

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**β -CATENİN N-TERMİNAL BÖLGE DEĞİŞİKLİKLERİNİN
NEOPLASTİK SÜREÇLERDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Sarp UZUN

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2021

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**β -CATENİN N-TERMİNAL BÖLGE DEĞİŞİKLİKLERİNİN
NEOPLASTİK SÜREÇLERDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Sarp UZUN

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Aytekin AKYOL

ANKARA

2021

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

22/04/2021

Sarp UZUN

i

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

⁽¹⁾ Madde 6. 1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

⁽²⁾ Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkânı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü ve fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

⁽³⁾ Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun** önerisi ile **enstitü veya fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Aytekin AKYOL danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Sarp UZUN

TEŞEKKÜR

Tıp-Bilim Doktoru Bütünleşik Programı tıp fakültesi ve doktora eğitiminin iç içe geçtiği uzun ve zorlu bir süreçti.

Bu süreçte hem bilimsel bilginin nasıl üretildiğini bana öğreten hem de yol göstericiliği ile beni gelecekteki akademik kariyerime hazırlayan saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Aytekin Akyol'a en başta teşekkür ediyorum. Değerli vaktinden ayırıp hem bilime hem de hayata dair tecrübelerini benle paylaştığı için hep minnettar olacağım.

Tez çalışmamın her aşamasında tecrübelerini benle paylaşan tez izleme komitemin değerli hocaları sayın Prof. Dr. Ayşen Günel-Özcan ve sayın Prof. Dr. Erkan Yılmaz'a teşekkür ediyorum.

Doktora öğrencisi olarak başladığım akademik yaşantımda verdikleri eğitimle beni daha iyi bir araştırmacı yapan ve bende emeği olan tüm hocalarıma teşekkür ediyorum.

Histopatolojik yöntemlerde Türkiye'nin en değerli araştırmacılarından biri olduğunu düşündüğüm Aynur Işık'a deneylerime yardım ettiği ve tecrübelerini benle paylaştığı için teşekkür ediyorum.

Birlikte çok az çalışma fırsatına sahip olsam da bu tezin ortaya çıkmasında değerli katkıları olan Özge Özcan'a teşekkür ediyorum.

Hem deneylerimin yürütülmesinde hem de elde ettiğim sonuçların yorumlanmasında büyük katkıları bulunan Uzm. Dr. Güneş Güner'e ve Uzm. Dr. Kübra Katipoğlu'na teşekkür ediyorum.

Ve son olarak başaramayacağımı söylediğim her an "merak etme, yaparsın!" diyen, bana kendimden daha fazla güvenen ve beni her zaman koşulsuz destekleyen aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

ÖZET

Uzun, S, β -catenin N-Terminal Bölge Değişikliklerinin Neoplastik Süreçlerdeki Rolünün Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Doktora Tezi, Ankara, 2021. β -catenin, Wnt sinyal yolağının merkezinde yer alan çok fonksiyonlu bir proteindir. β -catenin'in hücre içi yerleşimi ve seviyesi, N-terminal bölgesinde yer alan özel bir amino asit dizisi sayesinde sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu amino asit dizisi *CTNNB1*'in (β -catenin'i kodlayan gen) üçüncü ekzonu (ekzon 3) tarafından kodlanmaktadır ve bu ekzonda görülen mutasyonlar N-terminal bölgede yer alan amino asit dizisini değiştirerek neoplastik transformasyona neden olmaktadır. Araştırma grubumuz tarafından *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının tespit edilmesini sağlayan immünohistokimyasal boyama temelli bir yöntem tanımlanmıştır. Bu tez çalışmasının birincil amacı, tanımladığımız yöntemi kullanarak patogenezi bilinmeyen neoplastik hastalıklarda *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının araştırılmasıdır. Bu kapsamda, dalağın nadir görülen vasküler lezyonlarından biri olan sklerozan anjiomatoid nodüler transformasyon (SANT) olgularında tanımladığımız yöntemle N-terminal bölge değişiklikleri incelenmektedir. İmmünohistokimyasal boyama sonucunda ekzon 3 mutasyonu varlığını düşündüren bulgular elde edilmektedir. Bu bulgular polimeraz zincir reaksiyonu ve Sanger sekanslama ile doğrulanmaktadır. Tez çalışmasının ikincil amacı ise tanımladığımız immünohistokimyasal boyama yöntemini kullanarak β -catenin'in N-terminal bölgesini etkileyebilecek post-translasyonel modifikasyonların araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda immünohistokimyasal ve immünofloresan boyama yöntemleri kullanılarak S33, S37 ve T41 amino asitlerinden fosforile olan β -catenin'in (fosfo-S33/S37/T41- β -catenin) hücre içi yerleşimi incelenmektedir ve bu proteinin kolon kanseri hücrelerinin çekirdeğinde birikebileceği gösterilmektedir. Ek olarak kolorektal kanser protein lizatlarında Western Blot yöntemi ile N-terminal ve C-terminal bölgesinden proteolitik olarak kesilmiş, düşük moleküler ağırlığı sahip β -catenin formlarının bulunabileceği ileri sürülmektedir.

Anahtar Kelimeler: β -catenin, *CTNNB1*, ekzon 3, fosfo- β -catenin, WNT

ABSTRACT

Uzun, S, Investigation of The Role of β -catenin N-terminal Domain Alterations in Neoplastic Processes, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Tumor Biology and Immunology Program Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2021. β -catenin is a multifunctional protein and located at the center of Wnt pathway. Intracellular localization and level of β -catenin are strictly controlled by special amino acid residues located at its N-terminal domain. These amino acid residues are encoded by the third exon (exon 3) of *CTNNB1* (β -catenin encoding gene) and the mutations altering this region lead to neoplastic transformation by changing the amino acid sequence of the N-terminal domain. Our research group has recently defined an immunohistochemistry-based approach that can detect *CTNNB1* exon 3 mutations. The primary purpose of this study is to evaluate the *CTNNB1* exon 3 alterations in neoplastic diseases of unknown pathogenesis by using this immunohistochemistry-based approach. For this purpose, β -catenin N-terminal domain alterations were evaluated with this method in the cases of sclerosing angiomatoid nodular transformation (SANT) of the spleen, a rare vascular lesion of the spleen. As a result of immunohistochemical staining, findings suggesting the presence of exon 3 mutations were obtained. These findings were confirmed with polymerase chain reaction and Sanger sequencing. The secondary purpose of this study is to evaluate the post-translational modifications of the β -catenin N-terminal domain by using the immunohistochemical staining method that we have described. For this purpose, the intracellular localization of β -catenin phosphorylated at the amino acids S33, S37 and T41 (phospho-S33/S37/T41- β -catenin) was investigated using immunohistochemical and immunofluorescent staining methods, and it was shown that this protein could accumulate in the nucleus of the colon cancer cells. By evaluating protein lysates of colorectal cancer patients with Western Blot method, it was also suggested that low molecular weight β -catenin forms might be formed after proteolytic cleavage of N-terminal and C-terminal regions of β -catenin.

Key Words: β -catenin, *CTNNB1*, exon 3, phospho- β -catenin, WNT

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Wnt Sinyal Yolağı	2
2.1.1. Wnt Sinyal Yolağına Giriş	2
2.1.2. Kanonikal Wnt/ β -catenin Sinyal Yolağının Çalışma Mekanizması	4
2.2. β -catenin ve N-Terminal Bölge	8
2.2.1. β -catenin'in Moleküler Yapısı ve Fonksiyonları	8
2.2.2. β -catenin N-Terminal Bölgenin Moleküler Yapısı ve Fonksiyonları	10
2.2.3. β -catenin N-Terminal Bölgede Görülen Genetik Değişiklikler	13
2.3. WNT/ β -catenin Sinyal Yolağı Mutasyonları ile İlişkili Neoplaziler	14
2.3.1. Hepatoselüler Karsinom	14
2.3.2. Kolorektal Kanser	16
2.3.3. Medulloblastom	19
2.3.4. Dezmoid Tümör ve Diğer Yumuşak Doku Tümörleri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Dalağın Sklerozan Anjiomatoid Nodüler Transformasyonu (SANT) Olgularının Seçilmesi	22
3.2. İnsan Kolorektal Kanser Doku Örneklerinin Toplanması	22
3.3. Hastalara ait Kolorektal Kanser Doku Örneklerinden DMD Oluşturulması	22
3.4. DNA İzolasyonu	23

3.4.1. Formalin ile Fikse edilmiş Parafine Gömülü (FFPG) Doku Kesitinden DNA İzolasyonu	23
3.4.2. Taze Donmuş Dokudan DNA İzolasyonu	24
3.5. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	24
3.5.1. FFPG Doku Kesitinden RNA İzolasyonu	24
3.5.2. Taze Donmuş Dokudan RNA İzolasyonu	25
3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Revers-Transkriptaz PZR (RT-PZR)	25
3.7. Agaroz Jel Ekstraksiyonu, PZR Pürifikasyonu ve Sekanslama	26
3.8. İmmünohistokimyasal Boyama	27
3.9. İmmunofloresan Boyama	28
3.10. Protein İzolasyonu, Protein Konsantrasyon Tayini ve Western Blot	29
3.11. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1. Etiyopatogenezi Bilinmeyen Yumuşak Doku Tümörlerinde <i>CTNNB1</i> Mutasyonlarının Araştırılması	31
4.2. β -catenin'in N-terminal Bölgesini Etkileyebilecek Post-Translasyonel Değişikliklerin Araştırılması	43
4.2.1. Fosfo- β -catenin'in Hücre İçi Yerleşiminin İmmunofloresan Boyama ile İncelenmesi	51
4.2.2. Fosfo- β -catenin, β -catenin ve Aktif- β -catenin İfadesinin Western Blot ile Değerlendirilmesi	53
4.2.3. Nükleer ve Sitoplazmik Fosfo- β -catenin İfadesinin Kolorektal Kanser Olgularının Sağkalımına Etkisi	57
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
7. KAYNAKLAR	69
8. EKLER	82
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Turnitin Ekran Görüntüsü	
EK-3: Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	85

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABC	Aktif- β -catenin
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
CK1	Kazein Kinaz 1
CRD	Sisteinden Zengin Bölge
CTNNB1	β -catenin'i Kodlayan Gen
DMD	Doku Mikrodizini
DVL	Dishevelled
EBV	Epstein-Barr Virüsü
FAP	Familyal Adenomatöz Polipozis
FFPG	Formalinle Fikse Parafine Gömülü
FZD	Frizzled
GSK-3	Glikojen Sentez Kinaz 3
H&E	Hematoksilen ve Eozin
KKH	Kord Kapiller Hemanjiyom
LRP	LDL Reseptörüyle İlişkili Protein
PP2A	Protein Fosfataz 2A
S33	33. Serin Amino Asidi
S37	37. Serin Amino Asidi
S45	45. Serin Amino Asidi
SANT	Sklerozan Anjiomatoid Nodüler Transformasyon
T41	41. Treonin Amino Asidi
3'UTR	3' Translasyona Uğramayan Bölge

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kanonikal Wnt/ β -catenin sinyal yolağının çalışma mekanizmasının şematik gösterimi	6
2.2. β -catenin'in Moleküler Yapısı	10
2.3. β -catenin'in bağlanma partnerleri ile ilişkisinin şematik gösterimi	11
2.4. <i>CTNNB1</i> mutasyonlarının protein düzeyinde etkilediği bölgelere göre dağılımının ve mutasyon tiplerinin şematik görünümü	14
2.5. Kolorektal kanserle ilişkili sinyal yolaklarının ve genetik değişikliklerin şematik gösterimi	16
2.6. β -catenin N-terminal bölge değişikliklerinin immünohistokimyasal boyama ile saptanması	18
4.1. Olgu 1'e ait H&E ve immünohistokimyasal boyama (CD31, CD34, CD8) görüntüsü	34
4.2. SANT olgularının anti-aktif β -catenin ve anti- β -catenin antikoları ile immünohistokimyasal olarak boyanması	36
4.3. Olgu 1, 2 ve 3'e ait <i>CTNNB1</i> ekzon 3 sekans sonucu	37
4.4. SANT olgularına ait genomik DNA'da <i>CTNNB1</i> ekzon 3 delesyonu analizi	38
4.5. Olgu 1 ve 3'te fark edilen kısa PZR ürününe ait Sanger sekans analizi sonucu	39
4.6. SANT olgularına ait cDNA'da <i>CTNNB1</i> ekzon 3 delesyonu analizi	40
4.7. Olgu 7'de tespit edilen kısa PZR ürünlerine ait Sanger sekans analizi sonucu	40
4.8. Yedi SANT olgusuna ait genomik DNA ve/veya cDNA örneklerinde PZR ve Sanger sekans analizi sonucunda tespit edilen tüm genetik değişiklikler	42
4.9. <i>CTNNB1</i> ekzon 3 bölgesi DNA/RNA düzeyinde değişiklik göstermeyen olgularda mutant β -catenin boyanma desenini açıklamak için iki hipotez	44
4.10. İmmünohistokimyasal fosfo- β -catenin boyaması	46
4.11. Kolorektal kanser olgularının nükleer fosfo- β -catenin boyanma kuvvetine göre skorlanması	47

4.12. Kolorektal kanser olgularında nükleer ve sitoplazmik fosfo- β -catenin'in boyanma şiddetine göre yapılan skorumu sonucu	48
4.13. DMD-5'in β -catenin ve aktif β -catenin antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucu	49
4.14. K12C78 kodlu kolorektal kanser olgusuna ait β -catenin, aktif β -catenin ve fosfo- β -catenin immünohistokimyasal boyaması	50
4.15. K12A78 kodlu kolorektal kanser olgusuna ait β -catenin, aktif β -catenin ve fosfo- β -catenin immünohistokimyasal boyaması	51
4.16. Normal kolon dokusunun β -catenin ve fosfo- β -catenin antikoru ile yapılan immünofloresan boyama sonucu	52
4.17. Kolon kanseri dokusunun farklı β -catenin antikoru ile yapılan immünofloresan boyama sonucu	53
4.18. Kolon kanseri dokusunun farklı β -catenin antikoru ile yapılan western blot analizi sonucu	54
4.19. Farklı kolorektal kanser olgularının β -catenin ve aktif β -catenin antikoru ile yapılan western blot analizi	55
4.20. Farklı kolorektal kanser olgularında ekzon 3 mutasyonlarının genomik DNA ve cDNA düzeyinde incelenmesi	56
4.21. Fosfo- β -catenin ifadesinin kolorektal kanser olgularında sağkalıma etkisi	57

TABLULAR

Tablo	Sayfa
3.1. DMD-5'teki hasta doku örneklerinin yerleşimi	23
3.2. Primerler ve DNA sekansları	26
3.3. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan antikor dilüsyonları ve antijen geri kazanımı koşulları	28
4.1. SANT olgularının klinik ve patolojik özellikleri	32
4.2. Doku mikrodizinindeki 185 kolorektal kanser hastası örneğinin klinik ve patolojik özellikleri	45

1. GİRİŞ

Wnt sinyal yolağı, erken embriyogenezden başlayarak canlı gelişiminin hemen her aşamasında görev alan evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yolağıdır. Morfogenezin temeli olan hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve polarizasyonunu kontrol eden Wnt sinyal yolağı; erişkin hayatta da kök hücre havuzunu düzenleyerek doku mimarisinin korunmasını sağlamaktadır (1). Canlılığın devamı için vazgeçilmez olan süreçleri yönetmesi nedeniyle, sinyal yolağının doğru çalışmasını etkileyecek değişiklikler başta kanser olmak üzere geniş bir hastalık spektrumuna neden olmaktadır (2).

Wnt sinyal yolağının merkezinde transkripsiyon koaktivatörü olarak fonksiyon gösteren β -catenin yer almaktadır. β -catenin'in hücre içindeki yerleşimi ve hücre içi seviyesi sinyal yolağının aktivite düzeyini belirlemektedir. Bu nedenle hücre içi β -catenin dengesi, yıkım kompleksi adı verilen özel bir multimerik protein kompleksinin başlattığı fosforilasyon-ubikitinasyon-proteozomal yıkım mekanizması ile sağlanmaktadır (3). *CTNNB1* geni tarafından kodlanan β -catenin; N-terminal, C-terminal ve armadillo tekrar bölgesi olmak üzere üç farklı bölgeden oluşmaktadır. β -catenin'in N-terminal bölgesi, yıkım kompleksi proteinleri tarafından tanınan ve fosforile edilen serin/treonin amino asit dizisini içermektedir. Bu özel amino asit dizisi genin üçüncü ekzonu (ekzon 3) tarafından kodlanmaktadır ve neoplazi gelişimine neden olduğu bilinen *CTNNB1* mutasyonlarının neredeyse tamamı bu ekzonda ortaya çıkmaktadır (4).

Araştırma grubumuz tarafından, β -catenin'in N-terminal bölgesini etkileyen *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının tespit edilmesini sağlayan immünohistokimya temelli bir yöntem tanımlanmıştır (5).

Bu tezde hedeflenenler; tanımladığımız immünohistokimya temelli yöntemi kullanarak, etiyolojisi henüz aydınlatılmayan neoplastik hastalıklarda *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının varlığını incelemek ve β -catenin'in N-terminal bölgesini etkileyebilecek post-translasyonel modifikasyonları araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Wnt Sinyal Yolağı

2.1.1. Wnt Sinyal Yolağına Giriş

Wnt sinyal yolağının tanımlanmasına yönelik çalışmalar, fare meme tümörü virüsü proviral DNA'sının genoma entegrasyonu sonucunda aktive olan potansiyel proto-onkogenlerin araştırılması ile başlamıştır. Nusse ve Varmus (6) tarafından yürütülen 1982 tarihli bu ilk çalışma, günümüzde Wnt1 proteinini kodladığını bildiğimiz *int1*'in keşfedilmesini sağlamıştır. Bu genin *Drosophila*'da tanımlanmış segment polarite genlerinden biri olan "*wingless (wg)*"ın homoloğu olduğunun gösterilmesiyle, *int1/wg*'ın hem morfogenezde görev aldığı hem de onkogen gibi davranabildiği fark edilmiştir (7–9). İlerleyen yıllarda yeni *int* genlerinin keşfedilmesiyle ortaya çıkan kavram kargaşasını yok etmek için *int1/wg* ailesine üye olan genlerin "*Wnt*" olarak adlandırılmasına karar verilmiştir (10).

Gelişim biyologları tarafından farklı model canlılar kullanılarak yapılan çalışmalar, Wnt sinyal yolağının canlı gelişimindeki görevlerinin ve çalışma mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına olanak tanımıştır. Sharma ve Chopra (7) tarafından tanımlanan *Drosophila* modelinde, *wg* mutasyonu taşıyan sineklerin kanat gelişiminde ve segment polarizasyonunda sorunlar olduğu fark edilmiştir. *Drosophila*'nın model canlı olarak kullanıldığı diğer çalışmalarda da *armadillo* (β -catenin'in *Drosophila* homoloğu), *porcupine*, *dishevelled* ve *dTCF* genlerinde mutasyon olan embriyoların; *wg* mutant *Drosophila* modeline benzer şekilde segment polarizasyon hataları olduğu gösterilmiştir ve bu genlerin Wnt sinyal yolağının parçası olduğunu ileri süren ilk model geliştirilmiştir (11–13).

Wnt sinyal yolağının vertebralı canlıların gelişiminde de görev aldığını gösteren ilk bulgular, *Xenopus* embriyolarında yapılan çalışmalar ile elde edilmiştir. Fare *Wnt1* mRNA'sını *Xenopus* embriyolarına enjekte eden McMahon ve Moon (14), bu embriyolarda eksen duplikasyonunun ortaya çıktığını gözlemlemiştir. Eksen duplikasyon deneyi olarak bilinen bu yöntem sayesinde Wnt sinyal yolağının vertebralı canlılarda da evrimsel olarak korunduğu anlaşılmıştır, aynı zamanda bu

yöntemin vertebralı canlılarda Wnt sinyal yolağı elemanlarının araştırılabilmesi için kullanışlı olduğu fark edilmiştir.

Fare genomunda homolog rekombinasyonla gene spesifik mutasyonların yapılabilmesinin imkanı hale gelmesiyle farklı *Wnt* genlerinde fonksiyon kaybı mutasyonu taşıyan fare modelleri geliştirilmiştir (15). Birbirinden oldukça farklı fenotiplerin ortaya çıktığı bu fare modelleri sayesinde, tek bir *Wnt* genindeki fonksiyon kaybının vertebralı canlı gelişimine yaptığı büyük etki açıkça gözlenmiştir (16–18). Model canlılarda yapılan çalışmalar ışığında, Wnt sinyal yolağının hücre kaderinin belirlenmesinde ve hücre polarizasyonunun sağlanmasında görev alarak embriyogenezi düzenlediği anlaşılmıştır (19).

Wnt sinyal yolağının görevi yalnızca embriyogenez sırasındaki biyolojik süreçleri yönetmekle sınırlı olmayıp; bağırsak, saç folikülü ve hematopoetik sistem gibi farklı erişkin dokularındaki kök hücre havuzunun devamlılığını da sağlamaktır (20). Wnt sinyali ile kök hücre havuzu arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, Wnt sinyal iletiminden sorumlu proteinlerden biri olan Tcf4'ün yokluğunda bağırsak kök hücre havuzunun tamamen kaybolduğu ve doku mimarisinin bozulduğu gösterilmiştir (21). Bu sonucu destekleyen bir başka çalışmada ise, insan R-spondin 1'i ifade eden transgenik farelerde bağırsak ve kolon epitelinin aşırı çoğaldığı gözlenmiştir. R-spondin ailesi proteinler, Wnt reseptörlerinin ubiquitinasyonunu ve proteozomal yıkımını engelleyerek Wnt sinyal yolağı aktivitesini desteklemektedir. Bu nedenle Wnt agonisti olan insan R-spondin 1'in transgenik farelerde ifade edilmesi, bağırsak ve kolon kök hücre havuzunda Wnt yolağı hiperaktivasyonuna neden olmuştur (22,23). Bu çalışmaların yanı sıra, Wnt hedef genlerinden biri olan *Lgr5*'in çok sayıda erişkin dokuda kök hücre belirteci olarak kullanılabileceğinin fark edilmesi, Wnt sinyal yolağı ile kök hücre havuzu arasındaki ilişkiye yönelik önemli bir kanıt oluşturmuştur (24).

Wnt sinyal yolağı ile ilgili en önemli gelişmelerden biri 1990'ların başında kanser genetiği alanında yaşanmıştır. Herediter kanser sendromlarından biri olan Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) otozomal dominant kalıtılan, genç hasta popülasyonunu etkileyen ve kolonda çok sayıda polip ile karakterize olan kolon kanseri yatkınlık sendromlarından biridir. FAP'a neden olan genomik değişikliği

tanımlamak için yapılan çalışmalar sonucunda, *Adenomatöz Polipozis Koli (APC)* adı verilen büyük bir gende ortaya çıkan *nonsense* ve çerçeve kayması mutasyonların FAP'la ilişkili olduğu gösterilmiştir (25,26). Rubinfeld ve ark. (27)'nin yaptığı çalışmada ise APC'nin, *Drosophila*'da Wnt sinyal iletim elemanı olan *armadillo*'nun insan homologu β -catenin'e bağlandığı gösterilmiştir ve bu çalışma ile Wnt sinyal yolağının kanser gelişimiyle ilişkili olabileceğini düşündüren ilk kanıt elde edilmiştir. Wnt sinyal iletiminde görev alan yeni genlerin tanımlanmasıyla bu sinyal yolağının kanserle ilişkisi daha iyi anlaşılmıştır. Günümüzde Wnt sinyal yolağının aşırı aktivasyonu ile sonuçlanan genetik ve epigenetik değişikliklerin neoplastik dönüşüme neden olduğu iyi bilinmektedir (28).

