colorectal cancer: A review of current knowledge. World J Gastroenterol. 2023 Feb 28;29(8):1289–303.

26. Kim BJ, Hanna MH. Colorectal cancer in young adults. J Surg Oncol. 2023;127(8):1247–51.

27. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. CA Cancer J Clin. 2024 Jan;74(1):12–49.

28. Murat TÜRKYILMAZ, Ege İhsan ORUÇ HAMAVİOĞLU, Selin DÜNDAR, Aysun KAVAK ERGÜN, Arzu SEVİNÇ, Semra TÜTÜNCÜ. TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ 2018 [Internet]. Tolga TOLUNAY, Sedat KAYGUSUZ, Bekir KESKİNKILIÇ, Süleyman ÖZSARI, Mehmet Enes GÖKLER, editors. Halk Sağlığı Genel MüdTürkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü;

2022. Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/Dokumanlar/Istatistikler/Kanser_Rapor_2018.pdf

29. Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2023 [Internet]. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK); 2024. Available from: https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2023-53709

30. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. Gastroenterology. 2015 Oct;149(5):1204-1225.e12.

31. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi DJ, John A, et al. Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. Cancers. 2022 Mar 29;14(7):1732.

32. Mahmoud NN. Colorectal Cancer. Surg Oncol Clin N Am. 2022 Apr;31(2):127–41.

33. Hamdy NM, Zaki MB, Rizk NI, Abdelmaksoud NM, Abd-Elmawla MA, Ismail RA, et al. Unraveling the ncRNA landscape that governs colorectal cancer: A roadmap to personalized therapeutics. Life Sci. 2024 Oct 1;354:122946.

34. Wang L, Cho KB, Li Y, Tao G, Xie Z, Guo B. Long Noncoding RNA (lncRNA)-Mediated Competing Endogenous RNA Networks Provide Novel Potential Biomarkers and Therapeutic Targets for Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2019;20(22).

35. Ionescu VA, Gheorghe G, Bacalbasa N, Chiotoroiu AL, Diaconu C. Colorectal Cancer: From Risk Factors to Oncogenesis. Medicina (Mex). 2023 Sep 12;59(9):1646.

36. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. Cancers. 2021 Apr 22;13(9):2025.

37. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. J Gastrointest Oncol Vol 3 No 3 Sept 01 2012 J Gastrointest Oncol Curr Top Gastrointest Liver Pathol [Internet]. 2012 [cited 2012 Jan 1]; Available from: https://jgo.amegroups.org/article/view/410

38. Ūbaitė G, Remeikaitė A, Žilinskas J. Colon Cancer Genetic and Epigenetic Changes, Etiopathogenesis, Risk Factors, Treatment: Literature Review. Liet Chir. 2024 Jun 12;23(2):86–96.

39. Ciepiela I, Szczepaniak M, Ciepiela P, Hińcza-Nowak K, Kopczyński J, Macek P, et al. Tumor location matters, next generation sequencing mutation profiling of left-sided, rectal, and right-sided colorectal tumors in 552 patients. Sci Rep. 2024 Feb 26;14(1):4619.

40. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. Nat Rev Immunol. 2021 Oct;21(10):653–67.

41. Dunne PD, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer—an update. Virchows Arch. 2024 Feb 1;484(2):273–85.

42. Menon G, Carr S, Kasi A. Familial Adenomatous Polyposis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Sep 19]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538233/

43. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Perkins JA. Robbins & Cotran pathologic basis of disease. Tenth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2021.

44. Bhattacharya P, Leslie SW, McHugh TW. Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Sep 19]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431096/

45. Peltomäki P, Nyström M, Mecklin JP, Seppälä TT. Lynch Syndrome Genetics and Clinical Implications. Gastroenterology. 2023;164(5):783–99.

46. Mojarad EN, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2013;6(3):120–8.

47. Stamos JL, Weis WI. The β-Catenin Destruction Complex. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Jan 1;5(1):a007898.

48. Bian J, Dannappel M, Wan C, Firestein R. Transcriptional Regulation of Wnt/β-Catenin Pathway in Colorectal Cancer. Cells. 2020;9(9).

49. Ben Hamouda S, Essafi-Benkhadir K. Interplay between Signaling Pathways and Tumor Microenvironment Components: A Paradoxical Role in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2023;24(6).

50. Bylsma LC, Gillezeau C, Garawin TA, Kelsh MA, Fryzek JP, Sangaré L, et al. Prevalence of RAS and BRAF mutations in metastatic colorectal cancer patients by tumor sidedness: A systematic review and meta-analysis. Cancer Med. 2020 Feb 1;9(3):1044–57.

51. Leiphrakpam PD, Are C. PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway as a Target for Colorectal Cancer Treatment. Int J Mol Sci. 2024;25(6).

52. Li Y. Modern epigenetics methods in biological research. Adv Epigenetics Methods Biomed. 2021 Mar 1;187:104–13.

53. Cao Q, Tian Y, Deng Z, Yang F, Chen E. Epigenetic Alteration in Colorectal Cancer: Potential Diagnostic and Prognostic Implications. Int J Mol Sci. 2024;25(6).

54. Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2020 Feb 1;17(2):111–30.

55. Goel A, Boland CR. Epigenetics of Colorectal Cancer. Gastroenterology. 2012 Dec 1;143(6):1442-1460.e1.

56. Low EE, Demb J, Liu L, Earles A, Bustamante R, Williams CD, et al. Risk Factors for Early-Onset Colorectal Cancer. Gastroenterology. 2020 Aug 1;159(2):492-501.e7.

57. Colorectal Cancer Risk Factors | Hereditary Colorectal Risk Factors [Internet]. [cited 2024 Sep 15]. Available from: https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html

58. Tazinkeng NN, Pearlstein EF, Manda-Mapalo M, Adekunle AD, Monteiro JFG, Sawyer K, et al. Incidence and risk factors for colorectal cancer in Africa: a systematic review and meta-analysis. BMC Gastroenterol. 2024 Sep 9;24(1):303.

59. Bai X, Wei H, Liu W, Coker OO, Gou H, Liu C, et al. Cigarette smoke promotes colorectal cancer through modulation of gut microbiota and related metabolites. Gut. 2022 Dec 1;71(12):2439–50.

60. Cai S, Li Y, Ding Y, Chen K, Jin M. Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis. Eur J Cancer Prev. 2014 Nov;23(6):532.

61. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of Colorectal Cancer Risk Factors. Cancer Causes Control CCC. 2013 Jun;24(6):1207–22.

62. Fu R, Chen X, Seum T, Hoffmeister M, Brenner H. Red and Processed Meat Intake, Polygenic Risk and the Prevalence of Colorectal Neoplasms: Results from a Screening Colonoscopy Population. Nutrients. 2024 Jan;16(16):2609.

63. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight Change and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Am J Epidemiol. 2015 Jun 1;181(11):832–45.

64. Lega IC, Lipscombe LL. Review: Diabetes, Obesity, and Cancer—Pathophysiology and Clinical Implications. Endocr Rev. 2020 Feb 1;41(1):33–52.

65. Ho CH, Cheng KC, Chao CM, Lai CC, Chiang SR, Chen CM, et al. Does radiotherapy increase the risk of colorectal cancer among prostate cancer patients? A large population-based study. J Cancer. 2020 Aug 25;11(21):6204–12.

66. Engin O, Kilinc G, Salimoglu S. Trends, Risk Factors, and Preventions in Colorectal Cancer. In: Engin O, editor. Colon Polyps and Colorectal Cancer [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [cited 2024 Sep 16]. p. 213–33. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0_10

67. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019 Dec;16(12):713–32.

68. Wang H. MicroRNA, Diabetes Mellitus and Colorectal Cancer. Biomedicines. 2020 Nov 24;8(12):530.

69. Yu GH, Li SF, Wei R, Jiang Z. Diabetes and Colorectal Cancer Risk: Clinical and Therapeutic Implications. J Diabetes Res. 2022 Mar 7;2022:1747326.

70. Keller DS, Windsor A, Cohen R, Chand M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. Tech Coloproctology. 2019 Jan 30;23(1):3–13.