Gelişimsel biyoloji ve kanser genetiği alanındaki çalışmaların katkılarıyla günümüzde kabul edilen Wnt sinyal yolağı modeli oluşturulmuştur. Şu anda Wnt reseptörleri aracılığıyla aktifleşen üç farklı sinyal yolağı olduğu düşünülmektedir: kanonikal Wnt/ β -catenin yolağı, planar hücre polaritesi yolağı ve Wnt/ Ca^{2+} yolağı (29,30). Bu üç Wnt sinyal yolağı arasından üzerinde en fazla çalışılan, bu nedenle çalışma mekanizması en iyi tanımlanmış olanı kanonikal Wnt/ β -catenin yolağıdır.

2.1.2. Kanonikal Wnt/ β -catenin Sinyal Yolağının Çalışma Mekanizması

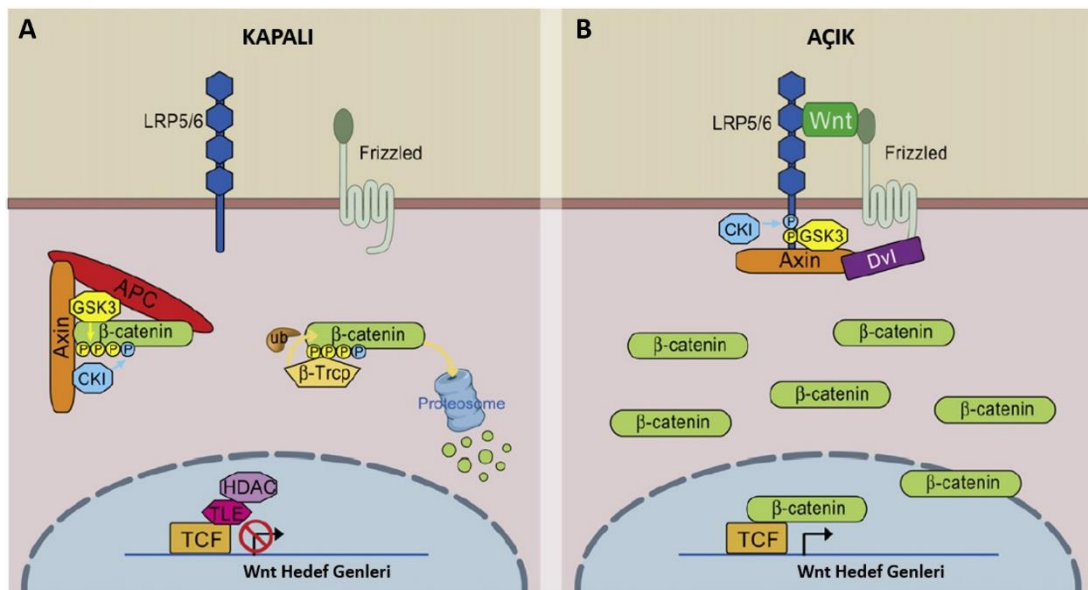
Int1'in keşfinin üzerinden geçen 40 yıl içerisinde, Wnt sinyal yolağının parçası olan proteinlerin tanımlanabilmesi ve yolağın temel çalışma prensiplerinin aydınlatılabilmesi için yoğun çaba sarf edilmiştir (31). Biyolojik sistemlerdeki kritik görevleri nedeniyle aktif bir şekilde araştırılmaya devam eden üç Wnt yolağı içerisinde sadece kanonikal Wnt/ β -catenin yolağı için genel kabul gören bir çalışma modeli oluşturulabilmiştir. Wnt araştırmacıları tarafından öne sürülen bu modele göre sinyal yolağının merkezinde yer alan β -catenin'in hücre içerisindeki yerleşimi ve hücre içi seviyesi, bu yolağın aktivite durumunu belirlemektedir. Bu nedenle hücre içi β -catenin dağılımı ve düzeyi çeşitli hücre içi mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (32).

Kanonikal Wnt/ β -catenin yolağı, diğer tüm sinyal yollarında olduğu gibi, ligand-reseptör etkileşimi ile aktifleşmektedir. Bugüne kadar memeli genomunda

Wnt protein sentezinden sorumlu 19 ayrı *WNT* geni tanımlanmıştır. Bu genler tarafından sentezlenen Wnt proteinleri ekstraselüler alana salınmadan önce matürasyonlarını tamamlamak için bir dizi post-translasyonel modifikasyona uğramaktadır. Endoplazmik retikulumda sırasıyla palmitoleik asit ve N-bağlı oligosakkaritlerin eklenmesiyle aktifleşen Wnt proteinlerinin direk olarak ekstraselüler boşluğa bırakıldığı düşünülmektedir (33). Hidrofobik yapısı nedeniyle suda çözünemeyen ve bu nedenle kısa hareket mesafesine sahip bu proteinlerin, komşu hücre reseptörüne nasıl bağlandığını açıklayabilecek alternatif hipotezler geliştirilmiştir. Bazı çalışmalarda, Wnt proteinlerinin eksozom ve lipoprotein kompleksleri gibi ekstraselüler partiküller aracılığıyla uzun mesafeler boyunca taşınarak komşu hücre reseptörüne ulaştırılabileceği gösterilmiştir (34,35). Öne sürülen bir diğer hipotezde ise Wnt proteinlerinin filopod gibi aktin temelli hücre uzantıları yardımıyla komşu hücrelere sunulabileceği belirtilmiştir (36).

Ekstraselüler alanda bulunan Wnt proteinleri, G-protein bağlı reseptörlere benzeyen ve yedi transmembran alfa heliksten oluşan Frizzled (FZD) ailesi reseptörlere bağlanmaktadır. Memeli genomunda bugüne kadar FZD reseptörlerini kodladığı gösterilen 10 farklı *FZD* geni tanımlanmıştır. Bu protein ailesi temel WNT reseptörleri olarak kabul edilmesine rağmen hangi Wnt proteinlerinin hangi FZD reseptörüne özgül olduğu henüz anlaşılamamıştır. Ekstraselüler alana salınan Wnt proteinleri, FZD reseptörlerinde yer alan ve sisteinden zengin bölge (CRD) adı verilen evrimsel olarak korunmuş büyük bir ekstraselüler bölgeye bağlanmaktadır (37). Wnt proteinlerinin CRD'ye bağlanma mekaniğini inceleyen bir çalışmada, *Xenopus* Wnt8 (XWnt8)'in parmak benzeri uzantıları yardımıyla fare Fzd8 reseptörüne ait CRD'yi "kavradığı" ve bu sayede Wnt ligand-reseptör kompleksini oluşturduğu gösterilmiştir (38). Wnt proteinlerine yüksek afinite ile bağlanan FZD reseptörleri, hücre içi sinyalizasyonu başlatabilmek için koreseptörlere de ihtiyaç duymaktadır. Hücre yüzeyinde yer alan koreseptörler hem Wnt proteinlerine hem de FZD reseptörlerine bağlanarak reseptör-ligand kompleksini güçlendirmekten ve bu sayede hücre içi sinyal iletiminin sağlanmasından sorumludur. LDL Reseptörüyle İlişkili Protein (LRP) ailesine üye olan LRP5, LRP6 ve bu proteinlerin *Drosophila* homologu arrow;

kanonikal Wnt/ β -catenin yolağında görevli olan temel koreseptörlerdir. Günümüzde kabul edilen güncel yaklaşıma göre ekstraselüler Wnt proteinlerinin FZD reseptörlerine bağlanması, FZD reseptörü ile LRP ailesi koreseptörlerin heterodimerizasyonunu sağlamakta ve bu sayede hücre membranından başlayarak nükleusta sonlanacak olan hücre içi sinyal iletim kaskadını aktifleştirmektedir (39–41). Wnt araştırmacıları tarafından kabul edilen mevcut modele göre kanonikal Wnt/ β -catenin yolağı, ligand-reseptör etkileşiminin olup olmamasına göre “KAPALI” veya “AÇIK” olarak adlandırılan iki farklı durumda bulunabilmektedir (**Şekil 2.1.**).



Şekil 2.1. Kanonikal Wnt/ β -catenin sinyal yolağının çalışma mekanizmasının şematik gösterimi: A) KAPALI konumda B) AÇIK konumda. (MacDonald, BT ve ark. (32)'ndan alınmıştır.)”

Ekstraselüler alanda Wnt ligandının olmadığı “Wnt KAPALI” durumda, sinyal yolağının merkezinde yer alan β -catenin proteini sırasıyla fosforilasyon ve ubiquitinasyon basamaklarını takip ederek proteozomal yıkıma uğramaktadır. Hücre içi β -catenin düzeyinin düşük tutulmasını sağlayan bu yıkım süreci, β -catenin’in nükleusta birikmesini engelleyerek Wnt hedef genlerinin ifade edilememesine neden olmaktadır. β -catenin, yıkım kompleksi olarak isimlendirilen özel bir multiprotein kompleks aracılığıyla yıkılmaktadır. Bu kompleksin temel olarak 6 farklı proteinden oluştuğu kabul edilmektedir. Bunlar serin/treonin kinazlar Kazein Kinaz 1 (CK1) ve Glikojen Sentez Kinaz 3 (GSK-3), iskele proteinler APC ve AXİN, bir E3 ubiquitin ligaz

olan β -TrCP ve Protein Fosfataz 2A (PP2A)'dır (3). β -catenin'in yıkım kompleksi elemanlarına bağlanma mekanizması ve yıkım sürecinin aşamaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da genel olarak kabul edilen bir çalışma modeli oluşturulmuştur (42).

İlk olarak, sentezlenen sitoplazmik β -catenin proteinleri sırasıyla iskele proteinleri AXIN ve APC'ye bağlanmaktadır. Bu proteinlerin ana görevi β -catenin'in N-terminal bölgesini CK1'in yakınına konumlandırarak fosforilasyon sürecini desteklemektir. Esnek ve hareketli bir yapıya sahip olan N-terminal bölgenin CK1 ile etkileşimi, fosforilasyon kaskadının başlaması için gerekli olan 45. serin (S45) amino asidinin fosforilasyonunu tetiklemektedir. Yıkım kompleksinde yer alan bir diğer serin/treonin kinaz olan GSK-3, fosforile formdaki S45'i tanıyarak sırasıyla 41. treonin (T41), 37. serin (S37) ve 33. serin (S33) amino asitlerini fosforile etmektedir (43–45). Bu fosforilasyon işleminin temel hedefi, β -catenin'in ubiquitinasyonu için gerekli olan kritik amino asit motifini oluşturmaktır. SCF ubiquitin ligaz kompleksinin parçası olan β -TrCP tarafından tanınan bu özel motif, fosforile formdaki S33 ve S37 amino asitlerini içermektedir (46). N-terminal fosforilasyonu tamamlanmış olan ve β -TrCP tarafından tanınan β -catenin proteinleri, poliubikitin zincirleri eklenerek 26S proteozomal yıkım kompleksine yönlendirilmektedir (47). N-terminal fosforilasyonun düzenlenmesinde görev aldığı gösterilen bir diğer protein ise bir serin/treonin fosfataz olan PP2A'dır (48). β -catenin'in N-terminal bölgesini çevreleyen iskele proteinlerinin yokluğunda PP2A'nın, S33/S37 amino asitlerini defosforile ederek β -TrCP tanıma motifini yok ettiği bildirilmiştir (49).

Sitoplazmik β -catenin düzeyinin proteozomal yıkım sonucunda azalması, β -catenin'in nükleusta birikmesine engel olmaktadır. Transkripsiyon faktörü koaktivatörü olduğu gösterilen nükleer β -catenin'in temel görevi, TCF/Lef ailesine üye olan proteinler başta olmak üzere çok sayıda transkripsiyon faktörüne bağlanarak Wnt hedef genlerinin ifadesini uyarmaktır. Nükleer β -catenin'in yokluğunda korepresör proteinlere afinitesi artan TCF/Lef transkripsiyon faktörleri, bu proteinlere bağlanarak transkripsiyonel represyon kompleksini oluşturmaktadır ve Wnt hedef genlerinin ifadesini inhibe etmektedir (50–52).

Ekstraselüler alanda Wnt proteinlerinin bulunduğu “WNT AÇIK” durumda, Wnt proteinleri FZD reseptörlerine bağlanarak, FZD reseptörleri ile LRP5/6 koreseptörlerinin heterodimerizasyonunu uyarılmaktadır. Wnt proteini, FZD reseptörü ve LRP5/6 koreseptöründen oluşan ligand-reseptör kompleksinin görevi, sitoplazmada yer alan Dishevelled (DVL) isimli fosfoproteini hiperfosforile ederek bu proteinin reseptör kompleksi çevresinde kümelenmesini sağlamaktır. Klasik Wnt aktivasyon modeline göre hiperfosforile formdaki DVL, sitoplazmada serbest halde bulunan AXİN’i hücre membranına doğru çekerek yıkım kompleksinin dağılmasına neden olmaktadır (53–55). Klasik aktivasyon modeline alternatif olarak çok sayıda farklı model öne sürülmesine rağmen biyolojik sistemlerde hangi modelin geçerli olduğu henüz bilinmemektedir. Tüm modellerde kabul edilen ortak yaklaşıma göre, yıkım kompleksinin inaktivasyonu sonucu N-terminal fosforilasyonu gerçekleştirilemeyen β -catenin proteini stabilize olarak önce sitoplazmada daha sonra da nükleusta birikmektedir (56). Nükleer β -catenin düzeyindeki artışla beraber oluşan TCF/Lef/ β -catenin transkripsiyon faktör kompleksi, genom üzerindeki spesifik DNA dizilerine bağlanarak Wnt hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatmaktadır (57).

2.2. β -catenin ve N-Terminal Bölge

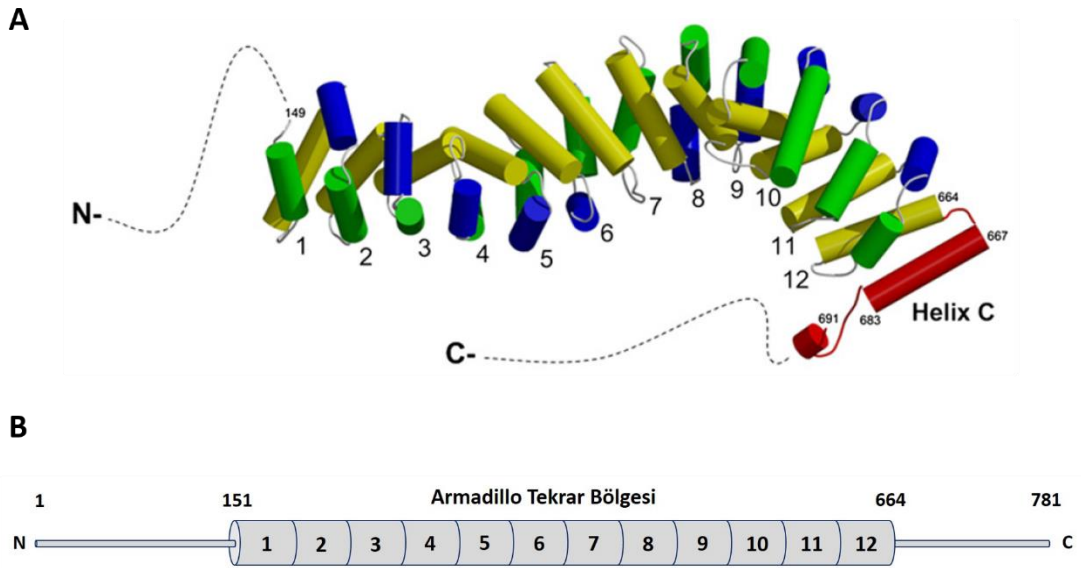
2.2.1. β -catenin’in Moleküler Yapısı ve Fonksiyonları

β -catenin’i ilk defa 1989 yılında tanımlayan Rolf Kemler ve ekibi, bu proteinin hücre adezyon molekülü olan E-Kaderin ile aktin hücre iskeletini birbirine bağlayan moleküler bir köprü olabileceğini öne sürmüştür (58). Daha sonra yapılan çalışmalarda β -catenin’in, Wingless yolağına (vertebrali canlılarda Wnt yolağı) ait bir protein olan *armadillo*’nun vertebrali canlılardaki homoloğu olduğu fark edilmiştir (59,60). Hücre adezyonunun ve Wnt sinyal yolağının düzenlenmesinden sorumlu olduğu bilinen β -catenin, günümüzde kabul edilen yaklaşıma göre hücre içerisinde iki farklı havuzda kümelenmektedir. Hücre adezyon sisteminin temel parçası olan β -catenin’in büyük bölümü E-kaderin’e bağlı olarak hücre membranında yer almaktadır. β -catenin’in küçük bir bölümü ise sitoplazmada serbest olarak bulunmakta ve Wnt/ β -catenin sinyal yolağının koaktivatörü olarak görev almaktadır. Multifonksiyonel bir

protein olan β -catenin'in hücre içi regülasyonu çok sayıda araştırmaya konu olsa da, β -catenin'in bu iki havuz arasında nasıl geçiş yaptığı henüz bilinmemektedir (61).

β -catenin, 3. kromozomun kısa kolunda (3p21) yer alan ve 16 ekzondan oluşan *CTNNB1* tarafından kodlanmaktadır (62,63). Bu genden sentezlenen RNA transkriptinin farklı 3' UTR uzunluğuna sahip üç izoformunun olduğu bildirilmiştir. Hücre içi yarı ömrü birbirinden farklı olan bu üç izoformun ifade düzeyindeki farklılıkların Wnt sinyal yolağının kontrolünde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (64).

β -catenin, 12 üyeden oluşan katenin ailesi proteinlerin ilk keşfedilen ve en çok çalışılan üyelerinden bir tanesidir (65). Bu protein birden fazla görevi yerine getirebilme yeteneği nedeniyle özel bir moleküler yapıya sahiptir (**Şekil 2.2.**). Üç boyutlu yapısı incelendiğinde β -catenin'in üç ana bölümden oluştuğu görülmektedir: N-terminal bölge, armadillo tekrar bölgesi ve C-terminal bölge. Proteinin merkezinde yer alan armadillo tekrar bölgesi, β -catenin'in evrimsel olarak en iyi korunmuş ve en stabil bölgesidir. Bu bölge, üçgen konfigürasyonunda dizilmiş üç alfa heliksten oluşan 12 armadillo tekrar motifine sahiptir. Bu motifler bir süperheliks yapısı oluşturacak şekilde sıralanmakta ve β -catenin'in bağlanma partnerleri ile etkileşiminde görev alan pozitif yüklü uzun bir girinti oluşturmaktadır (66,67). β -catenin'in bağlanma partnerleri olan Wnt sinyal yolağı elemanları ve hücre adezyon molekülleri genellikle armadillo tekrar bölgesi ile etkileşime girmektedir. Bu nedenle bu bölge, β -catenin'in hücre içi fonksiyonlarının büyük kısmını yürütmekten sorumludur (68–70). *CTNNB1*'de görülen mutasyonlardan bazılarının armadillo tekrar motiflerini de etkilediği bildirilmiştir. Bu mutasyonların β -catenin'in bağlanma partnerleri ile etkileşimini engelleyerek neoplastik dönüşüme neden olabileceği gösterilmiştir (71,72).



Şekil 2.2. β -catenin'in Moleküler Yapısı:

- A) β -catenin'in moleküler yapısının üç boyutlu görünümü
 B) β -catenin'in moleküler yapısının iki boyutlu şematik görünümü.
 (Gottardi, CJ ve Peifer, M (73)'dan alınmıştır.)

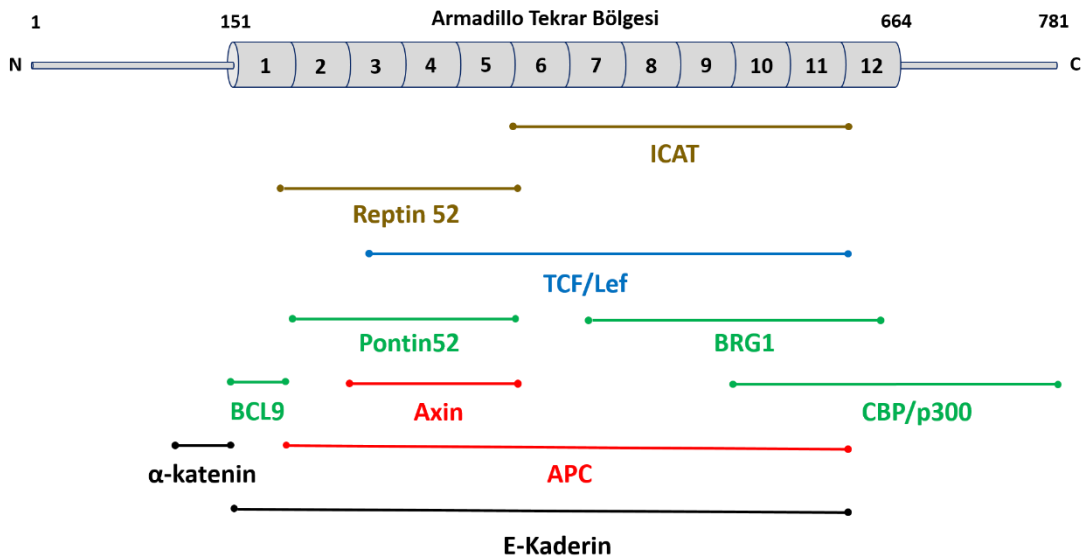
β -catenin'in iki ucunda yer alan N- ve C-terminal bölgeler, armadillo tekrar bölgesinden farklı olarak daha esnek ve hareketli bir yapıya sahiptir. Bu yapısal özellikleri sayesinde armadillo motifleriyle dinamik olarak etkileşebilen terminal bölgeler, hem Wnt sinyal iletiminde hem de hücre adezyonunda görev almaktadır (74–76). β -catenin'in son 120 amino asitlik kısmını oluşturan C-terminal bölge, β -catenin'le kompleks oluşturduğu bilinen çok sayıda transkripsiyon aktivatörü ve inhibitörüne bağlanarak Wnt sinyal yolağını düzenlemektedir (77). Aynı zamanda bu bölgenin, hareketli yapısı sayesinde armadillo tekrar motifleri üzerine katlandığı ve E-kaderin-AXİN gibi β -catenin bağlanma partnerleri ile etkileşimini kontrol edebildiği öne sürülmüştür (78–80). Yakın zamanlı bazı çalışmalarda ise C-terminal bölgenin β -catenin'in nükleusa geçişinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (81,82).

2.2.2. β -catenin N-Terminal Bölgenin Moleküler Yapısı ve Fonksiyonları

N-terminal bölge β -catenin'in ilk 150 amino asitlik bölümünü oluşturmaktadır. β -catenin'in moleküler yapısının incelendiği kristalografi çalışmalarında, esnek ve hareketli bir yapıya sahip olan N-terminal bölgenin tamamını gösteren üç boyutlu bir model elde edilememiştir. Dinamik moleküler yapısının yanı sıra yüksek bir negatif

yüke sahip olan N-terminal bölgenin, armadillo tekrar bölgesinde yer alan pozitif yüklü girintiyle aktif olarak etkileştiği düşünülmektedir (74). Bu zayıf ve özgül olmayan etkileşimin, AXİN ve APC gibi bazı proteinlerin β -catenin'e bağlanmasını engelleyebileceği öne sürülmüştür (83). N-terminal bölge, armadillo tekrar bölgesine kıyasla evrimsel olarak daha az korunmuş olmasına rağmen β -catenin'in iki temel fonksiyonu olan hücre adezyonu ve Wnt sinyal iletiminde görev almaktadır.