71. Brandaleone L, Dal Buono A, Gabbiadini R, Marcozzi G, Polverini D, Carvello M, et al. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes and Inflammatory Bowel Diseases: Risk Management and Surveillance Strategies. Cancers. 2024 Aug 26;16(17):2967.

72. Hadjiliadis D, Khoruts A, Zauber AG, Hempstead SE, Maisonneuve P, Lowenfels AB, et al. Cystic Fibrosis Colorectal Cancer Screening Consensus Recommendations. Gastroenterology. 2018 Feb 1;154(3):736-745.e14.

73. Roshandel G, Ghasemi-Kebria F, Malekzadeh R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. Cancers. 2024;16(8).

74. Cheng Y, Ling Z, Li L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. Front Immunol. 2020 Nov 30;11:615056.

75. Wieczorska K, Stolarek M, Stec R. The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer: Where Are We? Where Are We Going? 2020 [cited 2024 Sep 16]; Available from: https://www.clinical-colorectal-cancer.com/article/S1533-0028(18)30571-1/abstract

76. Endale HT, Tesfaye W, Hassen FS, Asrat WB, Temesgen EY, Shibabaw YY, et al. Harmony unveiled: Intricate the interplay of dietary factor, gut microbiota, and colorectal cancer—A narrative review. SAGE Open Med. 2024 Aug 31;12:20503121241274724.

77. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. 2019 Oct 19 [cited 2024 Sep 14]; Available from: https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(19)32319-0/abstract

78. Kamel F, Eltarhoni K, Nisar P, Soloviev M. Colorectal Cancer Diagnosis: The Obstacles We Face in Determining a Non-Invasive Test and Current Advances in Biomarker Detection. Cancers. 2022;14(8).

79. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW. ACG Clinical Guideline: Genetic Testing and Management of Hereditary Gastrointestinal Cancer Syndromes. Off J Am Coll Gastroenterol ACG [Internet]. 2015;110(2). Available from: https://journals.lww.com/ajg/fulltext/2015/02000/acg_clinical_guideline__genetic_testing_and.8.aspx

80. Hall MJ. Updates in Chemoprevention Research for Hereditary Gastrointestinal and Polyposis Syndromes. Curr Treat Options Gastroenterol. 2020 Dec 28;19(1):30–46.

81. Abu-Ghazaleh N, Kaushik V, Gorelik A, Jenkins M, Macrae F. Worldwide prevalence of Lynch syndrome in patients with colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. Genet Med. 2022 May 1;24(5):971–85.

82. Dinarvand P, Davaro EP, Doan JV, Ising ME, Evans NR, Phillips NJ, et al. Familial Adenomatous Polyposis Syndrome: An Update and Review of Extraintestinal Manifestations. Arch Pathol Lab Med. 2019 May 29;143(11):1382–98.

83. Moreno CC, Mittal PK, Sullivan PS, Rutherford R, Staley CA, Cardona K, et al. Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. Clin Colorectal Cancer. 2016 Mar 1;15(1):67–73.

84. Biller LH, Schrag D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. JAMA. 2021 Feb 16;325(7):669–85.

85. Kt C, S N, M MM. Multitarget Stool DNA Testing (Cologuard) for Colorectal Cancer Screening. PubMed [Internet]. 2022 [cited 2024 Sep 17]; Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35166507/?dopt=Abstract

86. Imperiale TF, Porter K, Zella J, Gagrat ZD, Olson MC, Statz S, et al. Next-Generation Multitarget Stool DNA Test for Colorectal Cancer Screening. N Engl J Med. 2024 Mar 13;390(11):984–93.

87. Shirley M. Epi proColon® for Colorectal Cancer Screening: A Profile of Its Use in the USA. Mol Diagn Ther. 2020 Jun 18;24(4):497–503.

88. Chung Daniel C., Gray Darrell M., Singh Harminder, Issaka Rachel B., Raymond Victoria M., Eagle Craig, et al. A Cell-free DNA Blood-Based Test for Colorectal Cancer Screening. N Engl J Med. 2024 Mar 13;390(11):973–83.

89. KRK'nin Evreleri [Internet]. Available from: https://colorectalsurgeonssydney.com.au/conditions/bowel-cancer

90. Kumar A, Gautam V, Sandhu A, Rawat K, Sharma A, Saha L. Current and emerging therapeutic approaches for colorectal cancer: A comprehensive review. World J Gastrointest Surg. 2023 Apr 27;15(4):495–519.

91. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. Signal Transduct Target Ther. 2020 Mar 20;5(1):22.

92. Shin AE, Giancotti FG, Rustgi AK. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. Trends Pharmacol Sci. 2023 Apr;44(4):222–36.

93. Al-Salama ZT. Encorafenib: A Review in Metastatic Colorectal Cancer with a BRAF V600E Mutation. Drugs. 2021 May 1;81(7):849–56.

94. Underwood PW, Ruff SM, Pawlik TM. Update on Targeted Therapy and Immunotherapy for Metastatic Colorectal Cancer. Cells. 2024;13(3).

95. Coan M, Haefliger S, Ounzain S, Johnson R. Targeting and engineering long non-coding RNAs for cancer therapy. Nat Rev Genet. 2024 Aug 1;25(8):578–95.

96. Amin N, McGrath A, Chen YPP. Evaluation of deep learning in non-coding RNA classification. Nat Mach Intell. 2019 May 1;1(5):246–56.

97. Turgut Coşan D, Yağcı E, Kurt H. Epigenetikten Kansere Uzanan Çizgiler: Uzun Kodlamayan RNA'lar. Osman J Med. 2018 Sep 1;40(3):114–21.

98. Liang H, Zhao Q, Zhu Z, Zhang C, Zhang H. Long noncoding RNA LINC00958 suppresses apoptosis and radiosensitivity of colorectal cancer through targeting miR-422a. Cancer Cell Int. 2021 Sep 8;21(1):477.

99. Mattick JS, Amaral PP, Carninci P, Carpenter S, Chang HY, Chen LL, et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. Nat Rev Mol Cell Biol. 2023 Jun 1;24(6):430–47.

100. Gao N, Li Y, Li J, Gao Z, Yang Z, Li Y, et al. Long Non-Coding RNAs: The Regulatory Mechanisms, Research Strategies, and Future Directions in Cancers. Front Oncol [Internet]. 2020 Dec 18 [cited 2024 Sep 23];10. Available from: https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.598817/full

101. Herman AB, Tsitsipatis D, Gorospe M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation. Mol Cell. 2022 Jun 16;82(12):2252–66.

102. Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2021 Feb 1;22(2):96–118.

103. Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. Cancer Cell. 2016 Apr 11;29(4):452–63.

104. Poursheikhani A, Abbaszadegan MR, Kerachian MA. Mechanisms of long non-coding RNA function in colorectal cancer tumorigenesis. Asia Pac J Clin Oncol. 2021;17(1):7–23.

105. Chi Y, Wang D, Wang J, Yu W, Yang J. Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers. Cells. 2019;8(9).

106. Lv Y, Lv Y, Wang Z, Yuan K, Zeng Y. Noncoding RNAs as sensors of tumor microenvironmental stress. J Exp Clin Cancer Res. 2022 Jul 16;41(1):224.

107. Wang J, Zhang X, Chen W, Hu X, Li J, Liu C. Regulatory roles of long noncoding RNAs implicated in cancer hallmarks. Int J Cancer. 2020;146(4):906–16.

108. Ahadi A. Functional roles of lncRNAs in the pathogenesis and progression of cancer. Genes Dis. 2021 Jul 1;8(4):424–37.

109. Chen S, Shen X. Long noncoding RNAs: functions and mechanisms in colon cancer. Mol Cancer. 2020 Nov 28;19(1):167.

110. Ismail DM, Shaker OG, Kandeil MA, Hussein RM. Gene Expression of the Circulating Long Noncoding RNA H19 and HOTAIR in Egyptian Colorectal Cancer Patients. Genet Test Mol Biomark. 2019 Sep 1;23(9):671–80.