Kaderin-katenin adezyon kompleksinin parçası olan β -catenin, E-kaderin'in sitoplazmik kısmı ile α -catenin'i birbirine bağlayan moleküler bir köprü gibi davranmaktadır (84). β -catenin'le etkileşime giren proteinlerin büyük bölümü armadillo tekrar bölgesine bağlanırken, α -catenin bağlanma bölgesi N-terminal bölgede 120. ve 150. amino asitler arasında yer almaktadır (85) (**Şekil 2.3.**). Bush ve ark. (86) tarafından gerçekleştirilen yakın zamanlı bir çalışmada, N-terminal bölgenin "dil" benzeri esnek bir katlanma yaparak α -catenin'e bağlandığı gösterilmiştir. Bu çalışma ile N-terminal bölgenin, E-kaderin/ β -catenin/ α -catenin kompleksinin bir araya gelmesini dinamik olarak modüle edebildiği ve hücre adezyon sisteminin önemli bir bileşeni olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2.3. β -catenin'in bağlanma partnerleri ile ilişkisinin şematik gösterimi.

Kahverengi transkripsiyon represörlerini, *mavi* transkripsiyon faktörünü, *yeşil* transkripsiyon koaktivatörlerini, *kırmızı* yıkım kompleksi proteinlerini, *siyah* adezyon proteinlerini belirtmektedir. (Trautmann, M ve ark. (87)'ndan alınmıştır.)

N-terminal bölgenin Wnt sinyal iletiminin kontrolünde de önemli görevleri bulunmaktadır. Aktif Wnt sinyal yolağında sitoplazmadan nükleusa geçen β -catenin'in, Wnt hedef genlerinin ifadesini uyarabilmesi için çeşitli transkripsiyon faktörlerine ve koaktivatörlere bağlanması gerekmektedir. Bu koaktivatörlerden biri olan BCL9, β -catenin'in N-terminal bölgesi ile birinci armadillo motifi arasında kalan amino asit dizisine bağlanmaktadır (88). *Drosophila*'da segment polarizasyonundan sorumlu genlerden biri olan *legless*'in vertebralı canlılardaki homologları olan BCL9 ve BCL9L'nin β -catenin aracılıklı transkripsiyonda görev aldığı bilinmektedir (89,90). Brembeck ve ark. (90) tarafından yapılan çalışmada BCL9L'nin, hücre membranında bulunan β -catenin'i adezyon kompleksinden ayırarak proteinin nükleusa geçişini sağladığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, N-terminalde bölgede yer alan 142. tirozin amino asitinin (Tyr142) fosforilasyonunun, β -catenin- α -catenin kompleksini dağıtarak BCL9L ile kompleks oluşturmasını desteklediği öne sürülmüştür. Fizyolojik görevlerinin yanı sıra proto-onkogen olduğu gösterilen BCL9 ve BCL9L'nin, β -catenin/TCF kompleksini desteklediği ve bu sayede neoplastik hücrelerin proliferatif ve metastatik potansiyelini artırdığı bildirilmiştir (91,92). Hepatoselüler karsinom ve kolorektal kanser gibi Wnt sinyal yolağı bozuklarının sıklıkla tespit edildiği neoplazilerde BCL9/BCL9L'nin ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Bu neoplazilerde BCL9- β -catenin kompleksinin oluşmasını engelleyecek moleküler yöntemlerin etkili bir tedavi opsiyonu olabileceği düşünülmüştür (93–95).

N-terminal bölgenin biyolojik sistemlerdeki fonksiyonlarını araştırmak için N-terminal bölgesi olmayan mutant β -catenin varyantlarının hücre hatlarına transfekte edildiği çeşitli *in vitro* deney düzenekleri kullanılmaktadır (75). N-terminal bölgenin β -catenin aracılıklı transkripsiyondaki görevini inceleyen bazı çalışmalarda, "N-terminal transaktivasyon bölgesi" adı verilen ve β -catenin'in transkripsiyon faktörlerine bağlanma dinamiğini kontrol eden özel bir bölge olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgeye sahip olmayan β -catenin varyantlarının hücre hatlarına transfeksiyonu sonrasında Wnt sinyal yolağı aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (96,97).

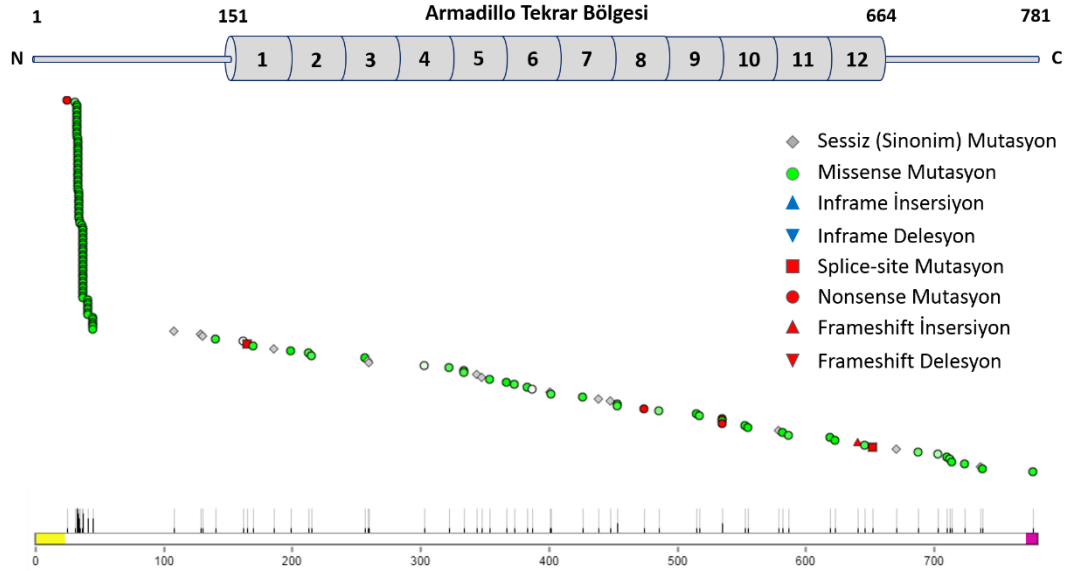
N-terminal bölgenin en iyi tanımlanmış fonksiyonu sitoplazmik β -catenin miktarının ve hücre içi dağılımının kontrolüdür. N-terminal bölge bu işlevini yerine

getirmesini sağlayan evrimsel olarak korunmuş dört serin/treonin amino asiti (S33, S37, T41, S45) taşımaktadır. Daha önce bahsedildiği üzere, Wnt sinyal yolağının “KAPALI” olduğu durumda, serin/treonin kinazlar tarafından sıralı olarak fosforile edilen bu amino asitler β -TrCP için bir tanınma motifi oluşturmaktadır. N-terminal bölgeden fosforile olan β -catenin (fosfo- β -catenin) poliubikutin zincirlerinin eklenmesinin ardından 26S proteozom kompleksi tarafından yıkılmaktadır (98). Sonuç olarak N-terminal bölge, sahip olduğu serin/treonin amino asit dizisi sayesinde Wnt sinyal yolağının ana kontrol noktası konumundadır. Bu kritik amino asit dizisini etkileyen değişiklikler Wnt sinyal yolağının aşırı aktivasyonuna yol açarak başta kanser olmak üzere çok sayıda hastalığa neden olmaktadır.

2.2.3. β -catenin N-Terminal Bölgede Görülen Genetik Değişiklikler

CTNNB1 neoplastik hastalıklarda en sık mutasyona uğradığı gösterilen genlerden biridir. Bugüne kadar tanımlanmış mutasyonların tamamına yakını 16 ekzondan oluşan *CTNNB1*'in 3. ekzonunu etkilemektedir. Ekzon 3'n protein düzeyinde karşılık geldiği bölge β -catenin'in N-terminal'inde yer alan 5. ve 80. amino asitler arasındaki amino asit dizisidir. Bu nedenle ekzon 3' etkileyen mutasyonlar aynı zamanda N-terminal bölge mutasyonları olarak da isimlendirilmektedir. N-terminal bölge mutasyonlarının dağılımını incelendiğinde, mutasyonların 32. aspartik asit (D32) ile S45 amino asitleri arasında kalan bölgeyi etkilediği görülmektedir (**şekil 2.4.**). nceki bölümlerde bahsedildiği üzere bu bölge, β -catenin'in N-terminal fosforilasyonundan ve proteozomal yıkımından sorumludur. Bu amino asit dizisini etkileyen mutasyonlar β -catenin'in stabilizasyonuna neden olmakta ve proteinin önce sitoplazmada ardından da nükleusta birikmesine yol açmaktadır. Wnt sinyal yolağının devamlı aktivasyonu ile sonuçlanan β -catenin stabilizasyonunun neoplastik transformasyona neden olduğu artık iyi bilinmektedir (99,100). *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının büyük kısmını nokta mutasyonları oluşturmaktadır (101). Fakat son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda *inframe* delesyonların sıklığının da oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (102). N-terminal bölge mutasyonlarının ilk defa kolorektal kanser ve melanom hücre hatlarında tanımlanmasının ardından farklı dokulardan

köken alan pek çok neoplastik hastalıkta bu mutasyonların varlığı gösterilmiştir (103–105).



Şekil 2.4. *CTNNB1* mutasyonlarının protein düzeyinde etkilediği bölgelere göre dağılımının ve mutasyon tiplerinin şematik görünümü. (Lawrence ve ark. (106)'ndan alınmıştır.)

2.3. WNT/ β -catenin Sinyal Yolağı Mutasyonları ile İlişkili Neoplaziler

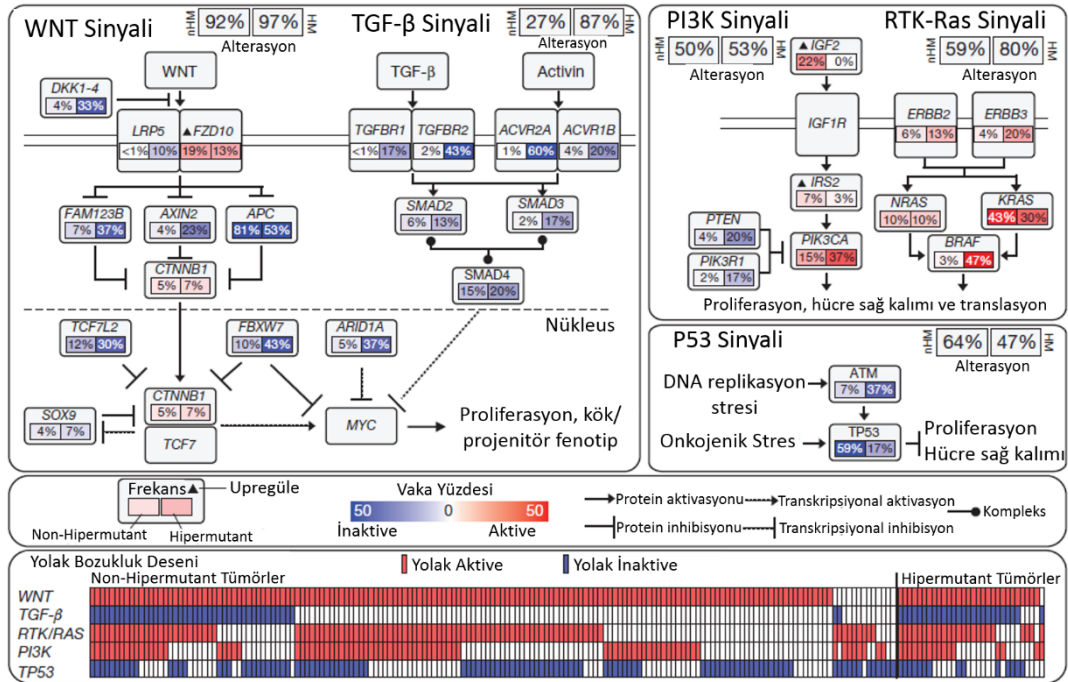
2.3.1. Hepatoselüler Karsinom

Hepatoselüler karsinom dünyada en sık tanı konulan beşinci kanser olup tüm karaciğer kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Hastaların büyük çoğunluğunda kronik karaciğer hastalığının geç dönem komplikasyonu olarak ortaya çıkan hepatoselüler karsinom, viral enfeksiyonlar ve yoğun alkol kullanımı gibi etiyolojik faktörlerle ilişkilidir (107). Etkin tedavi olanaklarının kısıtlı olması nedeniyle ileri evre hepatoselüler karsinom olguları yüksek mortaliteye sahiptir ve bu nedenle yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç bulunmaktadır. Yapılan yakın zamanlı çalışmalar sayesinde hastalığın patogenezinde rol oynayan sinyal yolağı bozuklukları daha iyi anlaşılmaya başlamıştır ve tedavide hedeflenebilecek yeni moleküller keşfedilmiştir (108). Hepatoselüler karsinomla ilişkisi en iyi tanımlanmış olan sinyal yolağı WNT/ β -catenin yolağıdır ve olguların %20-35'inde WNT yolağı hiperaktivasyonuna neden olan genetik ve/veya epigenetik bir değişiklik bulunmaktadır. Bu genetik

değişikliklerin büyük bölümünü β -catenin'in stabilizasyonuna ve nükleer birikimine neden olan *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonları oluşturmaktadır. Ekzon 3 mutasyon sıklığı vaka serilerine göre değişkenlik göstermekle birlikte tüm olguların yaklaşık %18'inde bulunduğu düşünülmektedir. Bu mutasyonların %75'ini nokta mutasyonları oluştururken, ekzon 3'ün silinmesine neden olan *inframe* delesyonların da oldukça sık olduğu gösterilmeye başlamıştır (109). *CTNNB1* mutasyonları ile hepatoselüler adenom/karsinom fenotipi arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, geniş *inframe* ekzon 3 delesyonlarının ve D32-S37 amino asit dizisini (β -TrCP tanıma motifini içeren bölge) etkileyen nokta mutasyonlarının daha malign bir fenotipe neden olduğu gösterilmiştir. Bunun aksine T41 ve S45 amino asitlerini etkileyen nokta mutasyonlarının orta-zayıf Wnt yolağı hiperaktivitesine yol açarak daha benign bir fenotiple ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (71). Boyault ve ark. (110) tarafından yapılan transkriptom analizi temelli çalışmada ise hepatoselüler karsinom olguları moleküler profillerine göre altı alt gruba ayrılmıştır ve *CTNNB1* mutasyonu taşıyan olgular G5-G6 alt grubu içerisinde sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmanın prognostik açıdan önemi henüz gösterilememiş olsa da WNT sinyal yolağını hedef alan potansiyel tedavi alternatiflerinin doğru hasta grubunda kullanılabilmesi için *CTNNB1* mutasyonlarının tespit edilebilmesi önem taşımaktadır (111). β -catenin yalnızca WNT sinyal yolağı ile ilişkili olmayıp karaciğer homeostazının sağlanmasında görevli pek çok sinyal yolağını da kontrol etmektedir (112). Michael ve ark. (113) 'nın yaptığı yakın zamanlı bir çalışmada *CTNNB1* mutasyonlarının glutamin bağımlı mTORC1 aktivasyonuna neden olabileceği ve bu nedenle mTORC1 inhibisyonu sayesinde *CTNNB1* mutant hepatoselüler karsinom olgularında tedavi yanıtı alınabileceği *in vivo* olarak gösterilmiştir. Sonuç olarak, hepatoselüler karsinom olgularında *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının etkin bir şekilde saptanabilmesi hastalığın doğru sınıflanmasına ve etkin tedavi stratejisinin belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

2.3.2. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser dünyada en sık tanı konulan üçüncü malignite olup kansere bağlı ölümlerde de ikinci sırada yer almaktadır (114). Kolorektal kanser olgularının büyük bölümü sporadik olmakla beraber %10'dan azı kalıtsal kanser sendromları ile ilişkilidir. Çok adımlı karsinogenez modeline göre, normal kolon epitelinin genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda önce benign bir öncül lezyon olan kolon adenomuna, ardından da kolorektal adenokarsinoma evrildiği düşünülmektedir (115). 2012 yılında kanser genom atlas projesi kapsamında, yüksek çıktılı sekanslama ve biyoinformatik analiz yöntemleri kullanılarak kolorektal kanserin detaylı moleküler karakterizasyonu yapılmıştır (**Şekil 2.5.**).

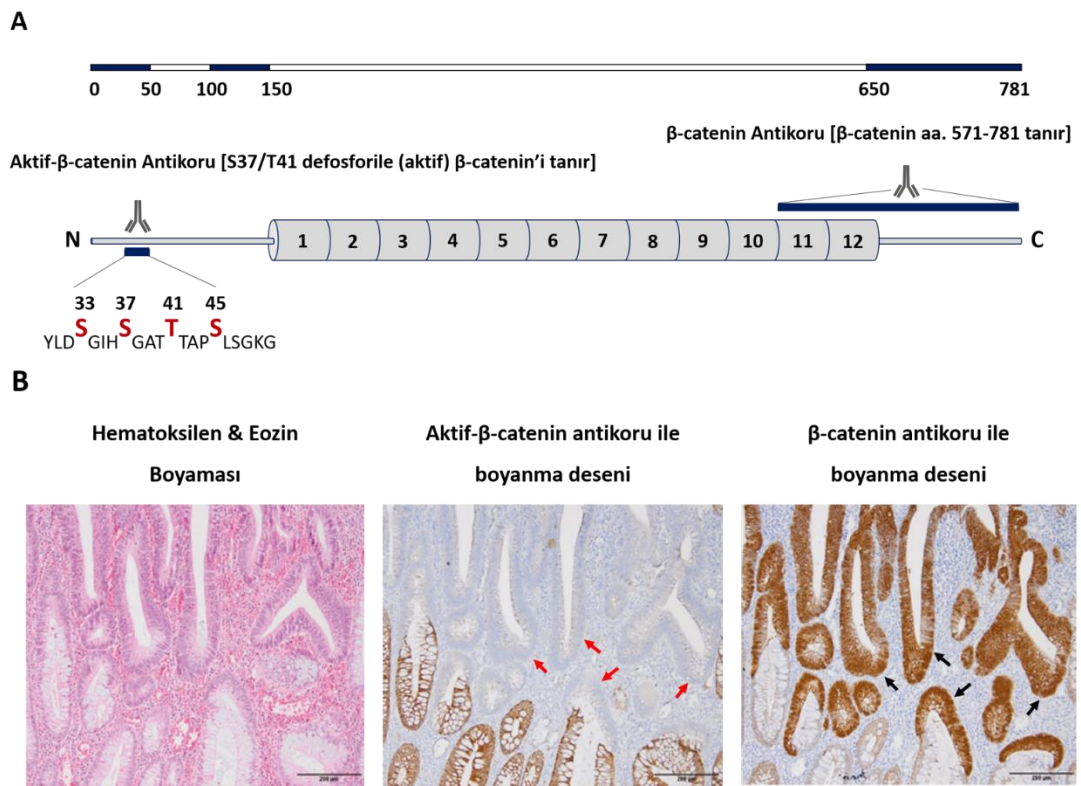


Şekil 2.5. Kolorektal kanserle ilişkili sinyal yollarının ve genetik değişikliklerin şematik gösterimi. Kırmızı renk aktive genleri, mavi renk inaktif genleri temsil etmektedir. (The Cancer Genome Atlas Network (116)'ndan alınmıştır.)

Bu kapsamlı çalışmanın sonucunda 5 sinyal yolağının hiper- veya hipoaktivasyonuna neden olan mutasyonların kolorektal kanser patogeneğinde kilit rol oynadığı gösterilmiştir. Bu sinyal yollarından biri olan WNT/ β -catenin yolağı, kolorektal kanser olgularının neredeyse tamamında hiperaktiftir ve kolon epitelinin neoplastik transformasyonundaki temel tetikleyici olduğu düşünülmektedir. En sık görülen Wnt/ β -catenin sinyal yolağı bozukluğunun APC'de görülen fonksiyon kaybı mutasyonları olduğu bilinmektedir. Sporadik kolorektal kanser olgularının yaklaşık %80'inde APC inaktivasyonuna neden olan somatik mutasyonlar bulunmaktadır. Wnt sinyal yolağı hiperaktivasyonuna neden olduğu bilinen bir diğer genetik değişiklik ise CTNNB1 mutasyonlarıdır (116). CTNNB1 mutasyonları kolorektal kanser olgularının yaklaşık %5'inde görülmekle birlikte bazı serilerde bu oran %8'e kadar çıkmaktadır (102,116). Bu mutasyonların büyük çoğunluğunu, diğer neoplazilerde olduğu gibi, CTNNB1 ekzon 3'ü etkileyen nokta mutasyonları oluşturmaktadır. Buna ek olarak metastatik kolorektal kanser olgularında görülen genomik değişikliklerin yüksek çıktılı sekanslama yöntemiyle değerlendirildiği yakın zamanlı bir çalışmada, ekzon 3 *inframe* delesyonlarının da oldukça sık olduğu belirlenmiştir (102).

Kanser genomunda ortaya çıkan değişikliklerin tespit edilebilmesi, kansere neden olan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır(117). Araştırma grubumuz tarafından, CTNNB1 ekzon 3 mutasyonlarının immünohistokimyasal olarak tespit edilmesine sağlayan bir yöntem tanımlanmıştır (**Şekil 2.6.**). Bu yöntemle göre, bir hastaya ait doku örneğinden iki farklı doku kesiti alınmaktadır ve her bir doku kesiti farklı bir β -catenin antikoru ile boyanmaktadır. Bu β -catenin antikorumlarından ilki defosforile durumdaki S33/T41 amino asitlerine bağlanarak yalnızca aktif formdaki β -catenin'i tanıyan "aktif β -catenin" antikordur. Diğer antikor ise β -catenin'in 571 ve 781. amino asitleri arasındaki diziyi tanıyan ve hücre içerisindeki tüm β -catenin havuzunu gösteren " β -catenin" antikordur. β -catenin antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda tümör alanında kuvvetli β -catenin birikimi (**siyah oklar**) görülmesine rağmen aktif β -catenin antikoru ile boyanan diğer doku kesitinden sinyal alınamaması (**kırmızı oklar**) "mutasyon deseni" olarak

adlandırılmaktadır ve bu hastada β -catenin N-terminal bölge değişikliği olduğunu göstermektedir. Aynı β -catenin proteinini tanıyan iki farklı antikor ile iki farklı görüntü elde edilmesinin nedeni, *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının aktif β -catenin antikorunun tanıdığı epitopun üç boyutlu yapısını değiştirmesi ve bu nedenle etkin bir antijen-antikor bağlanmasının gerçekleşmemesidir. Bu yöntem kullanılarak incelenen kolon adenomu örneklerinin %4,8'inde bahsedilen mutasyon deseni izlenirken, kolorektal kanser örneklerinde bu oranın %19,3'e çıktığı fark edilmiştir fakat bu belirgin oransal farkın nedeni henüz anlaşılamamıştır (5).