111. Shen X, Bai Y, Luo B, Zhou X. Upregulation of lncRNA BANCR associated with the lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. Biol Res. 2017 Oct 2;50(1):32.

112. Pan K, Xie Y. LncRNA FOXC2-AS1 enhances FOXC2 mRNA stability to promote colorectal cancer progression via activation of Ca2+-FAK signal pathway. Cell Death Dis. 2020 Jun 8;11(6):434.

113. Lulli M, Napoli C, Landini I, Mini E, Lapucci A. Role of Non-Coding RNAs in Colorectal Cancer: Focus on Long Non-Coding RNAs. Int J Mol Sci. 2022 Nov 3;23(21):13431.

114. Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. Nat Rev Genet. 2023 Dec 1;24(12):816–33.

115. Nemeth K, Bayraktar R, Ferracin M, Calin GA. Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics. Nat Rev Genet [Internet]. 2023 Nov 15 [cited 2024 Sep 5]; Available from: https://www.nature.com/articles/s41576-023-00662-1

116. Rac M. Synthesis and Regulation of miRNA, Its Role in Oncogenesis, and Its Association with Colorectal Cancer Progression, Diagnosis, and Prognosis. Diagnostics. 2024;14(13).

117. Otmani K, Lewalle P. Tumor Suppressor miRNA in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment: Mechanism of Deregulation and Clinical Implications. Front Oncol [Internet]. 2021;11. Available from: https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2021.708765

118. Nurcin F, Gedik Ö, Pirim D. KOLOREKTAL KANSER MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİNDE MİKRORNA-MİKROBİYOM İLİŞKİSİ. Türk Bilimsel Derlemeler Derg. 2020 Sep 4;13(2):102–14.

119. Yan H, Bu P. Non-coding RNA in cancer. Essays Biochem. 2021 Oct;65(4):625–39.

120. Saberinia A, Alinezhad A, Jafari F, Soltany S, Akhavan Sigari R. Oncogenic miRNAs and target therapies in colorectal cancer. Clin Chim Acta. 2020 Sep 1;508:77–91.

121. Ellakwa DES, Mushtaq N, Khan S, Jabbar A, Abdelmalek MA, Wadan AHS, et al. Molecular functions of microRNAs in colorectal cancer: recent roles in proliferation, angiogenesis, apoptosis, and chemoresistance. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2024 Aug 1;397(8):5617–30.

122. Shirmohamadi M, Eghbali E, Najjary S, Mokhtarzadeh A, Kojabad AB, Hajiasgharzadeh K, et al. Regulatory mechanisms of microRNAs in colorectal cancer and colorectal cancer stem cells. J Cell Physiol. 2020 Feb 1;235(2):776–89.

123. Pandey S, Jain A, Vagha S. Insights Into Colorectal Carcinoma: A Comprehensive Review of MicroRNA Expression Patterns. Cureus. 2024 Mar 22;16(3):e56739.

124. Michas AM Vasileios; Anagnostou, Evangelos; Galanopoulos, Michail; Tolia, Maria; Tsoukalas, Nikolaos. The Clinical Significance of MicroRNAs in Colorectal Cancer Signaling Pathways: A Review. Glob Med Genet. 2023 Nov 22;10(04):315–23.

125. Huang X, Zhu X, Yu Y, Zhu W, Jin L, Zhang X, et al. Dissecting miRNA signature in colorectal cancer progression and metastasis. Cancer Lett. 2021 Mar 31;501:66–82.

126. Sado AI, Batool W, Ahmed A, Zafar S, Patel SK, Mohan A, et al. Role of microRNA in colorectal carcinoma (CRC): a narrative review. Ann Med Surg. 2023 Nov 7;86(1):308–18.

127. Schou JV, Johansen JS, Nielsen D, Rossi S. Circulating microRNAs as Prognostic and Predictive Biomarkers in Patients with Colorectal Cancer. Non-Coding RNA. 2016;2(2).

128. Qi X, Lin Y, Chen J, Shen B. Decoding competing endogenous RNA networks for cancer biomarker discovery. Brief Bioinform. 2020 Mar 23;21(2):441–57.

129. Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? Cell. 2011 Aug 5;146(3):353–8.

130. Yang Y, Deng X, Li Q, Wang F, Miao L, Jiang Q. Emerging roles of long noncoding RNAs in cholangiocarcinoma: Advances and challenges. Cancer Commun. 2020 Dec 1;40(12):655–80.

131. Liang WC, Fu WM, Wong CW, Wang Y, Wang WM, Hu GX, et al. The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer. Oncotarget Vol 6 No 26 [Internet]. 2015 [cited 2015 Jan 1]; Available from: https://www.oncotarget.com/article/4154/text/

132. Zhang X, Wu T, Zhou J, Chen X, Dong C, Guo Z, et al. Establishment and verification of prognostic model and ceRNA network analysis for colorectal cancer liver metastasis. BMC Med Genomics. 2023 May 9;16(1):99.

133. Chen D liang, Lu Y xin, Zhang J xing, Wei X li, Wang F, Zeng Z lei, et al. Long non-coding RNA UICLM promotes colorectal cancer liver metastasis by acting as a ceRNA for microRNA-215 to regulate ZEB2 expression. Theranostics. 2017;7(19):4836–49.

134. Liu Y, Chen X, Chen X, Liu J, Gu H, Fan R, et al. Long non-coding RNA HOTAIR knockdown enhances radiosensitivity through regulating microRNA-93/ATG12 axis in colorectal cancer. Cell Death Dis. 2020 Mar 6;11(3):175.

135. Zhang L, Li Y, Fu C, Yang L, Li G, Wu Y, et al. Exploration and validation of ceRNA regulatory networks in colorectal cancer based on associations whole transcriptome sequencing. Sci Rep. 2024 Sep 2;14(1):20446.

136. Zhang H, Zhang G, Zhang F, Yang X, Li E, Wang B, et al. LINC00958 may be a new prognostic biomarker in various cancers: A meta-analysis and bioinformatics analysis. Front Genet. 2022 Nov 11;13:998442.

137. Luo Z, Hao S, Yuan J, Zhu K, Liu S, Zhang J, et al. Long non-coding RNA LINC00958 promotes colorectal cancer progression by enhancing the expression of LEM domain containing 1 via microRNA miR-3064-5p. Bioengineered. 2021 Jan;12(1):8100–15.

138. Xie M, Fu Q, Wang P pin, Cui Y lan. STAT1-Induced Upregulation lncRNA LINC00958 Accelerates the Epithelial Ovarian Cancer Tumorigenesis by Regulating Wnt/β-Catenin Signaling. Dis Markers. 2021 Jan 1;2021(1):1405045.

139. Zhang Q, Miao S, Han X, Li C, Zhang M, Cui K, et al. MicroRNA-3619-5p suppresses bladder carcinoma progression by directly targeting β-catenin and CDK2 and activating p21. Cell Death Dis. 2018 Sep 20;9(10):960.

140. Tan A, Li Q, Chen L. CircZFR promotes hepatocellular carcinoma progression through regulating miR-3619–5p/CTNNB1 axis and activating Wnt/β-catenin pathway. Arch Biochem Biophys. 2019 Jan 1;661:196–202.

141. Miroševič Š, Khandelwal S, Sušjan P, Žakelj N, Gosar D, Forstnerič V, et al. Correlation between Phenotype and Genotype in CTNNB1 Syndrome: A Systematic Review of the Literature. Int J Mol Sci. 2022;23(20).

142. He K, Gan WJ. Wnt/β-catenin signaling pathway and Colorectal Cancer | CMAR. [cited 2024 Oct 3]; Available from: https://www.dovepress.com/wnt-catenin-signaling-pathway-in-the-development-and-progression-of-co-peer-reviewed-fulltext-article-CMAR

143. Samant C, Kale R, Pai KSR, Nandakumar K, Bhonde M. Role of Wnt/β-catenin pathway in cancer drug resistance: Insights into molecular aspects of major solid tumors. Biochem Biophys Res Commun. 2024 Oct 15;729:150348.

144. Oliveira LFS, Predes D, Borges HL, Abreu JG. Therapeutic Potential of Naturally Occurring Small Molecules to Target the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway in Colorectal Cancer. Cancers. 2022;14(2).

145. Bugter JM, Fenderico N, Maurice MM. Mutations and mechanisms of WNT pathway tumour suppressors in cancer. Nat Rev Cancer. 2021 Jan 1;21(1):5–21.

146. Gao C, Wang Y, Broaddus R, Sun L, Xue F, Zhang W. Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review. Oncotarget Vol 9 No 4 [Internet]. 2017 [cited 2016 Dec 31]; Available from: https://www.oncotarget.com/article/23695/text/

147. Yu F, Yu C, Li F, Zuo Y, Wang Y, Yao L, et al. Wnt/β-catenin signaling in cancers and targeted therapies. Signal Transduct Target Ther. 2021 Aug 30;6(1):307.

148. Chong G, Kuo FW, Tsai S, Lin C. Validation of reference genes for cryopreservation studies with the gorgonian coral endosymbiont Symbiodinium. Sci Rep. 2017 Jan 9;7(1):39396.

149. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods. 2001 Dec 1;25(4):402–8.

150. Zhen H, Du P, Yi Q, Tang X, Wang T. LINC00958 promotes bladder cancer carcinogenesis by targeting miR-490-3p and AURKA. BMC Cancer. 2021 Oct 26;21(1):1145.

151. Cui Y, Xie M, Zhang Z. LINC00958 Involves in Bladder Cancer Through Sponging miR-378a-3p to Elevate IGF1R. Cancer Biother Radiopharm. 2020 Dec 1;35(10):776–88.

152. Wang Q, Li K, Li X. Knockdown of LncRNA LINC00958 Inhibits the Proliferation and Migration of NSCLC Cells by MiR-204-3p/KIF2A Axis. Cell Transplant. 2021 Jan 1;30:09636897211025500.

153. Yang L, Li L, Zhou Z, Liu Y, Sun J, Zhang X, et al. SP1 induced long non-coding RNA LINC00958 overexpression facilitate cell proliferation, migration and invasion in lung adenocarcinoma via mediating miR-625-5p/CPSF7 axis. Cancer Cell Int. 2020 Jan 23;20(1):24.

154. Chen F, Liu M, Yu Y, Sun Y, Li J, Hu W, et al. LINC00958 regulated miR-627-5p/YBX2 axis to facilitate cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma. Cancer Biol Ther. 2019 Sep 2;20(9):1270–80.

155. Jia B, Dao J, Han J, Huang Z, Sun X, Zheng X, et al. LINC00958 promotes the proliferation of TSCC via miR-211-5p/CENPK axis and activating the JAK/STAT3 signaling pathway. Cancer Cell Int. 2021 Mar 3;21(1):147.

156. Seitz AK, Christensen LL, Christensen E, Faarkrog K, Ostenfeld MS, Hedegaard J, et al. Profiling of long non-coding RNAs identifies LINC00958 and LINC01296 as candidate oncogenes in bladder cancer. Sci Rep. 2017 Mar 24;7(1):395.

157. Altieri F, Buono L, Lanzilli M, Mirabelli P, Cianflone A, Beneduce G, et al. LINC00958 as new diagnostic and prognostic biomarker of childhood acute lymphoblastic leukaemia of B cells. Front Oncol [Internet]. 2024;14. Available from: https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2024.1388154

158. Wang Z, Zhu X, Dong P, Cai J. Long noncoding RNA LINC00958 promotes the oral squamous cell carcinoma by sponging miR-185-5p/YWHAZ. Life Sci. 2020 Feb 1;242:116782.

159. Li BJ, Ren FH, Zhang C, Zhang XW, Jiao XH. LncRNA AFAP1-AS1 Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Development by Ubiquitin-Mediated Proteolysis. Int Dent J. 2024 Dec 1;74(6):1277–86.

160. Yang D, Chang S, Li F, Ma M, Yang J, Lv X, et al. mA transferase KIAA1429-stabilized LINC00958 accelerates gastric cancer aerobic glycolysis through targeting GLUT1. IUBMB Life. 2021 Nov 1;73(11):1325–33.