Şekil 2.6. β -catenin N-terminal bölge değişikliklerinin immünohistokimyasal boyama ile saptanması: A) β -catenin N-terminal bölge değişikliklerinin tespit edilebilmesi için iki farklı β -catenin antikoru kullanılmıştır. B) Bir hastaya ait kolon adenomu örneğinden alınan üç farklı doku kesiti hematoksilen & eozinle (H&E) histokimyasal olarak, aktif β -catenin ve β -catenin antikorları ile immünohistokimyasal olarak boyanmıştır. (Akyol ve ark. (5)'ndan alınmıştır.)

2.3.3. Medulloblastom

Serebellumun embriyonal tümörü olan medulloblastom en sık tanı konulan çocukluk çağı intrakraniyal malignitelerinden biridir (118). Kalıtsal kanser sendromlarına neden olan bazı *germline* mutasyonların medulloblastom ile ilişkili olduğunun gösterilmesinin ardından medulloblastomun genetik zemini daha iyi anlaşılmaya başlamıştır (119,120). Klinik, biyolojik ve genetik özellikler bakımından oldukça heterojen bir görünüm sergileyen medulloblastom olguları, son konsensüse göre “WNT medulloblastom (WNT-MB)”, “Sonic Hedgehog medulloblastom (SHH-MB)”, “Grup 3 medulloblastom” ve “Grup 4 medulloblastom” olmak üzere 4 alt gruba ayrılmıştır (121).

WNT sinyal yolağının hiperaktivasyonu ile karakterize olan WNT-MB alt grubu tüm medulloblastom olgularının yalnızca %10'luk bölümünü oluşturmasına rağmen güncel tedavi yöntemlerine en iyi cevap veren grup olarak bilinmektedir. Bu alt grubu oluşturan olguların yaklaşık %85-90'ının *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir. Bu mutasyonu taşımayan olguların büyük çoğunluğunda ise *APC* fonksiyon kaybı mutasyonlarının olduğu bildirilmiştir (122).

Medulloblastom olgularının moleküler sınıflaması prognoz tayini ve doğru tedavi stratejisinin seçimi için büyük önem taşımaktadır. Yüksek sağ kalım oranlarıyla karakterize olan WNT-MB olgularının tamamına yakınının *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonu taşıyıcısı olması, bu mutasyonları WNT-MB alt grubunun belirlenmesi için kritik bir belirteç yapmaktadır. *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının hızlı ve pratik bir şekilde saptanabilmesi için önerilen yöntemlerden biri, WNT yolağı aktivasyonunu gösteren nükleer β -catenin birikiminin incelenmesidir (123). Goschzik ve ark. (124) tarafından yapılan çalışmada, immünohistokimyasal olarak nükleer β -catenin birikimi tespit edilen olguların tamamına yakınında *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonu olduğu gösterilmesine rağmen bazı vakalarda herhangi bir WNT yolağı elemanında mutasyona rastlanmamıştır. Bu nedenle medulloblastom olgularında *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının tespit edilmesi için yeni stratejilere ihtiyaç bulunmaktadır.

2.3.4. Dezmoid Tümör ve Diğer Yumuşak Doku Tümörleri

Dezmoid tümör (veya diğer adıyla dezmoid-tip fibromatozis) monoklonal fibroblastik proliferasyon sonucunda ortaya çıkan, lokal infiltrasyon ile karakterize nadir bir yumuşak doku tümörüdür (125). Dezmoid tümörler “sporadik dezmoid tümör” ve “APC mutasyonu ile ilişkili dezmoid tümör” olmak üzere iki temel klinikopatolojik gruba ayrılmaktadır. Sporadik dezmoid tümör tüm olguların %85’ini temsil etmektedir ve neredeyse tamamında *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonu olduğu gösterilmiştir. *CTNNB1* mutasyonları ile ilişkili diğer neoplazilerden farklı olarak, dezmoid tümör olgularında bugüne kadar tespit edilen ekzon 3 mutasyonlarının tamamına yakını T41 veya S45 amino asitlerini etkileyen nokta mutasyonları oluşturmaktadır ve S32-S37 arasında kalan β -TrCP bağlanma motifi nadiren mutasyona uğramaktadır. APC mutasyonu ile ilişkili dezmoid tümörler ise olguların %10-15’ini oluşturmaktadır ve APC’de fonksiyon kaybına neden olan germline APC mutasyonu ile ilişkilidir (126). Genellikle kalıtsal kanser sendromu FAP zemininde gelişen bu alt grubun belirlenmesi, sendromik hastaların tespiti için büyük önem taşımaktadır. *CTNNB1* ve APC mutasyonlarının aynı tümör örneğinde bir arada bulunmadığı gösterilmiştir, bu nedenle *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonunun varlığı FAP’ı dışlayan bir belirteç olarak kullanılmaktadır (127). Bugüne kadar yapılan genom analiz çalışmalarında dezmoid tümör olgularının neredeyse tamamının WNT/ β -catenin sinyal yolağı hiperaktivasyonuna neden olan genetik değişikliklerle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Diğer sinyal yolaklarının hastalığın patogeneziindeki önemi henüz bilinmemektedir (128).

Yumuşak doku tümörleri, çok sayıda farklı tümör tipini içeren ve benzediği mezenkimal doku türüne göre sınıflanan heterojen bir tümör grubunu ifade etmektedir (129). WNT yolağı hiperaktivasyonu ile ilişkisi en iyi tanımlanan dezmoid tümör olmasına rağmen immünohistokimyasal boyama ve sekanslama temelli tekniklerin birlikte kullanımıyla diğer yumuşak doku tümörlerinde de WNT yolağı bozuklukları olduğu tespit edilmeye başlanmıştır (130–132). Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar, etiyolojisi ve patogenezi henüz bilinmeyen bazı yumuşak doku tümörlerinin *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonu taşıdığını göstermiştir. Bu tümörlerin

benign karakteri, miyofibroblastik özelliklere sahip olması ve çoğunun vasküler alanlar içermesi *CTNNB1* mutasyonlarıyla karakterize olan tümörlerin benzer özellikler taşıyabileceğini göstermektedir (133). *CTNNB1* mutasyonlarını etkin bir şekilde tespit etmeye yarayacak yeni yöntemler, etiopatogenezi henüz bilinmeyen çok sayıda yumuşak doku tümörünün β -cateninopati sonucu ortaya çıkan yumuşak doku tümörleri ailesine dahil olmasını sağlayacaktır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında test etmek istediğimiz iki temel hipotez bulunmaktadır. İlk hipotezimiz, araştırma grubumuz tarafından tanımlanmış olan β -catenin immünohistokimyasal boyama yönteminin, *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının tespit edilmesinde kullanılabileceğidir. Bu hipotez doğrultasındaki hedefimiz ise etiopatogenezi henüz bilinmeyen dalağın sklerozan anjiomatoid nodüler transformasyonu (SANT) olgularında *CTNNB1* ekzon 3 mutasyon varlığını araştırmaktır. İkinci hipotezimiz ise, β -catenin'in N-terminal bölgesini etkileyebilecek post-translasyonel modifikasyonların kolorektal kanser ile ilişkili olduğudur. İkinci hipotezimiz doğrultusundaki hedefimiz ise kolorektal kanser doku örneklerinde, β -catenin'in farklı epitoplarına bağlanan antikolar kullanarak β -catenin'in N-terminal bölgesini etkileyebilecek post-translasyonel modifikasyonları incelemektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Dalağın Sklerozan Anjiomatoid Nodüler Transformasyonu (SANT) Olgularının Seçilmesi

Üç farklı üniversite hastanesinden (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi) 2006-2018 yılları arasında tanı almış 7 adet SANT hasta örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalara ait FFPG doku blokları patoloji departmanlarının arşivlerinden çıkarılmıştır. H&E ve anti-CD34, anti-CD31 ve anti-CD8 antikorları ile immünohistokimyasal olarak boyanmış doku kesitleri rutin patolojik incelemenin parçası olarak tanı tarihinde oluşturulmuştur. Ek olarak, nodüler alanları çevreleyen fibrosklerotik stromanın daha iyi değerlendirilebilmesi için Masson's trichrome (MTC) ve Elastin van Gieson (EVG) histokimyasal boyamaları yapılmıştır. Her bir hasta örneği en az iki farklı patolog tarafından değerlendirilmiştir ve histopatolojik/immünofenotipik görünümü SANT tanısı ile uyumlu olan olgular seçilmiştir.

3.2. İnsan Kolorektal Kanser Doku Örneklerinin Toplanması

Kolorektal kanser tanısı alan ve kolon rezeksiyonu yapılan hastalardan alınan doku örnekleri patolojik olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda rutin patolojik incelemeye dahil edilmeyecek olan kanserli ve normal dokudan bistüri yardımıyla doku parçası alınmıştır. Bu dokular 25 x 20 x 5mm'lik plastik kalıplara (Tissue-Tek Cryomold, Sakura Finetek) alındıktan sonra üzerine doku dondurma solüsyonu (Cryobloc, Diapath, 070130) damlatılarak -80°C'ye kaldırılmıştır.

3.3. Hastalara ait Kolorektal Kanser Doku Örneklerinden DMD Oluşturulması

Tez çalışmasında hastalara ait normal kolon, kolon adenomu ve kolorektal kanser dokuları kullanılarak hazırlanan 1 mm çaplı ve toplamda 205 farklı hastanın doku örneğini içeren 4 adet DMD (DMD1-4) araştırma grubumuz tarafından daha önce hazırlanmıştı (5). Bu tez çalışması kapsamında 20 farklı hastanın doku örneğini

içeren 3 mm çaplı 1 adet DMD (DMD-5) hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan bütün DMD'lerde her hastaya ait doku örneği iki tekrar olacak şekilde bloğun içerisine yerleştirilmiştir (**Tablo 3.1.**).

Tablo 3.1. DMD-5'teki hasta doku örneklerinin yerleşimi

A1	A1	A2	A2	A3	A3	A4	A4
B1	B1	B2	B2	B3	B3	B4	B4
C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4
D1	D1	D2	D2	D3	D3	D4	D4
E1	E1	E2	E2	E3	E3	E4	E4

3.4. DNA İzolasyonu

3.4.1. Formalin ile Fikse edilmiş Parafine Gömülü (FFPG) Doku Kesitinden DNA İzolasyonu

SANT örneklerine ait doku bloklarından mikrotom ile 4 µm kalınlığında kesilerek elde edilen kesitler lam üzerine alınmıştır. Her hasta örneğine ait bir doku kesiti H&E ile boyanmış ve tümöral alan ışık mikroskobu altında belirlenerek işaretlenmiştir. Belirlenen tümöral alan, lam yüzeyine alınmış boyasız doku kesitlerinden bistüri yardımıyla kazınarak ependorf tüplere alınmıştır. Çalışmada, DNA izolasyonu için önceden tanımlanmış olan mikrodalga temelli bir yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır (134). Bu yönteme göre ilk olarak, bistüri ile kazınmış ve tüpe alınmış doku kesiti parçaları üzerine 200 µl lizis tamponu (50 mM Tris-HCl, pH: 9,0/ 1 mM 0,5M EDTA, pH: 8,0/ 0,5% Tween-20) eklenmiştir ve daha sonra mikrodalgada 2 dakika kaynatılarak deparafinizasyon sağlanmıştır. Daha sonra örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve tüpün üstünde oluşan parafin halka pipetajla uzaklaştırılmıştır. Proteinlerin yıkılması için örnekler 4 µl Proteinaz K (10 mg/ml) eklenmiş ve 55°C'deki su banyosunda 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler 200 µl fenol/kloroform/isoamil alkol (25:24:1) ilave edilerek 13.000 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası en üst katmanda yer alan transparan sıvı faz yeni bir ependorf tüpe

toplanmıştır. Elde edilen örnekteki final DNA miktarını artırabilmek için etil alkol presipitasyonu uygulanmıştır. Bu işlem için her örneğe 20 µl 3M sodyum asetat (pH: 7,0) ve 550 µl %100 etanol ilave edilmiştir. Örnekler -20°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir ve ardından 13.000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak 20 µl ddH₂O ile elüsyon gerçekleştirilmiştir. Total DNA miktarı spektrofotometre (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher) ile belirlenmiştir.

3.4.2. Taze Donmuş Dokudan DNA İzolasyonu

-80°C'de saklanan taze kolorektal kanser dokuları, içerisinde bulunduğu plastik kalıplardan çıkarıldıktan sonra kriyostat ile kesilerek donmuş doku kesitleri elde edilmiştir ve hemen ependorf tüplere alınmıştır. DNA izolasyonu için her hasta örneği başına 6 µm kalınlığında 2 adet doku kesiti alınmasına karar verilmiştir. Her tüpe 200 µl lizis tamponu (50 mM Tris-HCl, pH: 9,0/ 1 mM 0,5M EDTA, pH: 8,0/ 0,5% Tween-20) ve 4 µl Proteinaz K (10 mg/ml) eklenmiştir ve 55°C'deki su banyosunda 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler 200 µl fenol/kloroform/isoamil alkol (25:24:1) ilave edilerek 13.000 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası en üst katmanda yer alan transparan sıvı faz yeni bir ependorf tüpe toplanmıştır. Elde edilen örnekteki final DNA miktarını artırabilmek için etil alkol presipitasyonu uygulanmıştır. Bu işlem için her örneğe 20 µl 3M sodyum asetat (pH: 7,0) ve 550 µl %100 etanol ilave edilmiştir. Örnekler -20°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir ve ardından 13.000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak 50 µl ddH₂O ile elüsyon gerçekleştirilmiştir. Total DNA miktarı spektrofotometre (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher) ile belirlenmiştir.

3.5. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

3.5.1. FFPG Doku Kesitinden RNA İzolasyonu

SANT örneklerine ait doku bloklarından mikrotom ile 10 µm kalınlığında kesilerek elde edilen doku kesitleri ependorf tüpe alınmıştır. Total RNA izolasyonu RNeasy FFPE Kit (Qiagen, 73504) ile üretici firmanın protokolü izlenerek

gerçekleştirilmiştir. Final RNA konsantrasyonu spektrofotometre (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher) ile belirlenmiştir. RNA örnekleri, her biri 0,2 µg/µl final konsantrasyona sahip olacak şekilde alikotlanmıştır. cDNA sentezi için cDNA Revers Transkripsiyon kiti (Thermo Fisher, 4368814) kullanılmıştır ve her bir örnek için 2 µg RNA reaksiyona dahil edilmiştir.

3.5.2. Taze Donmuş Dokudan RNA İzolasyonu

-80°C'de saklanan taze kolorektal kanser dokuları, içerisinde bulunduğu plastik kalıplardan çıkarıldıktan sonra kriyostat ile kesilerek doku kesitleri elde edilmiştir ve hemen içerisinde 1 ml TRIzol (Thermo Scientific, 15596026) bulunan ependorf tüplere alınmıştır. RNA izolasyonu için her hasta örneği başına 6 µm kalınlığında 6 adet doku kesiti alınmasına karar verilmiştir. Doku kesitleri TRIzol içerisinde homojenize edilmiştir ve üreticinin protokolü izlenerek RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA örnekleri, her biri 0,2 µg/µl final konsantrasyona sahip olacak şekilde alikotlanmıştır. cDNA sentezi için cDNA Revers Transkripsiyon kiti (Thermo Scientific, 4368814) kullanılmıştır ve her bir örnek için 2 µg RNA reaksiyona dahil edilmiştir.

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Revers-Transkriptaz PZR (RT-PZR)

PZR için iki farklı DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. FFPG doku kesitlerinden elde edilen genomik DNA ve cDNA örnekleri kullanılarak yapılan PZR amplifikasyonunun daha zor olması nedeniyle Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, M0491S) tercih edilmiştir. Taze donmuş doku kesitlerinden elde edilen DNA ve cDNA örnekleri ise DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher, EP0705) ile amplifiye edilmiştir. Kullanılan PZR koşulları gradyen PZR uygulaması ile her primer çifti için özel olarak belirlenmiştir. Tüm PZR deneyleri için GenePro (Bioer Technology) cihazı kullanılmıştır.

CTNNB1 ekzon 3 bölgesinde bulunabilecek nokta mutasyonlarının genomik DNA düzeyinde araştırılması için BCAT_F ve BCAT_R primer çifti kullanılmıştır. Bu primer çifti ile yapılacak PZR sonucunda beklenen normal ampikon boyutu 226 baz

çiftidir. Ekzon 3 bölgesinin interstisiyel delesyonuna neden olabilecek mutasyonların genomik DNA düzeyinde incelenmesi için ise BCAT_ex2_ex4_del_F ve BCAT_ex2_ex4_del_R primer çifti kullanılmıştır ve bu primerler ile yapılan PZR sonucunda beklenen normal amplikon boyutu 931 baz çiftidir. Revers transkripsiyon sonucunda elde edilen cDNA sentezinin başarısını değerlendirmek için U6 küçük nükleer RNA primer çifti U6_F ve U6_R kullanılmıştır. *CTNNB1* mRNA transkriptlerindeki ekzon 3 varlığı/kaybı ise olgulara ait cDNA örnekleri kullanılarak değerlendirilmiştir. cDNA kullanılarak yapılan RT-PZR deneylerinde CTNNB1_S_F ve CTNNB1_AS_R primer çifti kullanılmıştır ve bu primerler ile yapılan PZR sonucunda beklenen normal amplikon boyutu 404 baz çiftidir. Çalışmada kullanılan primerlere ait sekanslar **Tablo 3.2.**'de paylaşılmıştır. PZR ürünlerinin yürütüldüğü agaroz jel konsantrasyonu %0,8 ile 2 arasında deney dizaynına göre farklılık göstermiştir. Görüntüleme için FluorChem FC3 sistemi (Protein Simple) kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Primerler ve DNA sekansları

Primer	DNA Sekansı (5'-3')
BCAT_F	ATTTGATGGAGTTGGACATGGC
BCAT_R	CCAGCTACTTGTCTTGAGTGAAGG
BCAT_ex2_ex4_del_F	CCAGCGTGGACAATGGCTAC
BCAT_ex2_ex4_del_R	TGAGCTCGAGTCATTGCATAC
CTNNB1_S_F	CCTGAGGGTATTTGAAGTATAC
CTNNB1_AS_R	GCAGCATCAAAGTGTAG
U6_F	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATAT
U6_R	AAAAATATGGAACGCTTCACGAA
GAPDH_F	CGGGTCTTTGCAGTCGTATG
GAPDH_R	GCGAAAGGAAAGAAAGCGTC

3.7. Agaroz Jel Ekstraksiyonu, PZR Pürifikasyonu ve Sekanslama

Agaroz jel ekstraksiyonu için ilk olarak PZR ürünleri %1,5 konsantrasyonlu agaroz jelde yürütülmüştür ve yürütme işlemi tamamlandıktan sonra UV ışık kaynağı altında görüntülenmiştir. Belirlenen bantlar bistüri yardımıyla kesilerek ependorf

tüplere alınmıştır. Jel ekstraksiyonu GeneJET jel ekstraksiyon kiti (Thermo Fisher, K0691) ile üretici firmanın protokolü ile gerçekleştirilmiştir.

Yapılan PZR'ler sonucunda elde edilen ürünler GeneJET PZR pürifikasyon kiti (Thermo Fisher, K0701) kullanılarak üretici firmanın protokolüyle pürifiye edilmiştir. Agaroz jel ekstraksiyonu ve PZR pürifikasyonu sonucu elde edilen ürünlerin konsantrasyonu spektrofotometre (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher) ile belirlenmiştir. Elde edilen PZR ürünleri ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanılarak Hacettepe Üniversitesi Nefroloji Ünitesi Nefrogenetik Laboratuvarı'nda sekanslanmıştır.

3.8. İmmünohistokimyasal Boyama

Hazırlanan DMD bloklarından ve SANT hastalarına ait doku bloklarından mikrotom ile 4 µm kalınlığında doku kesitleri elde edilerek yüksek adeziv özellik gösteren lamlara alınmıştır. Deparafinizasyon için ilk olarak etüvde 60°C'de gece boyu inkübe edilmiştir ve ksilende 20 dakika bekletilmiştir. Kesitler rehidrasyon için sırasıyla %96, %90 ve %70'lik etil alkolde 10'ar dakika bekletilmiştir. Antijen geri kazanımı işlemi için doku kesitleri sitrat (pH:6.0) içeren tampon çözeltide 10 dakika boyunca mikrodalgada kaynatılmıştır. Doku örneklerindeki endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %7 H₂O₂ / %80 metanol solüsyonu içerisinde 20 dakika bekletilmiştir. Çalışmada 3 farklı β-catenin primer antikoru kullanılmıştır (**Tablo 3.3.**). Fare monoklonal anti-β-catenin (BD Transduction Laboratories, 610154) antikoru proteinin C-terminal bölgesindeki 571-781. amino asitler arasına bağlanarak hücredeki tüm β-catenin havuzunu tanımaktadır. Tavşan monoklonal non-phospho (Active) β-catenin (Ser33/37/Thr41) (CST, 8814) antikoru spesifik olarak Ser33, Ser37 ve Thr41 amino asitlerinin defosforile olduğu β-catenin formuna bağlanmaktadır. Tavşan poliklonal phospho-β-catenin Ser33/37/Thr41 (9561, Cell Signaling Technology) antikoru ise S33, S37 veya Thr41 amino asitlerinden biri fosforile olduğu zaman β-catenin'i tanımaktadır. Dokular primer antikorlar ile +4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir ve Tris Buffered Saline (TBS) ile yıkanmıştır. Doku kesitleri sırasıyla biyotinlenmiş keçi sekonder antikoru ve streptavidin peroksidaz (Thermo Scientific,

anti-polyvalent HRP, TP-125-HL) ile inkübe edilmiştir. Kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Thermo Scientific, 34002) kullanılmıştır ve hematoksilin ile zıt boyama yapılmıştır. Tüm kesitler Olympus VS 120 sistemi ile dijital olarak taranmıştır ve OlyVIA yazılımı ile görüntülenmiştir.

Tablo 3.3. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan antikor dilüsyonları ve antijen geri kazanımı koşulları

Primer Antikor			Antijen Geri Kazanımı	
İsim	Marka-Katalog No	Dilüsyon	Kullanılan Solüsyon	Süre (dk)
Purified Mouse Anti- β -catenin	BD Transduction Laboratories (610154)	1:500	Sitrat	10
Non-phospho (Active) β -catenin (Ser33/37/Thr41)	Cell Signaling Technology (8814)	1:800	Sitrat	10
Phospho- β -catenin (Ser33/37/Thr41)	Cell Signaling Technology (9561)	1:50	Sitrat	10

3.9. İmmunofloresan Boyama

Normal kolon ve kolorektal kanser dokularından kriyotom ile 8 μ m kalınlığında frozen doku kesitleri alınmıştır. Kesitler 15 dakika %100 metanol içerisinde fikse edilmiştir. Fikse olan doku kesitleri, fare monoklonal anti- β -catenin [1:1000] (610154, BD Transduction Laboratories) ve poliklonal phospho- β -catenin Ser33/37/Thr41 [1:50] (9561, Cell Signaling Technology) antikorundan oluşan primer antikor karışımı ile gece boyu +4°C'de inkübe edilmiştir. TBS ile yapılan yıkamalardan sonra goat anti-mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647) [1:200] (ab150115, Abcam) ve goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) [1:1000] (ab150077, Abcam) antikorlarından oluşan sekonder antikor karışımı ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Çekirdek boyası olarak DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (ZytoVision, MT-0008-0.8) kullanılmıştır. Görüntüler Leica DM2500 sistemi kullanılarak elde edilmiştir.