161. Wang W, Song ZJ, Wang Y, Zhong WF, Kang P, Yang Y. Elevated long non-coding RNA LINC00958 was associated with metastasis and unfavorable prognosis in gastric cancer. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019 Jan;23(2):598–603.

162. Zuo X, Chen Z, Gao W, Zhang Y, Wang J, Wang J, et al. M6A-mediated upregulation of LINC00958 increases lipogenesis and acts as a nanotherapeutic target in hepatocellular carcinoma. J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 2020 Jan 8;13(1):5.

163. Rong D, Dong Q, Qu H, Deng X, Gao F, Li Q, et al. m6A-induced LINC00958 promotes breast cancer tumorigenesis via the miR-378a-3p/YY1 axis. Cell Death Discov. 2021 Feb 2;7(1):27.

164. Jiang Y, Qiao Z, Jiang J, Zhang J. LINC00958 promotes endometrial cancer cell proliferation and metastasis by regulating the miR-145-3p/TCF4 axis. J Gene Med. 2021 Jul 1;23(7):e3345.

165. Tian J, Cheng L, Kong E, Gu W, Jiang Y, Hao Q, et al. linc00958/miR-185-5p/RSF-1 modulates cisplatin resistance and angiogenesis through AKT1/GSK3β/VEGFA pathway in cervical cancer. Reprod Biol Endocrinol. 2022 Sep 2;20(1):132.

166. Wang L, Zhong Y, Yang B, Zhu Y, Zhu X, Xia Z, et al. LINC00958 facilitates cervical cancer cell proliferation and metastasis by sponging miR-625-5p to upregulate LRRC8E expression. J Cell Biochem. 2020;121(3):2500–9.

167. Ren Y, Zhao C, He Y, Xu H, Min X. Long non-coding RNA bladder cancer-associated transcript 2 contributes to disease progression, chemoresistance and poor survival of patients with colorectal cancer. Oncol Lett. 2019 Aug 1;18(2):2050–8.

168. Zhou L, Mu D, Chen Y. LINC00958 Targets miR-145-3p/CDK1 Axis to Aggravate the Malignancy of Colon Cancer. 2022;52(5).

169. Budakoti M, Panwar AS, Molpa D, Singh RK, Büsselberg D, Mishra AP, et al. Micro-RNA: The darkhorse of cancer. Cell Signal. 2021 Jul 1;83:109995.

170. Michas A, Michas V, Anagnostou E, Galanopoulos M, Tolia M, Tsoukalas N. The Clinical Significance of MicroRNAs in Colorectal Cancer Signaling Pathways: A Review. Glob Med Genet. 2023 Nov 22;10:315–23.

171. Sun Z, Li X, Shi Y, Yao Y. LncRNA PVT1 facilitates the growth and metastasis of colorectal cancer by sponging with miR-3619-5p to regulate TRIM29 expression. Cancer Rep. 2024 Jun 1;7(6):e2085.

172. Li C, Zhu Z, Hou Q, Wang B, Zou L, Liu L, et al. Revealing potential immunotherapy targets through analysis of a ceRNA network in human colon adenocarcinoma. Transl Cancer Res Vol 10 No 12 Dec 31 2021 Transl Cancer Res [Internet]. 2021 [cited 2021 Jan 1]; Available from: https://tcr.amegroups.org/article/view/58833

173. Lv M, Mao Q, Li J, Qiao J, Chen X, Luo S. Knockdown of LINC00665 inhibits proliferation and invasion of breast cancer via competitive binding of miR-3619-5p and inhibition of catenin beta 1. Cell Mol Biol Lett. 2020 Sep 24;25(1):43.

174. He K, Gan WJ. Wnt/β-Catenin Signaling Pathway in the Development and Progression of Colorectal Cancer. Cancer Manag Res. 2023 May 23;15:435–48.

175. Zhu Y, Li X. Advances of Wnt Signalling Pathway in Colorectal Cancer. Cells. 2023;12(3).