3.10. Protein İzolasyonu, Protein Konsantrasyon Tayini ve Western Blot

Hastalara ait normal kolon ve kolorektal kanser taze dokusundan 6 µm kalınlığında frozen kesit alınarak H&E boyaması gerçekleştirilmiştir. Boyama sonucunda tümöral alan ve normal kolon epiteli ışık mikroskobu altında belirlenmiştir. Belirlenen alanlar bistüri yardımıyla taze dokudan kesilerek ependorf tüplere aktarılmıştır. Hedeflediğimiz alanların elde edilip edilemediğini onaylamak için taze dokudan tekrar 6 µm kalınlığında frozen kesit alınarak H&E boyaması ile kontrol edilmiştir.

Normal kolon epiteli ve kolorektal kanser dokularından protein lizatı elde edebilmek için radioimmunoprecipitation assay (RIPA) tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) karışımı hazırlanarak Dounce homojenizatörü yardımıyla homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Protein konsantrasyon tayini bikinkoninik asit (BCA) yöntemi (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, 23225) ile yapılmıştır. Protein örnekleri, her biri 2 mg/ml final konsantrasyona sahip olacak şekilde alikotlanmıştır.

Western Blot için Mini-PROTEAN Tetra Cell sistemi (Bio-rad) kullanılmıştır. Taze dokudan izole edilen proteinler sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAJE) ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır. Protein örnekleri β-merkaptotanol ile kaynatılarak denatüre edilmiştir ve kuyu başına 30 µg örnek yüklenmiştir. Jelde yürütme işlemi tamamlanınca proteinler PVDF membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi sonrasında membranlar 1 saat oda sıcaklığında %5 yağsız süt tozu/TBS-T solüsyonu veya %5 bovine serum albumin (BSA)/TBS-T solüsyonu içerisinde 1 saat oda sıcaklığında bloklanmıştır. %5 BSA/TBS-T solüsyonu ile bloklanan membranlar, phospho-β-catenin (Ser33/37/Thr41) antikoru ile yapılan çalışmalarda tercih edilmiştir. Bloklama işlemi sonrasında membranlar anti-β-catenin antikoru [1:1000] (610154, BD Transduction Laboratories), non-phospho (Active) β-catenin (Ser33/37/Thr41) (D13A1) antikoru [1: 1.000] (8814, Cell Signalling Technology) ve phospho-β-catenin (Ser33/37/Thr41) antikoru [1:500] (9561, Cell Signalling Technology) ile gece boyu +4°C'de inkübe edilmiştir. Yıkama işleminin ardından membranlar uygun sekonder antikorlar ile [goat anti-mouse IgG (H+L), HRP (31430,

Thermo Scientific) ve goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP (31430, Thermo Scientific)] 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Membranlar kemilüminesan substrat (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, 34578) kullanılarak görüntülenmiştir. Yükleme kontrolü olarak anti-β-Actin-Peroxidase [1:30.000] (A3854, Sigma) antikoru kullanılmıştır. Görüntüler FluorChem FC3 sistemi (Protein Simple) kullanılarak elde edilmiştir.

3.11. İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı analizler kategorik değişkenler için yüzde ve frekans tabloları, normal olmayan dağılıma sahip sayısal değişkenler için ortanca ve minimum-maksimum değerler olarak sunulmuştur. Sağkalım eğrileri Kaplan-Meier yöntemi ile oluşturulmuştur ve eğriler arasındaki fark log-rank testi ile karşılaştırılmıştır. Genel sağkalım, bir hastanın kolorektal kanser tanısı aldığı gün ile herhangi bir nedene bağlı öldüğü gün arasındaki fark olarak tanımlanmıştır. Sağkalım eğrilerinin oluşturulması için 10 yıl (120 ay) kesim değeri olarak belirlenmiştir ve kolorektal kanser tanısı aldığı günden sonraki 10 yılda hayatta kalan olgular sansürlenmiştir. Bunun nedeni, çalışma grubundaki hasta sayısının ve ölüm sıklığının bu zaman diliminden sonra çok azalmasıdır. Benzer bir yöntem Chung ve ark. (135) tarafından da uygulanmıştır. Çalışmada yapılan tüm deneyler en az üç kere tekrarlanmıştır. $p < 0,05$ olarak bulunan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 23.0 sürümü kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Etiyopatogenezi Bilinmeyen Yumuşak Doku Tümörlerinde *CTNNB1* Mutasyonlarının Araştırılması

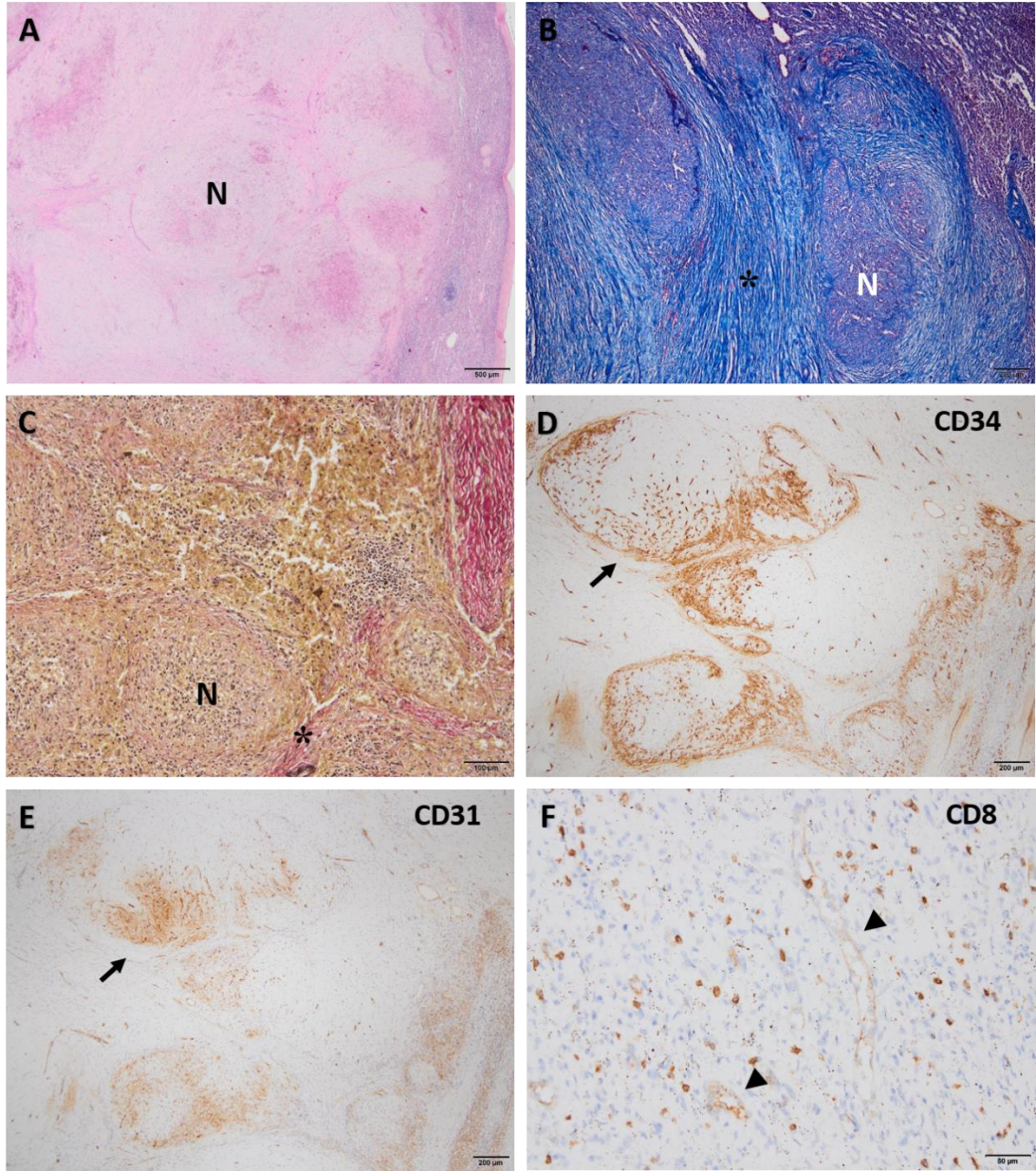
Dalağın sklerozan anjiomatoid nodüler transformasyonu (SANT), dalağın nadir görülen iyi huylu vasküler tümörlerinden biridir ve ilk defa Martel ve ark. (136) tarafından 2004 yılında tanımlanmıştır. Tez çalışması kapsamında üç farklı üniversite hastanesinden toplam yedi SANT olgusu araştırmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan olguların medyan yaşı 48 (açıklık: 31-68) olarak belirlenmiştir. Olguların tamamına tanısal ve tedavi amaçlı olarak splenektomi uygulanmıştır. Olguların beş tanesinde lezyonun varlığı radyolojik görüntüleme de rastlantısal olarak tespit edilmişken, bir olguda lezyonun varlığı laparotomi sırasında rastlantısal olarak fark edilmiştir. Lezyonların makroskopik görünümleri birbirleri ile benzerlik göstermektedir ve tipik SANT morfolojisini taşımaktadır. Splenektomi spesimenleri incelendiğinde lezyonların, merkezi bir skar dokusu içeren çok sayıda krem rengi-beyaz veya kahverengi nodüler kitleden oluştuğu gözlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen yedi SANT olgusunun klinik ve patolojik özellikleri **Tablo 4.1**'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. SANT olgularının klinik ve patolojik özellikleri

Olgu	Cinsiyet/Yaş (yıl)	Klinik Özellikler	Dalak Ağırlığı (g)	Makroskopik Özellikler
1	E/61	M/D	639	10 x 8.5 x 7 cm boyutlarında iyi sınırlı, fibröz bantlar içeren gri-kahverengi kitle
2	K/68	Laparotomi sırasında rastlantısal bulgu	M/D	1.5 x 1.5 x 1 cm boyutlarında düzensiz şekilli, krem rengi-beyaz kitle
3	K/38	Radyolojik görüntülemelerde rastlantısal bulgu	400	7 x 6 x 5 cm boyutlarında iyi sınırlı, ortası sklerotik, çevreye doğru yıldız şeklinde dallanma gösteren lezyon
4	K/51	Radyolojik görüntülemelerde rastlantısal bulgu	260	3 x 2.5 x 1 cm boyutlarında, iyi sınırlı nodüler lezyon
5	E/48	Radyolojik görüntülemelerde rastlantısal bulgu	650	Krem rengi-beyaz sklerotik merkeze sahip, çevreye doğru yıldız şeklinde dallanma gösteren nodüler lezyon
6	K/46	Radyolojik görüntülemelerde rastlantısal bulgu	427	9 x 7 x 6,5 cm boyutlarında çevre dokudan ayrılan gri-kahverengi, sert lezyon
7	E/31	Radyolojik görüntülemelerde rastlantısal bulgu	M/D	11 x 7 x 5,5 cm boyutlarında sarı-beyaz renkli, sert, elastik, kapsül invazyonu göstermeyen nodül

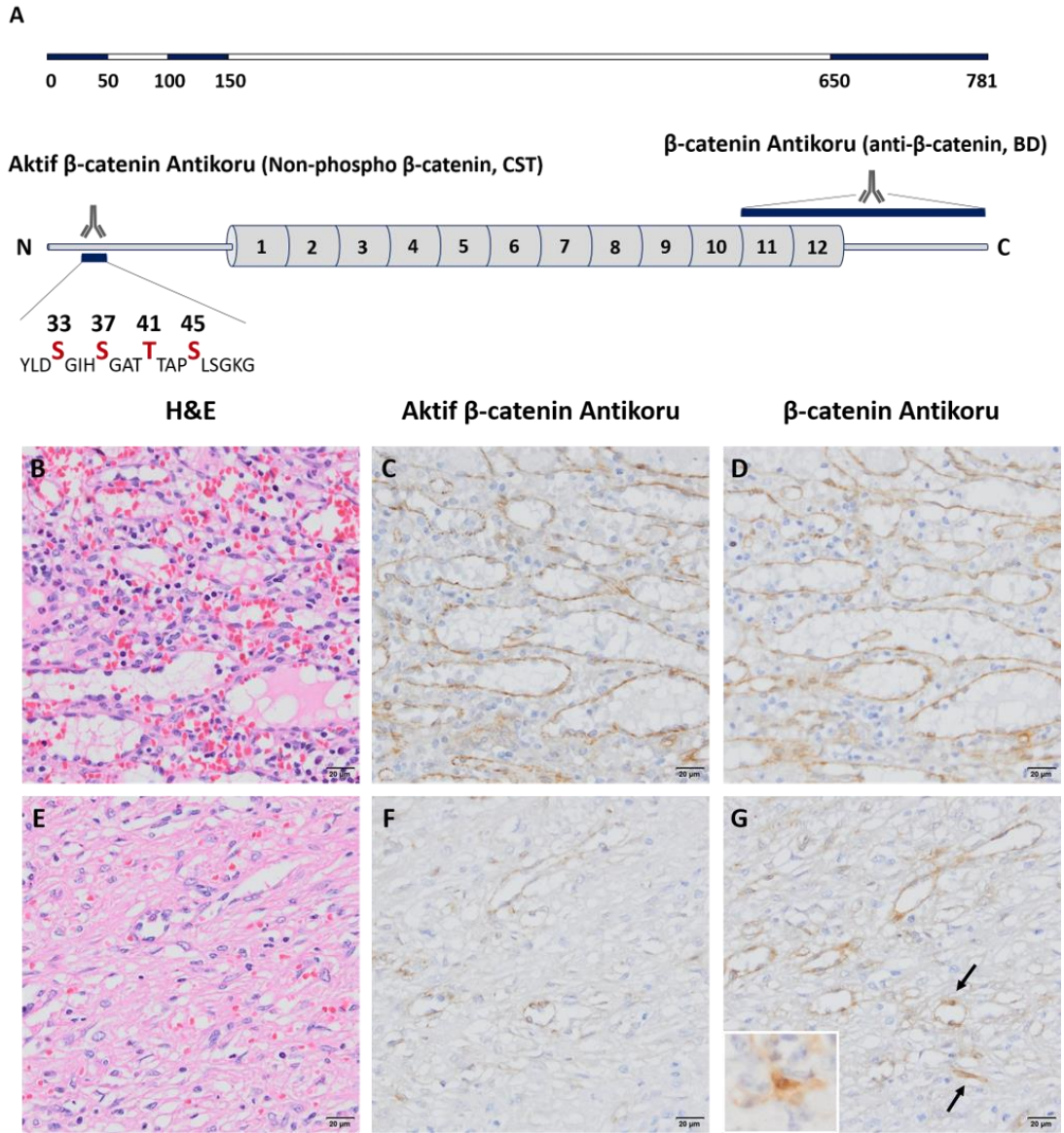
E: Erkek, **K:** Kadın, **g:** gram **M/D:** Veri Mevcut Değil

Histolojik olarak incelendiğinde SANT olgularının, damardan zengin farklı boyutlarda nodüler alanlardan oluştuğu gözlenmiştir (**Şekil 4.1.A**). Bu nodüler alanlar kendisini çevreleyen dalağın normal kırmızı pulpasından keskin sınırlarla ayrılmaktadır. Kollajen ve elastik fibrillerden zengin fibrosklerotik bir stroma ise nodüler yapıları birbirinden ayırmaktadır (**Şekil 4.1.B,C**). Nodüllerin içerisinde yer alan damarlar immünofenotipik olarak karakterize edildiğinde temel olarak iki farklı damar yapısını içerdiği gösterilmiştir. Bu damarlar CD31⁺ küçük damarlar ve CD34⁺ dar kılcal damarlardır (**Şekil 4.1.D,E**). Bu iki damar yapısının yanı sıra bazı nodüler alanlarda ise CD8 antikoru ile pozitif boyanan ve normal kırmızı pulpa sinüzoidlerine benzerlik gösteren az sayıda damar yapısı fark edilmiştir (**Şekil 4.1.F**).



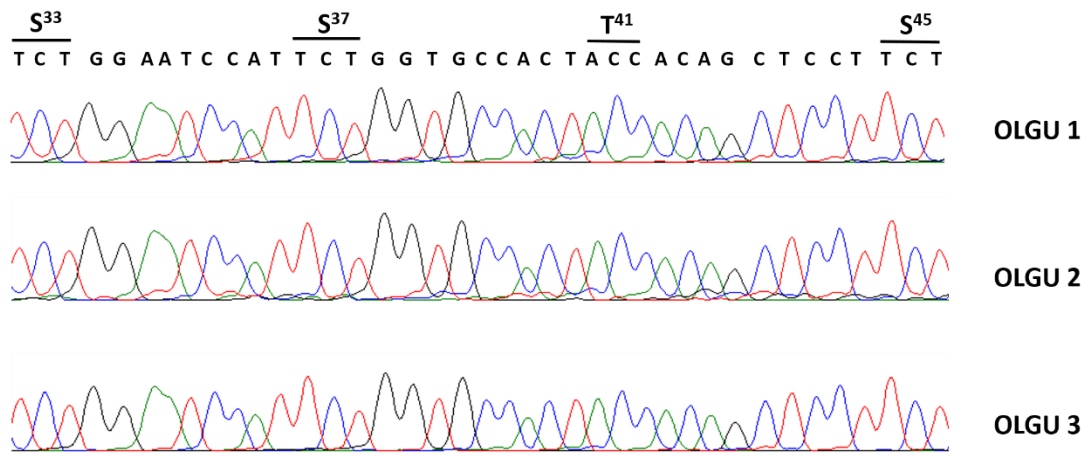
Şekil 4.1. Olgu 1'e ait H&E boyaması. Ölçek: 500 µm (A). Olgu 2'ye ait MTC boyaması. Ölçek: 200 µm (B). Olgu 5'e ait EVG boyaması. Ölçek: 100 µm (C). Olgu 1'e ait CD34 boyaması. Ölçek: 200 µm (D). Olgu 1'e ait CD31 boyaması. Ölçek: 200 µm (E). Olgu 3'e ait CD8 boyaması. Ölçek: 50 µm (F). SANT olguları nodüler alanlardan (N) oluşmaktadır. Yıldız fibrosklerotik stromayı göstermektedir. Siyah oklar CD34 ve CD31 antikorumla ile pozitif boyanan damarları göstermektedir. Ok başları CD8 antikoru ile pozitif boyanan sinüzoid benzeri damar yapılarını belirtmektedir.

Klinik özellikleri, makroskopik ve mikroskopik bulguları SANT ile uyumlu olan yedi olguda β -catenin N-terminal bölge değişikliklerinin araştırılmasına karar verilmiştir. İlk olarak, daha önce araştırma grubumuz tarafından tanımlanmış olan β -catenin immünohistokimyasal boyama yöntemini (5) kullanarak N-terminal bölge değişikliklerinin varlığı değerlendirilmiştir. Bu amaçla, yedi SANT olgusuna ait her bir doku bloğundan iki doku kesiti alınmış ve bu doku kesitlerinden biri N-terminal bölgedeki spesifik amino asit dizisini tanıyan aktif β -catenin antikoruyla [Non-phospho (Active) β -catenin, CST], diğeri ise C-terminal bölgeyi tanıyan β -catenin antikoruyla [anti- β -catenin, BD Biosciences] immünohistokimyasal olarak boyanmıştır (**Şekil 4.2.A**). Yapılan immünohistokimyasal boyamada normal kırmızı pulpada yer alan sinüzoidleri döşeyen endotel hücrelerinin her iki β -catenin antikoru ile de sitoplazmik boyandığı gösterilmiştir ve normal dalak dokusunun her iki antikor ile de benzer kuvvette boyandığı fark edilmiştir (**Şekil 4.2.B,C,D**). Normal dokunun ardından lezyonu oluşturan nodüler alanlar da β -catenin ifadesi açısından değerlendirilmiştir ve aktif β -catenin antikoruyla yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda nodüler alanlarda boyanmanın olmadığı gösterilmiştir (**Şekil 4.2.E,F**). Bu durumun aksine C-terminali tanıyan β -catenin antikorusunun, nodüler alanda yer alan damar yapılarını normal dalaktakine benzer kuvvette boyadığı tespit edilmiştir (**Şekil 4.2.G**). β -catenin antikoru ile boyanan hücrelerin çoğunluğu sitoplazmik boyanma göstermekle birlikte az sayıda hücrede β -catenin'in nükleusta biriktiği fark edilmiştir (**oklar ve büyütülmüş görsel**). Araştırma grubumuz tarafından daha önce tanımlandığı üzere bu boyanma görünümü *CTNNB1* ekzon 3'ü etkileyen mutasyonların, aktif β -catenin antikorusunun N-terminal bölgede tanıdığı epitopu değiştirmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle grubumuz tarafından bu görünüm β -catenin mutant boyanma deseni olarak adlandırılmıştır ve *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının değerlendirilmesine yönelik ilk adımı oluşturmuştur.



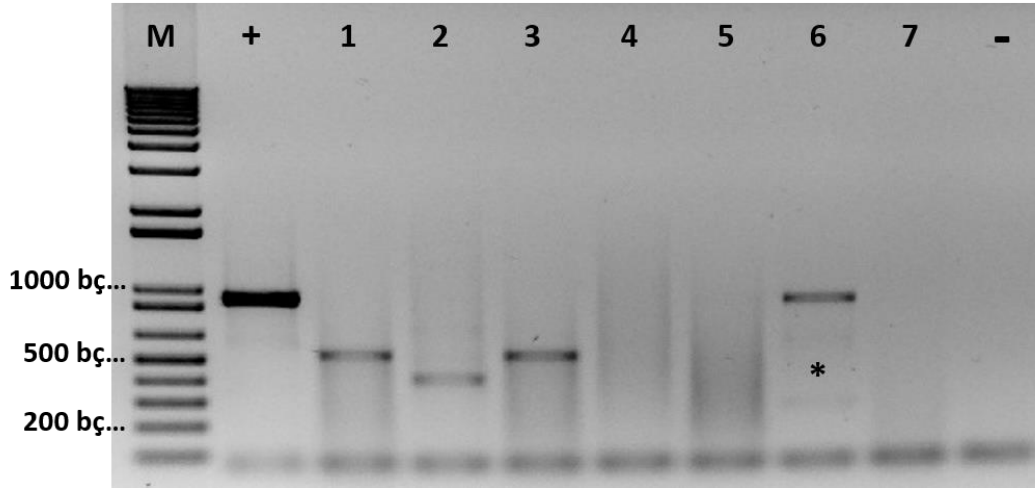
Şekil 4.2. SANT olgularının aktif β -catenin ve β -catenin antikolarıyla immünohistokimyasal olarak boyanması. SANT olgularına ait doku kesitleri proteinin farklı epitoplarnı tanıyan iki β -catenin antikoru ile immünohistokimyasal olarak boyanmıştır (A). Olgu 2'ye ait normal kırmızı pulpa H&E'le (B), aktif β -catenin antikoruyla (C) ve β -catenin antikoruyla (D) boyanmıştır. Olgu 2'ye ait nodüler lezyon H&E'le (E), aktif β -catenin antikoruyla (F) ve β -catenin antikoruyla (G) boyanmıştır. *Oklar* β -catenin'in nükleer birikim gösterdiği hücreleri göstermektedir. *Büyütülmüş görsel* nükleer ve sitoplazmik β -catenin birikimi olan bir hücreyi göstermektedir. Ölçek: 20 μ m.

İmmünohistokimyasal boyama sonucunda β -catenin mutant boyanma deseni elde edilmesi nedeniyle *CTNNB1* ekzon 3 bölgesinin moleküler olarak değerlendirilmesine karar verilmiştir. İlk olarak SANT olgularından genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilerek *CTNNB1* ekzon 3 bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PZR ürünlerinde nokta mutasyonu varlığını değerlendirebilmek için sekanslama işlemi yapılmıştır. Sekans analizi sonucunda yedi SANT olgusunun hiçbirinde nokta mutasyonu tespit edilmemiştir (**Şekil 4.3.**).



Şekil 4.3. Olgu 1, 2 ve 3'e ait *CTNNB1* ekzon 3 sekans sonucu. S³³, S³⁷, Thr⁴¹ ve S⁴⁵ amino asitleri *CTNNB1* ekzon 3 tarafından kodlanan, mutasyonların sıklıkla etkilediği sıcak noktaları temsil etmektedir.

Bu bulgu doğrultusunda, immünohistokimyasal boyama ile tespit ettiğimiz β -catenin mutant boyanma desenine ekzon 3'ün interstisyel delesyonlarının neden olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla, *CTNNB1* ekzon 2 ve ekzon 4'e ait DNA dizisine bağlanacak bir çift primer tasarlanmıştır ve ekzon 3 bölgesi bu primer çifti kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. Beklenen normal amplikon boyutu 931 baz çifti olmasına rağmen 1,2 ve 3 numaralı SANT olgularında beklenenden kısa PZR ürünleri tespit edilmiştir (**Şekil 4.4.**).

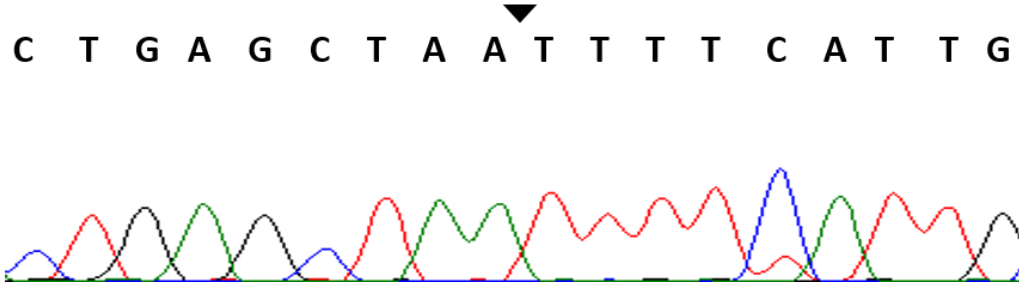


Şekil 4.4. SANT olgularına ait genomik DNA'da *CTNNB1* ekzon 3 delesyonu analizi.

Olgu 1 ve 3'te gözlenen kısa PZR ürünlerinin uzunluğunun 500-600 baz çifti arasında olduğu görülürken, olgu 2'de ortaya çıkan PZR ürününün uzunluğu 400-500 baz çifti arasındadır. Beklenen 931 baz çiftlik normal amplikon yalnızca 6 numaralı olguda gösterilebilmiştir ve bu olguda yaklaşık 300 baz çiftlik uzunluğa sahip kısa bir PZR ürünü silik olarak izlenmiştir (**yıldız**). Fakat tespit edilen kıza PZR ürünü tekrarlayan deneylerde gösterilememiştir. İlk üç olguda tespit edilen yaklaşık 400-600 baz çifti uzunluğa sahip kısa PZR ürünleri jel ekstraksiyonu yöntemiyle saflaştırılmıştır ve izole edilen ürünler Sanger sekanslama yöntemi ile incelenmiştir. Sekans analizi sonucunda üç SANT olgusuna ait PZR ürününde de *CTNNB1* ekzon 3'ün olmadığı fark edilmiştir ve üç olguda da ekzon 3'ün intronik bölgelerdeki kırılmalar sonucunda kaybolduğu tespit edilmiştir. Olgu 1 ve 3'e ait sekans sonucuna göre her iki olguya ait PZR ürünündeki 5' ve 3' uçlarındaki kırılma noktaları aynıdır ve bu kırılmalar sonucunda ekzon 3'ü içine alan 390 baz çifti uzunluğunda geniş bir delesyon ortaya çıkmıştır (**Şekil 4.5**). Olgu 2 ait sekans sonucunda ise diğer iki olgudan farklı olarak 520 baz çifti uzunluğunda daha büyük bir ekzon 3 delesyonu olduğu fark edilmiştir.

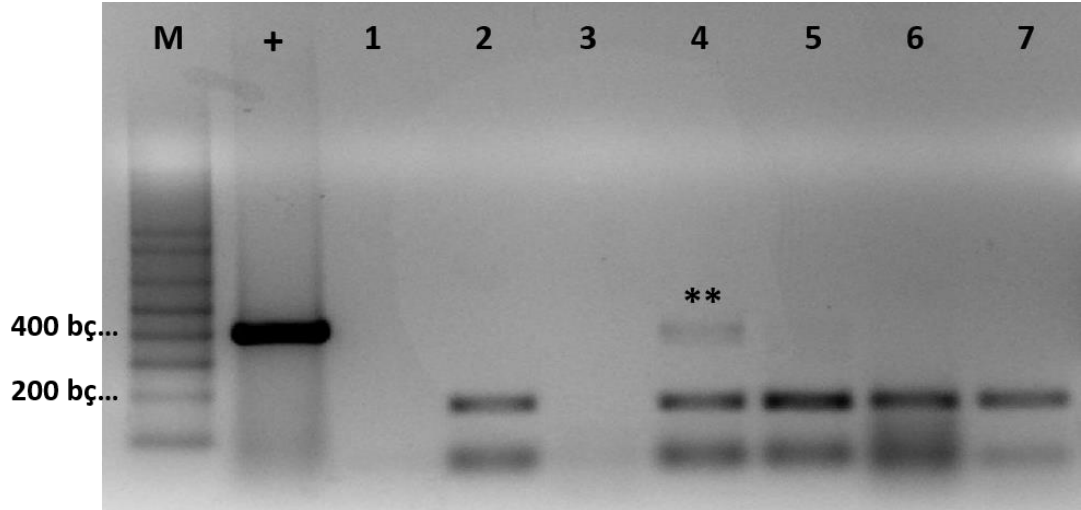
Genomik DNA_ *CTNNB1* Sekansı

5'...**CTGAGCTAA**/ccctggt...agtattat/TTTT**CATTG**...3'



Şekil 4.5. Olgu 1 ve 3'te tespit edilen kısa PZR ürününe ait Sanger sekans analizi sonucu. Koyu ve büyük harf ile belirtilen nükleotidler sekanslama sonucunda elde edilen nükleotid dizisinde bulunmaktadır ve *CTNNB1*'de yer alan intronik bölgelere karşılık gelmektedir. İtalik ve küçük harf ile belirtilen nükleotidler ise PZR ürünlerinde kaybolduğu fark edilen intronik bölgeleri temsil etmektedir.

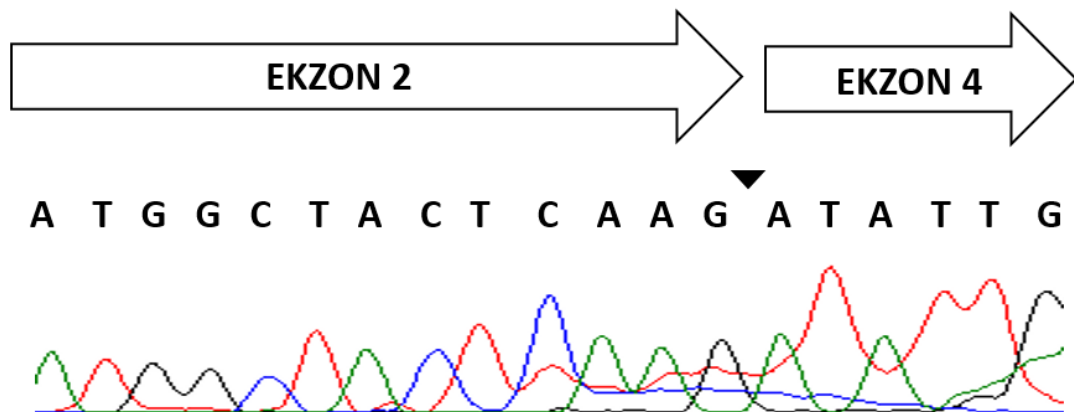
β -catenin immünohistokimyasal boyamaları sonucunda β -catenin mutant boyanma deseninin olguların tamamında görülmesine rağmen genomik değişikliğin yalnızca üç SANT olgusunda gösterilebilmesi nedeniyle *CTNNB1* ekzon 3 değişikliklerinin mRNA düzeyinde araştırılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla yedi SANT olgusuna ait doku kesitlerinden RNA izolasyonu yapılmış ve ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. *CTNNB1* ekzon 3 kaybının cDNA örnekleri kullanılarak değerlendirilebilmesi için ekzon 2 ve ekzon 4'e ait nükleotid dizisine bağlanacak yeni bir primer çifti tasarlanmıştır. *CTNNB1* ekzon 2-4 bölgesinin cDNA'lar kullanılarak PZR ile çoğaltılması sonucunda beş SANT olgusunda 200 baz çiftlik uzunluktan biraz kısa PZR ürünleri elde edilmiştir (**Şekil 4.6.**). Yalnızca 1 ve 3 numaralı olgularda yapılan PZR sonucunda herhangi bir bant gösterilememiştir. Beklenen 404 baz çiftlik normal ampikon yalnızca 4 numaralı olguda izlenebilmiştir (**çift yıldız**).



Şekil 4.6. SANT olgularına ait cDNA'da *CTNNB1* ekzon 3 delesyonu analizi. Yedi SANT olgusuna ait cDNA kullanılarak *CTNNB1* ekzon 2-4 bölgesi RT-PZR ile çoğaltılmıştır. Normal 404 baz çiftlik amplikon yalnızca olgu 4'te gösterilmiştir (*çift yıldız*).

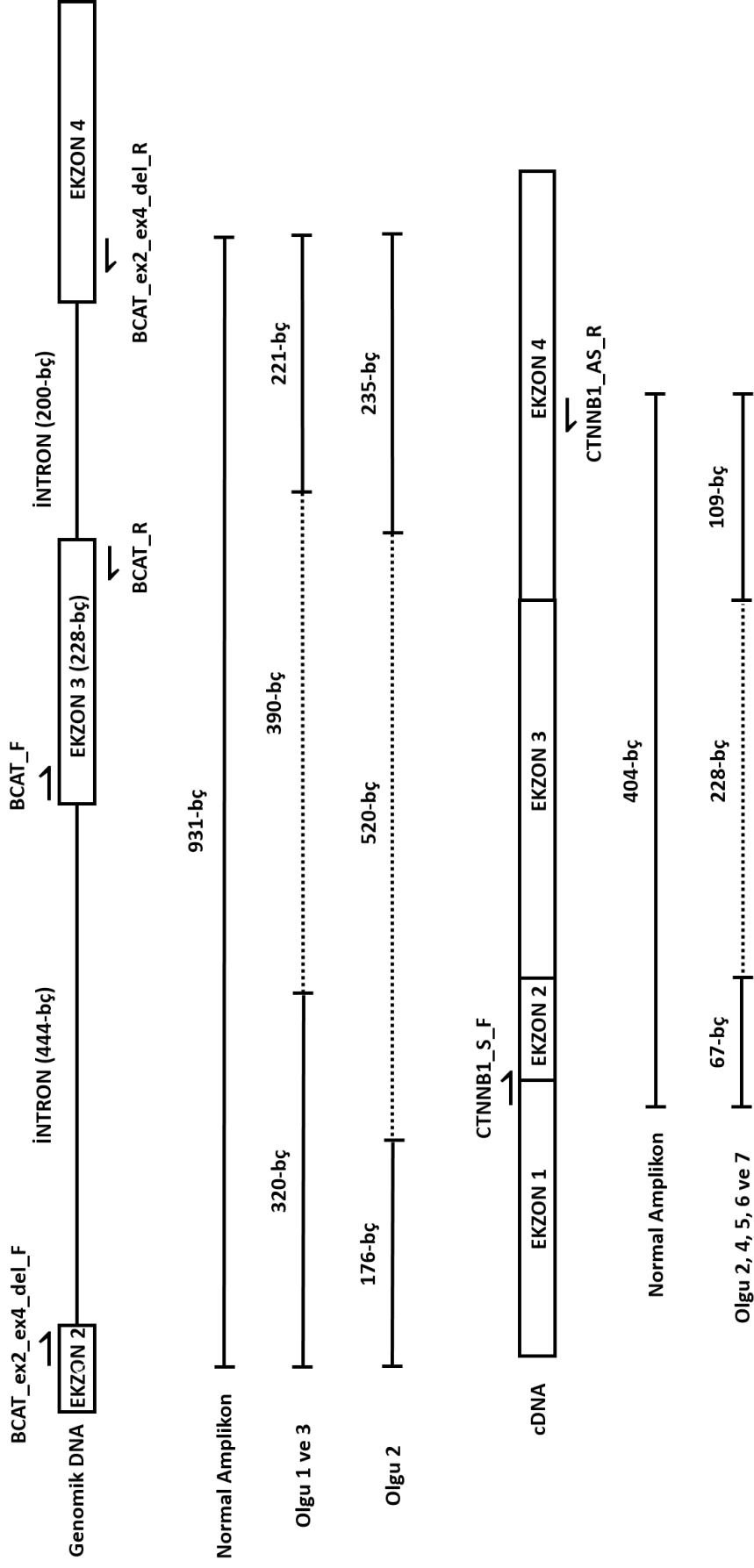
Olgu 2, 4, 5, 6 ve 7'de tespit edilen kısa bantların ekzon 3 kaybını gösterip göstermediğini değerlendirebilmek için agaroz jel ekstraksiyonu yöntemiyle PZR ürünleri elde edilmiştir ve izole edilen ürünler Sanger sekanslama ile incelenmiştir. Sekans analizi sonucunda beş olgunun tamamında da 228 baz çifti uzunluğundaki *CTNNB1* ekzon 3'ün tamamen kaybolduğu fark edilmiştir (**Şekil 4.7.**).

cDNA_*CTNNB1* Sekansı



Şekil 4.7. Olgu 7'de tespit edilen kısa PZR ürününe ait Sanger sekans analizi sonucu.

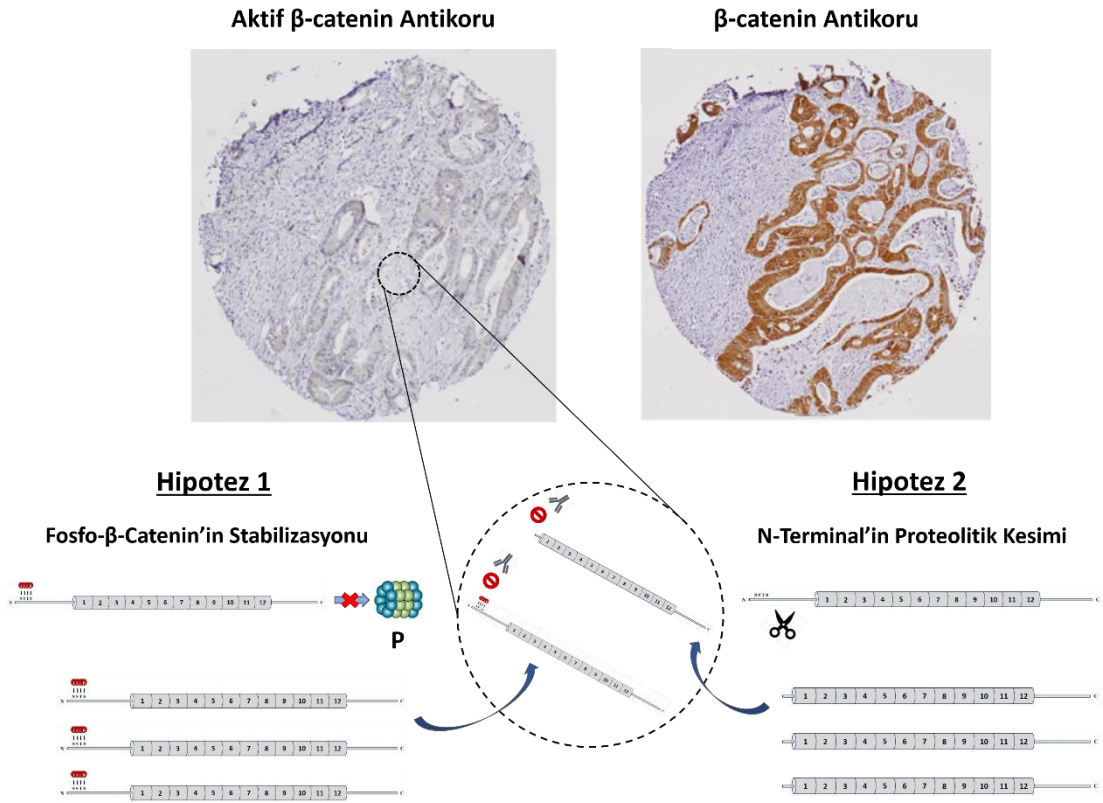
SANT olgularına ait genomik DNA ve cDNA örneklerinde *CTNNB1* ekzon 3 kaybının gösterilmesi ile bu lezyonun patogenezinde rolü olabilecek genetik bir değişiklik ilk defa tanımlanmış oldu. Çalışma sonucunda yedi SANT olgusunda tespit edilen tüm değişiklikler **Şekil 4.8.**'de özetlenmiştir.



Şekil 4.8. Yedi SANT olgusuna ait genomik DNA ve/veya cDNA örneklerinde PZR ve Sanger sekans analizi sonucunda tespit edilen tüm genetik değişiklikler. *Devamlı çizgiler* sekans analizinde var olan bölgeleri, *kesikli çizgiler* ise kaybolan bölgeleri temsil etmektedir. Oklar primerlerin genomik DNA'da ve cDNA'da bağlandığı yerleri belirtmektedir. (bç: baz çifti)

4.2. β -catenin'in N-terminal Bölgesini Etkileyebilecek Post-Translasyonel Değişikliklerin Araştırılması

CTNNB1 ekzon 3 mutasyonları tüm kolorektal kanser olgularının yalnızca %5-10'ununda görülmektedir (116). Fakat araştırma grubumuz tarafından yapılan önceki çalışmalarda, β -catenin immünohistokimyasal boyaması sonucunda kolorektal kanser olgularının %19,3'ünde ekzon 3 mutasyonunu düşündüren mutant β -catenin boyanma deseni elde edilmiştir. Literatürde paylaşılan ve bizim çalışmamızda belirlenen mutasyon yüzdesinin belirgin farklılık göstermesi nedeniyle, mutant β -catenin boyanma deseni gösteren olgularda genomik DNA ve RNA düzeyinde *CTNNB1* ekzon 3 değişiklikleri incelenmiş fakat herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir (5). Bu nedenle kolorektal kanser olgularında β -catenin N-terminal bölgeyi etkileyebilecek post-translasyonel modifikasyonların bu boyanma desenine neden olabileceği düşünülmüştür. Bu durumu açıklamak için N-terminal bölge modifikasyonuna neden olabilecek iki alternatif hipotez geliştirilmiştir (**Şekil 4.9.**): Birinci hipoteze göre yıkım kompleksi tarafından N-terminal bölge fosforilasyonu gerçekleştirilmiş olan β -catenin proteini (fosfo- β -catenin), bir şekilde proteozomal yıkımdan kaçmayı başararak nükleusta birikmektedir. Bu nedenle, yalnızca aktif (hipo-fosforile) β -catenin'i tanıyan aktif β -catenin antikoru ile boyanma gözlenmezken, C-terminali tanıyan β -catenin antikoru ile kuvvetli boyanma gözlenecektir ve böylece mutant β -catenin boyanma deseni ortaya çıkacaktır. İkinci hipoteze göre ise β -catenin'in N-terminal bölgesi enzimatik sistemler tarafından proteolitik kesime uğramaktadır ve bu nedenle fosforile olamayan β -catenin, proteozomal yıkımdan kaçarak nükleusta birikmektedir. N-terminal bölgesi olmayan β -catenin proteini aktif β -catenin antikoru ile boyanmazken, C-terminali tanıyan β -catenin antikoru boyanma gösterecektir. Sonuç olarak ikinci hipotezde de birinci hipotezde öne sürüldüğü gibi mutant β -catenin boyanma deseni ortaya çıkacaktır.



Şekil 4.9. *CTNNB1* ekzon 3 bölgesi DNA/RNA düzeyinde değişiklik göstermeyen olgularda mutant β -catenin boyanma desenini açıklamak için iki hipotez. *P* proteozom kompleksini, *makas* sembolü ise proteolitik sistemleri ifade etmektedir.

İlk hipotezimizi incelemek için kolon kanseri hastalarına ait doku örneklerini içeren 1 mm doku çapına sahip 4 adet DMD (DMD 1-4) kullanılmıştır. Kullanılan DMD'ler farklı klinik ve patolojik özelliğe sahip 205 kolon kanseri hastasının dokularını içermektedir. Kolorektal kanser hastalarında fosfo- β -catenin proteininin hücre içi dağılımını ve ifade düzeyini değerlendirebilmek için hazırlanan DMD'ler, β -catenin'i yalnızca S33, S37 ve T41 amino asitlerine fosfat grubu bağliyen tanıyan fosfo- β -catenin antikoru ile immünohistokimyasal olarak boyanmıştır. Antijen geri kazanımı sırasında ortaya çıkan doku kaybı nedeniyle 205 olgudan yalnızca 185'inde fosfo- β -catenin ifadesi değerlendirilebilmiştir. Fosfo- β -catenin ifadesi değerlendirilen 185 olgunun klinikopatolojik verileri **Tablo 4.2.**'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. Doku mikrodizinindeki 185 kolorektal kanser hastası örneğinin klinik ve patolojik özellikleri

Olguların Özellikleri	Olgu Sayısı	Yüzde (%)
Yaş (yıl); medyan (min-maks)^a	63 (24-93)	
Cinsiyet		
Kadın	61	33
Erkek	124	67
Tümör Boyutu (cm); medyan (min-maks)^b	5 (1.7-16)	
Tümörün Yerleşim Yeri		
Sağ Kolon	58	31.4
Sol Kolon	118	63.8
Transvers Kolon	8	4.3
Belirlenememiş	1	0.5
Tümör Evresi^c		
I	13	8
II	48	29.6
III	44	27.2
IV	57	35.2
Takip Süresi (yıl); medyan (min-maks)^d	4.9 (5g-16y)	
Sağ kalım Durumu		
Yaşıyor	130	70.3
Ölmüş	55	29.7
Fosfo-β-catenin Boyanması-Nükleer		
Boyanma Yok	130	70.3
Zayıf Boyanma (1+)	31	16.8
Orta Boyanma (2+)	15	8.1
Kuvvetli Boyanma (3+)	9	4.9
Fosfo-β-catenin Boyanması-Sitoplazmik		
Boyanma Yok	157	84.9
Zayıf Boyanma (1+)	21	11.4
Orta Boyanma (2+)	4	2.2
Kuvvetli Boyanma (3+)	3	1.6

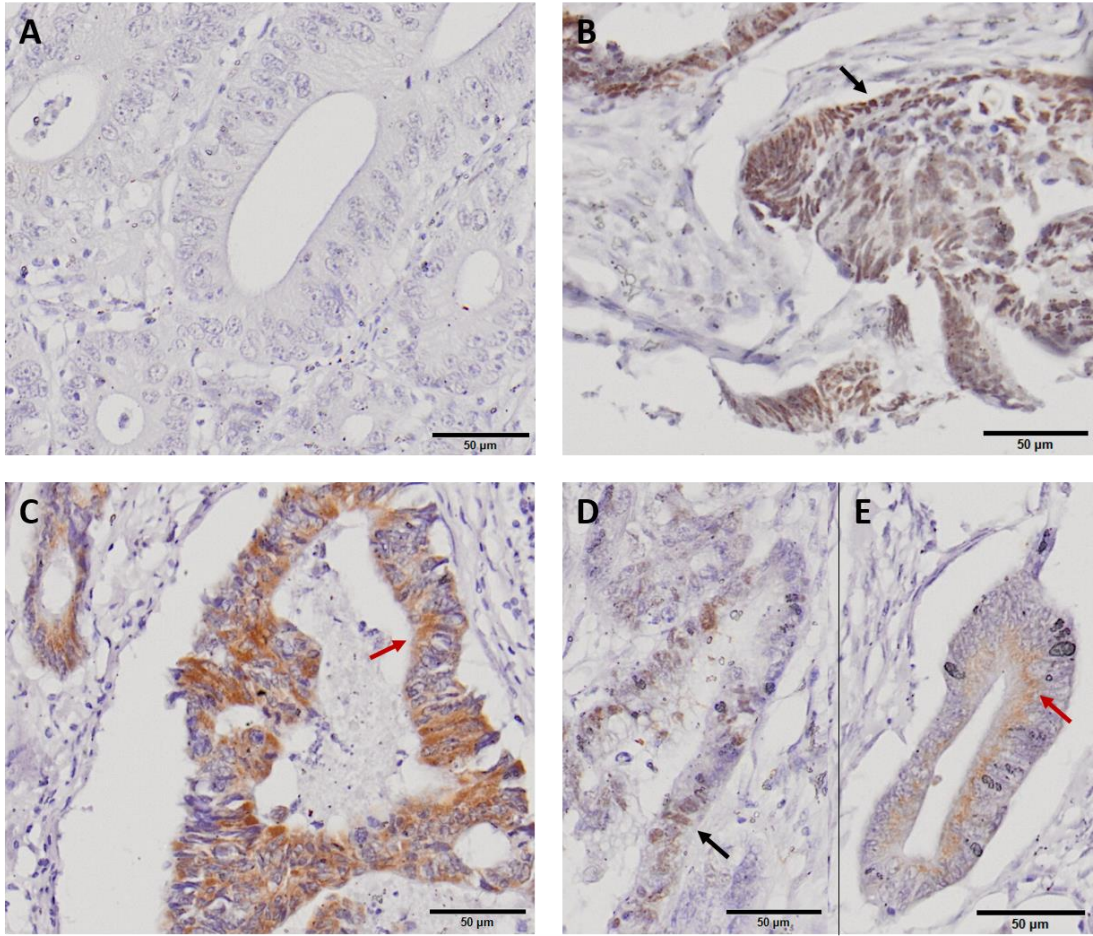
^aOlguların %99,5'i (184/185) için veri mevcut

^bOlguların %99,5'i (184/185) için veri mevcut

^cOlguların %87,6'sı (162/185) için veri mevcut

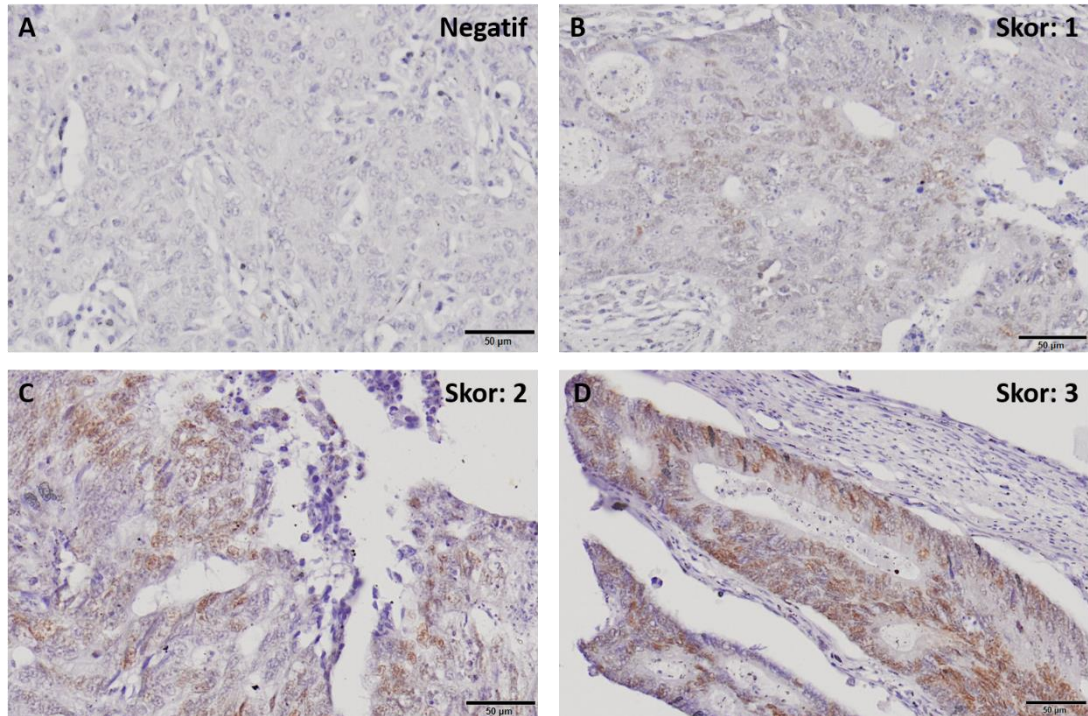
^dOlguların %98,4'ü (182/185) için veri mevcut (g: gün, y: yıl)

Fosfo- β -catenin antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamanın değerlendirilebilmesi için bir skorlama sistemi oluşturulmuştur. Bu skorlama sistemine göre ilk olarak fosfo- β -catenin ifadesinin olup olmadığı değerlendirilmiş ve eğer ifade edilmiş ise kolon kanseri hücrelerinin hangi hücre içi kompartmanında (membran, sitoplazma veya nükleus) lokalizasyon gösterdiği incelenmiştir. Bu ilk değerlendirmeye göre olguların %50'sinden fazlasında fosfo- β -catenin boyanmasının olmadığı gözlenmiştir. Fosfo- β -catenin ifadesinin görüldüğü olgularda ise proteinin ya yalnızca nükleusta ya da yalnızca sitoplazmada lokalize olduğu belirlenmiştir; sadece üç olguda hem nükleer hem de sitoplazmik fosfo- β -catenin ifadesinin bir arada bulunduğu fark edilmiştir (**Şekil 4.10.**). Tüm olguların %29,7'sinde (55/185) fosfo- β -catenin nükleer boyanma gösterirken olguların yalnızca %15,1'inde (28/185) sitoplazmik boyanma görülmüştür.



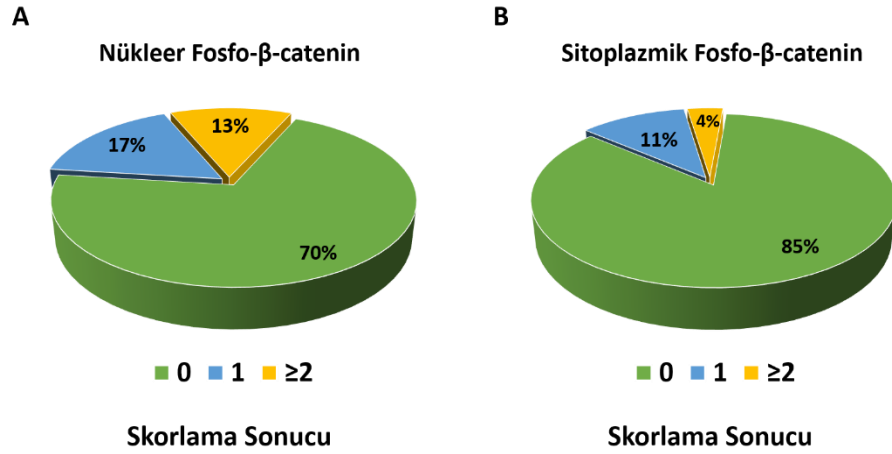
Şekil 4.10. İmmünohistokimyasal fosfo- β -catenin boyaması. Fosfo- β -catenin negatif (A), nükleer pozitif (B), sitoplazmik pozitif (C) olgular gösterilmiştir. K2GH5 kodlu olguda hem nükleer pozitiflik (D) hem de sitoplazmik pozitiflik (E) bir arada bulunmaktadır. *Siyahlr oklar* nükleer fosfo- β -catenin birikimini, *kırmızı oklar* ise sitoplazmik fosfo- β -catenin birikimini göstermektedir. Ölçek: 50 μ m.

Fosfo- β -catenin ifadesinin değerlendirilmesinde ikinci adım olarak olgular, boyanma kuvvetine göre skorlanmıştır. Hiç boyanma göstermeyen olgular negatif (0), boyanma gösteren olgular ise zayıf-orta-kuvvetli (1,2 ve 3) olacak şekilde dört skorlama grubuna ayrılmıştır (**Şekil 4.11.**).



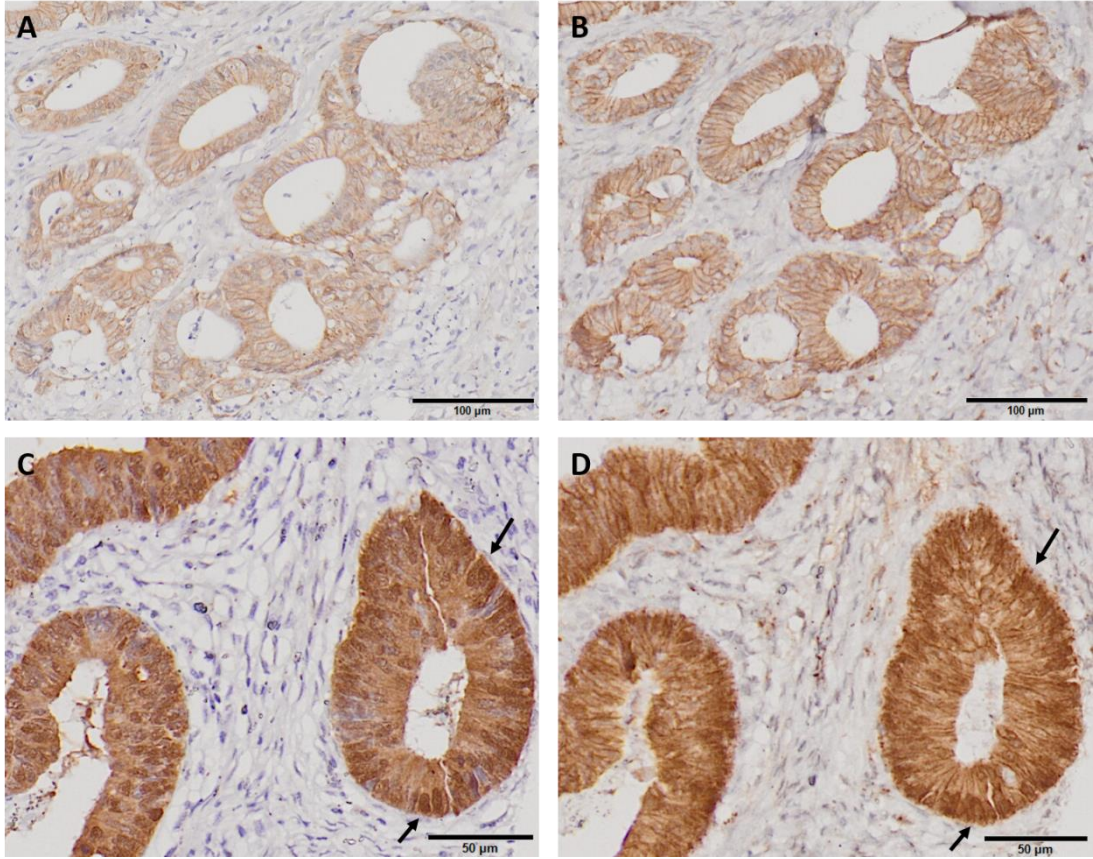
Şekil 4.11. Kolorektal kanser olgularının nükleer fosfo- β -catenin boyanma kuvvetine göre skorlanması. Ölçek: 50 μ m.

Bu skorlama sistemine göre nükleer veya sitoplazmik fosfo- β -catenin ifadesi gösteren olgular incelendiğinde, tüm olguların %13'ünde (24/185) nükleer boyanma şiddeti orta-kuvvetli (2-3) olarak belirlenmiştir (**Şekil 4.12.A**). Bu durumun aksine sitoplazmik boyanma gösteren olguların büyük bir bölümü yalnızca zayıf (1) boyanma göstermiştir (**Şekil 4.12.B**).



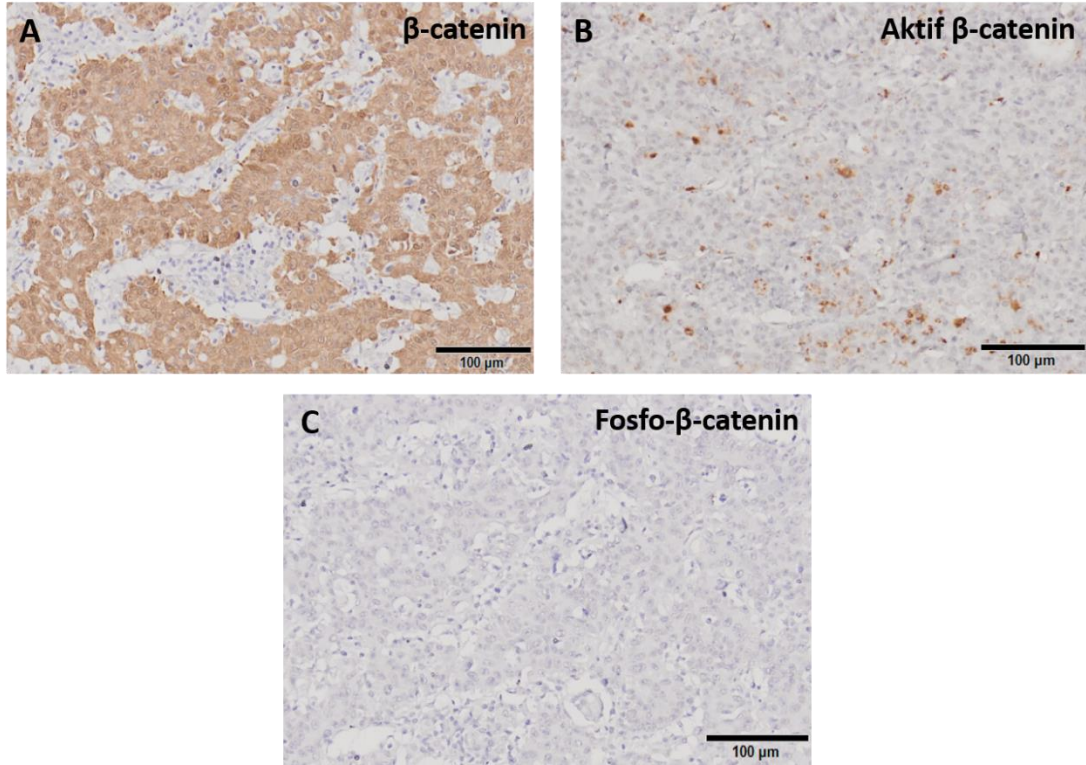
Şekil 4.12. Kolorektal kanser olgularında nükleer ve sitoplazmik fosfo-β-catenin'in boyanma şiddetine göre yapılan skorelama sonucu.

Kolorektal kanser örneklerinde fosfo-β-catenin'le birlikte diğer β-catenin formlarının hücre içerisindeki dağılımının ve ifade düzeyinin daha iyi anlaşılabilmesi için immünohistokimyasal boyamaya ek olarak immünofloresan boyama ve western blot analizi gibi diğer protein temelli tekniklerin de kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaca yönelik olarak 20 farklı kolorektal kanser hastasından taze doku örnekleri toplanarak bu hastalara ait doku örneklerini içeren 3 mm çaplı yeni bir DMD (DMD-5) oluşturulmuştur. Hazırlanan DMD-5 ilk olarak β-catenin, aktif β-catenin ve fosfo-β-catenin antikorları ile immünohistokimyasal olarak boyanmıştır. DMD-5'te yer alan her bir olguya ait β-catenin ve aktif β-catenin immünohistokimyasal boyaması değerlendirildiğinde, 18 olguda bu iki β-catenin antikor ile yapılan boyamanın benzer bir desen oluşturduğu görülmüştür. Bu 18 olgunun bir kısmında her iki antikorla yapılan boyamada da yalnızca membranöz β-catenin ifadesi tespit edilmişken (**Şekil 4.13.A,B**); diğer olgularda ise her iki antikorla yapılan boyamada da β-catenin'in sitoplazmada ve nükleusta birikim gösterdiği fark edilmiştir (**Şekil 4.13.C,D**).



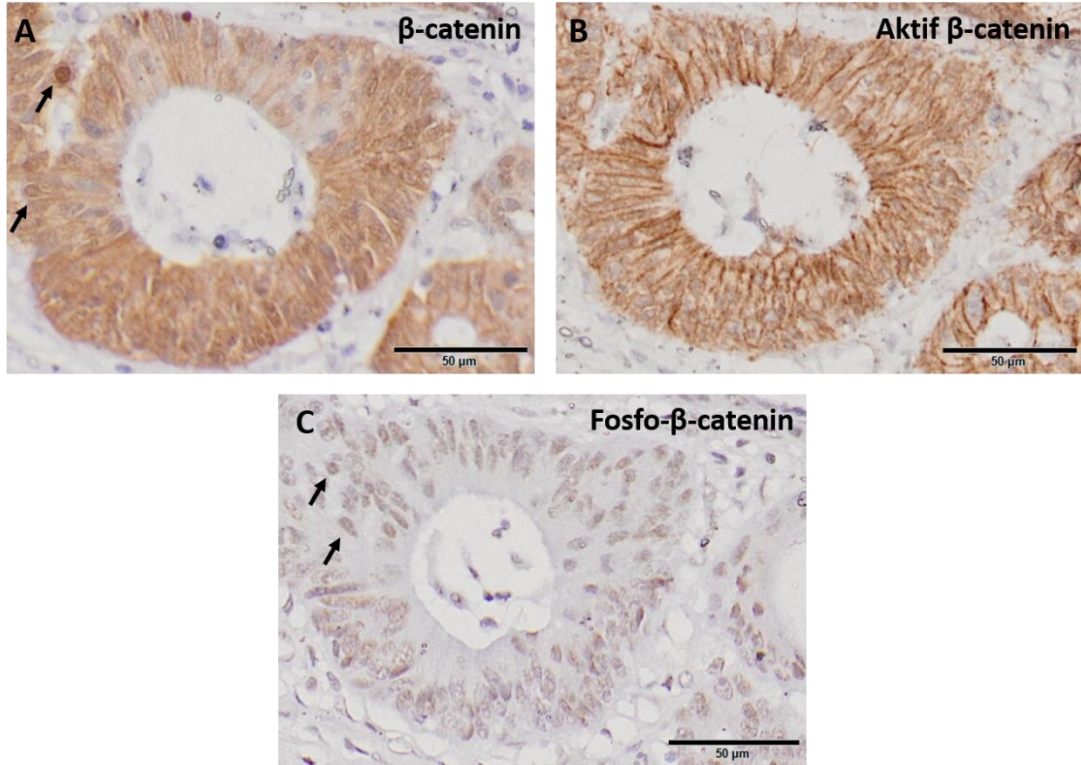
Şekil 4.13. DMD-5'in β -catenin ve aktif β -catenin antikorumu ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucu. K12D56 kodlu olgunun β -catenin (A) ve aktif β -catenin antikoru (B) ile yapılan immünohistokimyasal boyaması. Ölçek: 100 μ m. K12C12 kodlu olgunun β -catenin (C) ve aktif β -catenin antikoru (D) ile yapılan immünohistokimyasal boyaması. Oklar nükleer β -catenin birikimini göstermektedir. Ölçek: 50 μ m.

DMD-5'te yer alan iki olgu ise, diğer olgulardan farklı olarak β -catenin ve aktif β -catenin antikorumu ile ortaya çıkan boyama deseni açısından farklılık göstermektedir. Bu olgulardan ilkinde β -catenin antikoru ile kuvvetli sitoplazmik ve nükleer boyanma görülürken, aktif β -catenin antikoru ile boyanma gözlenmemiştir (**Şekil 4.14.A,B**). Daha önce açıklandığı üzere β -catenin antikorumunun bağlandığı epitoplara farklı olması sonucunda ortaya çıkan bu durum mutant β -catenin boyanma deseni olarak tanımlanmaktadır ve tipik boyanma desenine sahip olan bu olgu fosfo- β -catenin boyaması açısından da negatiftir (**Şekil 4.14.C**).



Şekil 4.14. K12C78 kodlu kolorektal kanser olgusuna ait β -catenin, aktif β -catenin ve fosfo- β -catenin immünohistokimyasal boyaması. Ölçek: 100 μ m.

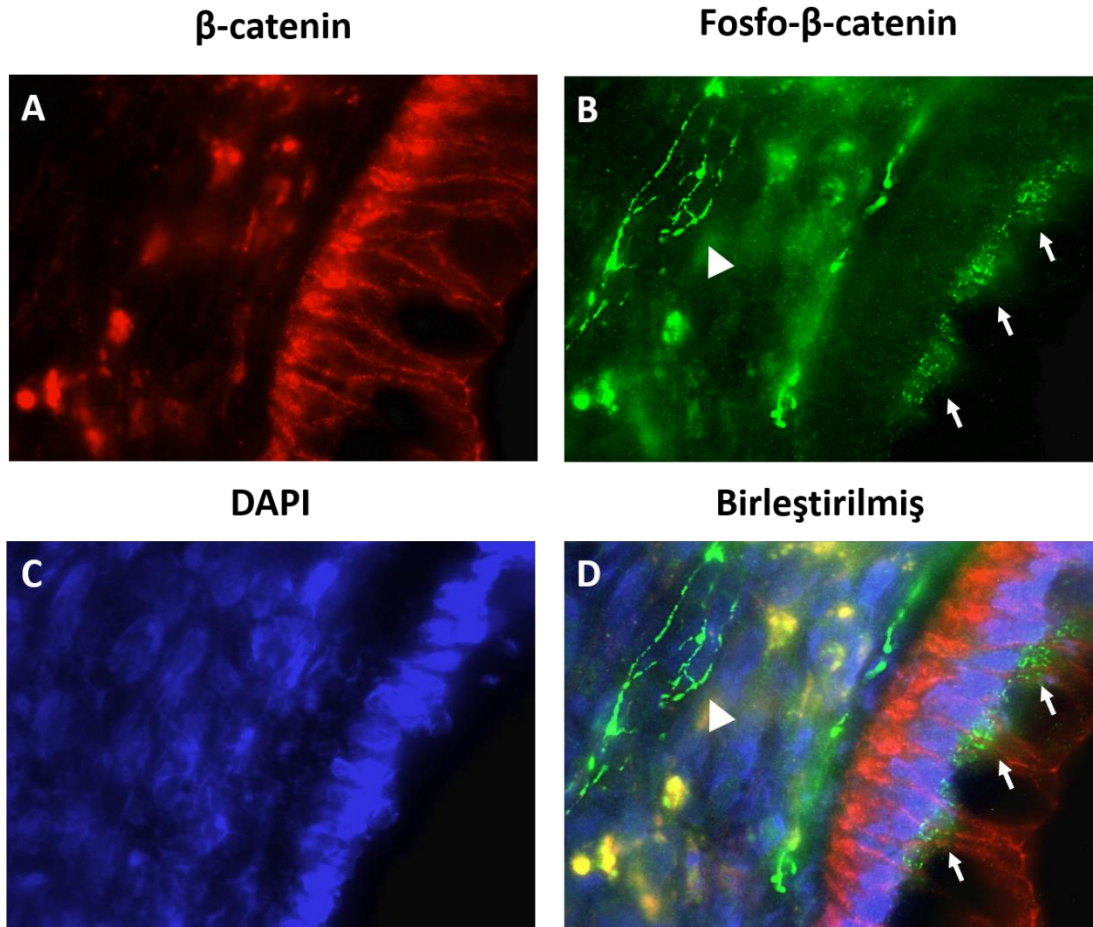
β -catenin ve aktif β -catenin antikoru ile ortaya çıkan boyama deseni açısından farklılık gösteren ikinci olguda da ilkin benzer şekilde mutant β -catenin deseni olduğu fark edilmiştir. Bu olguda β -catenin antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda kuvvetli sitoplazmik boyanmanın yanı sıra hücrelerin bir kısmında nükleer β -catenin birikimi görülmüştür (**Şekil 4.15.A**). Bu durumun aksine aktif β -catenin antikoru ile yapılan boyamada ise yalnızca membranda lokalize olan β -catenin'den sinyal elde edilebilmiştir (**Şekil 4.15.B**). İlk olgunun aksine bu olguda nükleer fosfo- β -catenin birikimi olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 4.15.C**) ve bu bulgu, nükleer fosfo- β -catenin birikiminin mutant β -catenin boyanma desenine neden olabileceği hipotezini desteklemektedir.



Şekil 4.15. K12A78 kodlu kolorektal kanser olgusuna ait β -catenin, aktif β -catenin ve fosfo- β -catenin immünohistokimyasal boyaması. Ölçek: 50 μ m.

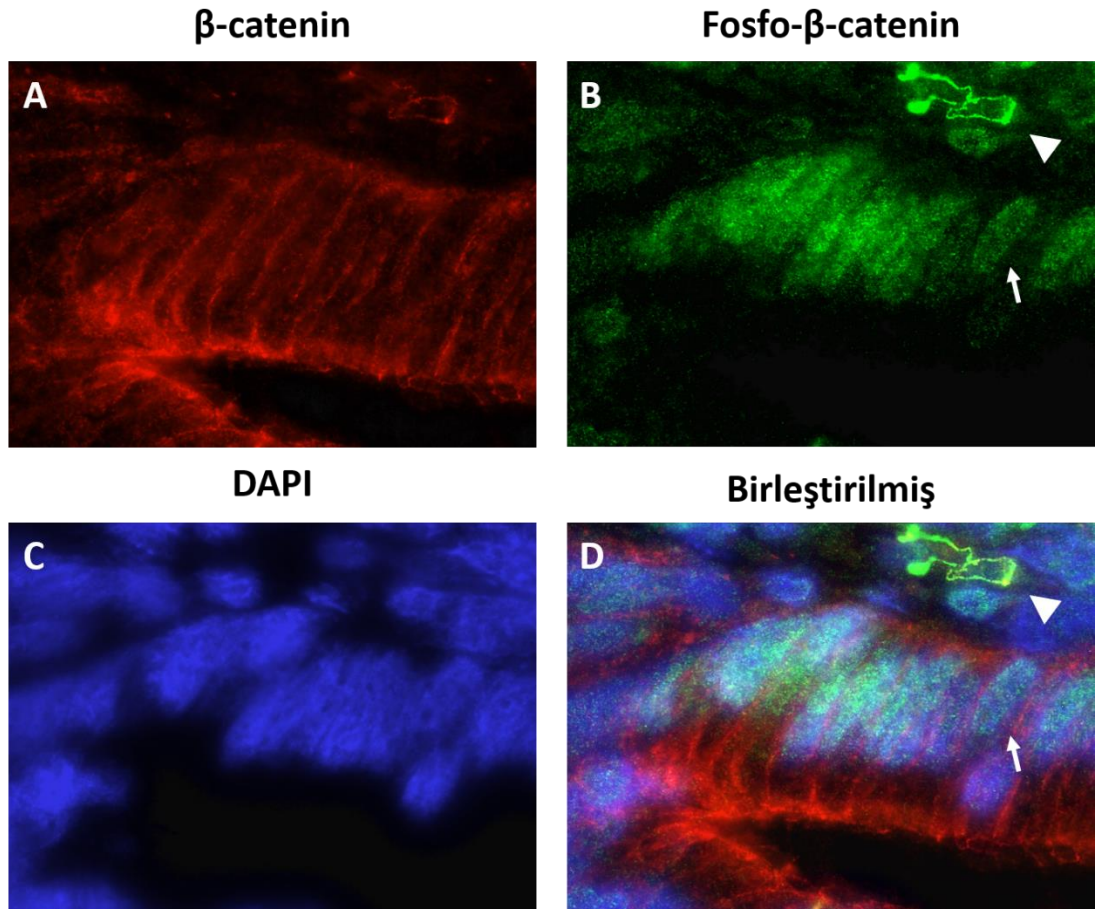
4.2.1. Fosfo- β -catenin'in Hücre İçi Yerleşiminin İmmünofloresan Boyama ile İncelenmesi

Fosfo- β -catenin'in hücre içerisindeki yerleşimini daha detaylı değerlendirebilmek için kolon kanser hastalarına ait normal kolon epiteli ve kanser doku örnekleri, β -catenin ve fosfo- β -catenin antikolarıyla immünofloresan olarak boyanmıştır. Normal kolon dokusunun β -catenin antikoru ile boyanması sonucunda, β -catenin'in normal kolon epitelinin membranına difüz olarak lokalize olduğu gösterilmiştir (**Şekil 4.16.A,D**). β -catenin'in aksine fosfo- β -catenin'in ise normal kolon epitel hücrelerinin apikalinde sitoplazmik olarak konumlandığı ve burada punktat bir boyanma deseni (**beyaz oklar**) oluşturduğu tespit edilmiştir (**Şekil 4.16.B,D**). Benzer bulgular immünofloresan yöntemle boyanan tüm normal kolon dokularından elde edilmiştir.



Şekil 4.16. Normal kolon dokusunun β -catenin ve fosfo- β -catenin antikorlarıyla yapılan immüno Floresan boyanma sonucu. *Beyaz oklar* sitoplazmik fosfo- β -catenin birikimini göstermektedir. *Beyaz ok başı* fosfo- β -catenin'in vasküler yapılardaki lokalizasyonunu belirtmektedir.

Kolorektal kanser olgularına ait kanser dokusu örnekleri β -catenin ve fosfo- β -catenin antikorlarıyla boyandığında ise farklı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan immüno Floresan boyamada normal kolon epiteline benzer şekilde β -catenin'in, kanser hücrelerinin membranında lokalize olduğu gösterilmiştir (**Şekil 4.17.A,D**). Fakat normal kolon epitelinin aksine fosfo- β -catenin'in, kanser hücrelerinin sitoplazmasında bulunmadığı ve yalnızca çekirdek içerisinde birikim gösterdiği fark edilmiştir (**beyaz oklar**). Çekirdekte bulunan bu fosfo- β -catenin'in normal epitel hücrelerine benzer bir şekilde punktat boyanma deseni gösterdiği de tespit edilmiştir (**Şekil 4.17.B,D**). İlginç olarak fosfo- β -catenin ifadesi normal kolon epiteliyle veya neoplastik hücrelerle sınırlı olmayıp, bağ dokuda yer alan vasküler yapılarda da görülmüştür (**beyaz ok başları**).

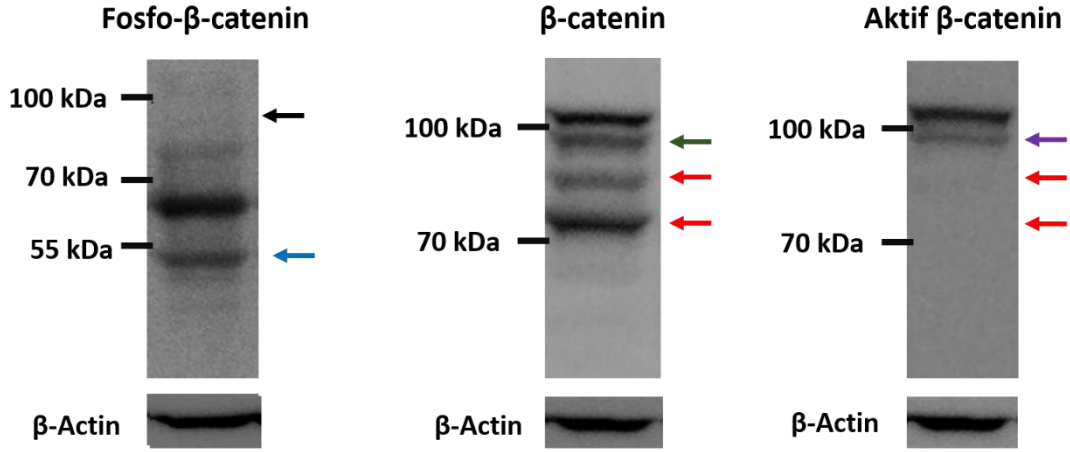


Şekil 4.17. Kolon kanseri dokusunun farklı β -catenin antikorlarıyla yapılan immünofloresan boyanma sonucu. KA4 kodlu kolorektal kanser olgusuna ait kanser dokusu fosfo- β -catenin ve β -catenin antikorları ile immünofloresan olarak boyanmıştır. *Beyaz oklar* nükleer fosfo- β -catenin birikimini göstermektedir. *Beyaz ok başı* fosfo- β -catenin'in vasküler yapılarıdaki lokalizasyonunu belirtmektedir. (A-D).

4.2.2. Fosfo- β -catenin, β -catenin ve Aktif- β -catenin İfadesinin Western Blot ile Değerlendirilmesi

Yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucunda hem normal dokuda hem de kanser dokusunda β -catenin ifadesinin membran ile sınırlı olduğu görülmüştür ve fosfo- β -catenin ile kolokalizasyon göstermemiştir. β -catenin ve fosfo- β -catenin antikorları, aynı β -catenin proteinin iki farklı terminal bölgesindeki epitoplari tanıyacak şekilde geliştirilmiştir ve bu nedenle iki antikorum kolokalizasyon göstermemesi C-terminal bölgesi olmayan farklı moleküler boyuta sahip β -catenin formlarının olabileceğini düşündürmüştür. Bu hipotezi incelemek için, KA4 kodlu aynı

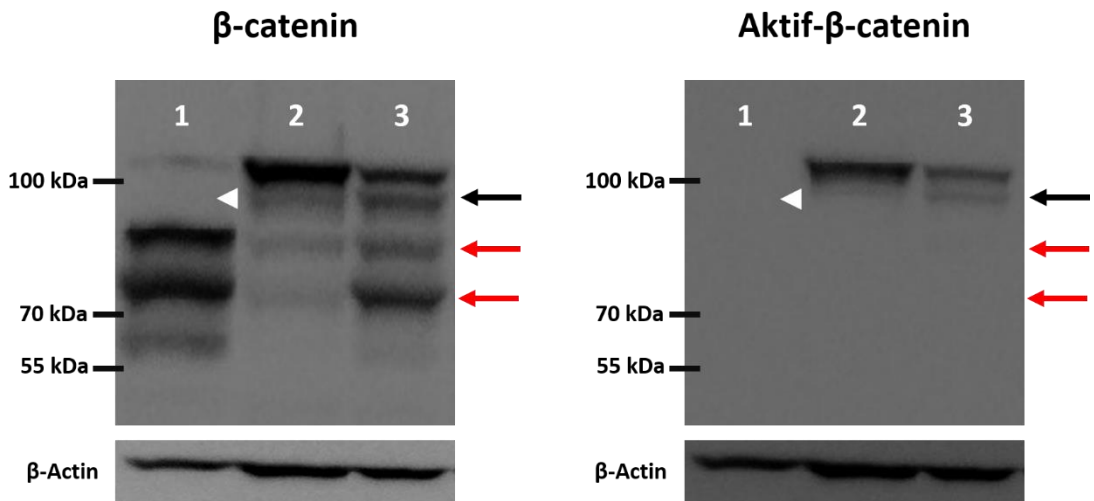
kolorektal kanser olgusundan hazırlanan protein lizati üç farklı β -catenin antikoru ile western blot yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir (**Şekil 4.18.**).



Şekil 4.18. Kolon kanseri dokusunun farklı β -catenin antikolarıyla yapılan western blot analizi sonucu. KA4 kodlu kolorektal kanser dokusundan elde edilen total protein lizati, farklı β -catenin formlarını tanıyan üç antikorla western blot yöntemi kullanılarak incelenmiştir. *Siyah, yeşil ve mor ok* yaklaşık 92 kDa ağırlığındaki β -catenin bandının yerini göstermektedir. *Kırmızı oklar*, 75 ve 85 kDa ağırlığındaki β -catenin bantlarını göstermektedir ve bu bantların aktif- β -catenin antikoru ile yapılan western blot analizinde kaybolduğu görülmektedir. *Mavi ok*, Ig ağır zincirini göstermektedir.

Fosfo- β -catenin antikoru ile yaklaşık olarak 60 kDa ve 80 kDa arasında iki bant tespit edilmiştir. 92 kDa ağırlığındaki normal fosfo- β -catenin bandı oldukça zayıf sinyal vermiştir (**siyah ok**) ve yalnızca pozlama süresinin uzatılması ile görünür hale gelmiştir. Daha sonra aynı membranın β -catenin antikoru kullanılarak yapılan western blot analizinde ise 75 kDa ile 110 kDa arasında değişen dört farklı β -catenin bandı gösterilmiştir. Normal boyutlardaki β -catenin proteini için beklenen moleküler ağırlık olan 92 kDa da β -catenin antikoru ile yapılan deneyde gösterilebilmiştir (**yeşil ok**). İlginç olarak aynı membranın, β -catenin proteininin N-terminal bölgesini tanıyan aktif β -catenin antikoru ile yapılan western blot analizinde ise β -catenin antikoru ile elde edilen yaklaşık olarak 75 kDa ve 85 kDa ağırlığındaki iki bant kaybolmuştur (**kırmızı oklar**). Hem β -catenin hem de aktif β -catenin antikoları ile yapılan western blot analizinde beklenen 92 kDa ağırlığındaki β -catenin bandı beklenildiği gibi tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra her iki β -catenin antikoru ile yapılan deneyde de yaklaşık 110 kDa ağırlığında ekstra bir bant daha tespit edilmiştir.

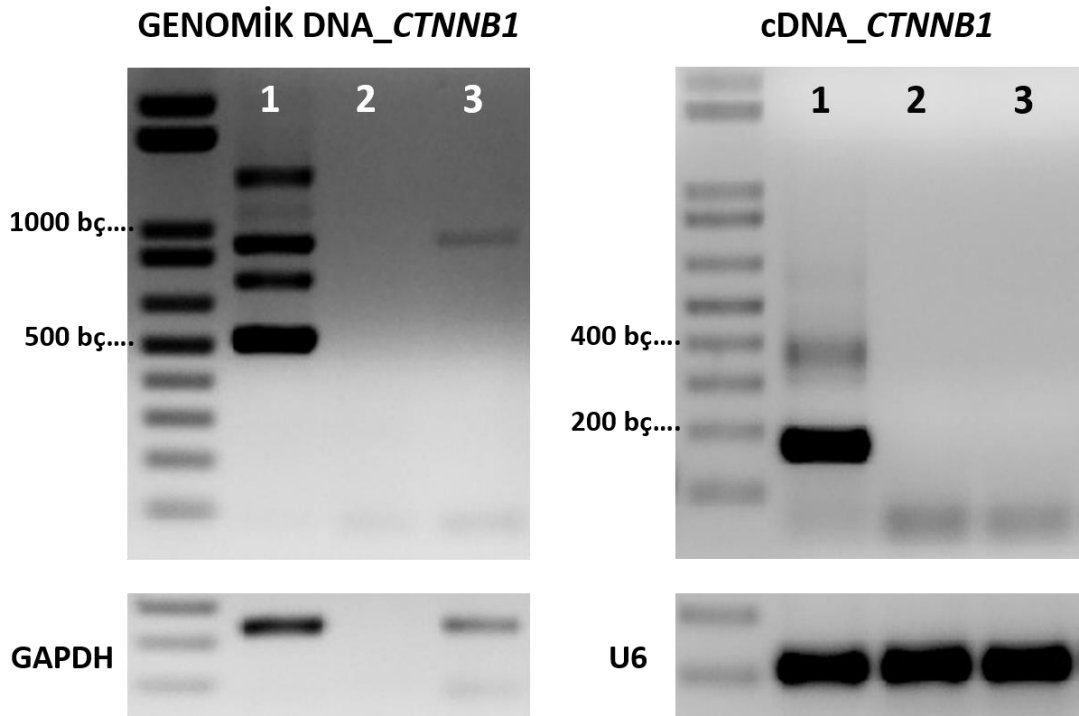
β -catenin antikoru ile yapılan western blot analizinde ortaya çıkan fakat aktif- β -catenin antikoru ile yapılan deneyde ise kaybolduğu gösterilen 75 kDa ve 85 kDa ağırlığındaki iki bandın varlığının, farklı kolorektal kanser olgularına ait doku örneklerinde de incelenmesine karar verilmiştir. Farklı kolorektal kanser olgularına ait protein lizatlarıyla yapılan western blot deneylerinde de 75 kDa ve 85 kDa ağırlığındaki bantların β -catenin antikoru ile ortaya çıktığı, fakat bu bantların aktif β -catenin antikoru ile yapılan analizlerde kaybolduğu gösterilmiştir (**Şekil 4.19.**).



Şekil 4.19. Farklı kolorektal kanser olgularının β -catenin ve aktif β -catenin antikorumu ile yapılan western blot analizi. Farklı kolorektal kanser olgularına ait kanser dokularından elde edilen protein lizatları β -catenin ve aktif β -catenin antikorumu ile western blot yöntemi kullanılarak incelenmiştir. *Siyah oklar*, 92 kDa ağırlığındaki beklenen moleküler ağırlıktaki β -catenin proteinini göstermektedir. *Kırmızı oklar*, 75 ve 85 kDa ağırlığındaki β -catenin bantlarını göstermektedir ve bu bantların aktif- β -catenin antikoru ile yapılan western blot analizinde kaybolduğu görülmektedir. *Beyaz ok başı* 92 kDa ağırlığındaki beklenen β -catenin bandının olgu 1’de olmadığını göstermektedir.

İlginç olarak bir olguya ait protein lizatında (olgu 1) 92 kDa ağırlığındaki beklenen β -catenin bandı hem β -catenin hem de aktif- β -catenin antikorumu ile yapılan western blotlar deneylerinde gösterilememiştir (**beyaz ok başı**). Bu nedenle olgu 1 ait genomik DNA veya RNA’da, normal moleküler ağırlığa sahip β -catenin proteininin ifade edilmesine engel olacak genetik bir değişikliğin olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla *CTNNB1* ekzon 3 bölgesi, ekzon 2 ve ekzon 4’e ait DNA/cDNA dizisini tanıyacak primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. Beklenen normal ampikon boyutu

DNA örnekleri ile yapılan PZR için 931 baz çifti, cDNA örnekleri ile yapılan RT-PZR için 404 baz çifti olmasına rağmen olgu 1’de hem DNA hem de cDNA düzeyinde beklenenden kısa PZR ürünleri gözlenmiştir (**Şekil 4.20.**). Olgu 2’ye ait genomik DNA izolasyonu GAPDH primeri ile onaylanamamıştır, cDNA örnekleri ile yapılan RT-PZR sonucunda ise *CTNNB1*’de benzer bir delesyon gözlenmemiştir. Olgu 3’e ait genomik DNA örneğinde beklenen 931 baz çiftlik normal ampikon tespit edilmekle birlikte olgu 1’dekine benzer bir delesyon görülmemiştir.

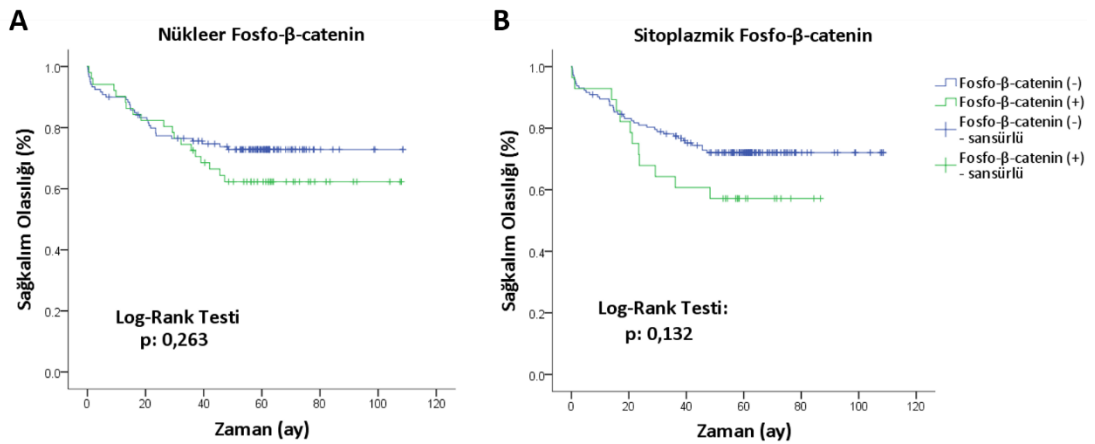


Şekil 4.20. Farklı kolorektal kanser olgularında ekzon 3 mutasyonlarının genomik DNA ve cDNA düzeyinde incelenmesi. GAPDH primeri yapılan PZR genomik DNA izolasyonunu doğrulamak için, U6 primeri ile yapılan RT PZR ise cDNA sentezini doğrulamak için yapılmıştır. bç: baz çifti.

Sonuç olarak bu bulgu, olgu 1’e ait kolorektal kanser dokusunda *CTNNB1* ekzon 3 bölgesinin interstisiyel delesyon sonucu kaybolduğunu göstermektedir. 228 baz çifti uzunluğundaki ekzon 3’ün kaybolması, moleküler ağırlığı 92 kDa olan β -catenin proteininin yaklaşık olarak 8,5 kDa kılmasına neden olacaktır ve bu nedenle β -catenin antikoru ile yapılan western blot analizinde (**Bkz. Şekil 4.19.**) yaklaşık 85 kDa tespit edilmesi beklenen bir bulgudur.

4.2.3. Nükleer ve Sitoplazmik Fosfo- β -catenin İfadesinin Kolorektal Kanser Olgularının Sağkalımına Etkisi

Son olarak immünohistokimyasal boyama ile gösterilen fosfo- β -catenin ifadesinin kolorektal kanser olgularının genel sağkalımı ile ilişkisi araştırılmıştır. İmmünohistokimyasal boyama sonucunda nükleer veya sitoplazmik fosfo- β -catenin birikimi gösteren olgular, boyanma göstermeyen (negatif = 0) ve zayıf-orta-kuvvetli boyanma gösteren (pozitif = ≥ 1) olacak şekilde iki gruba ayrılmıştır. Bu iki grubun karşılaştırıldığı Kaplan-Meier analizi sonucunda nükleer fosfo- β -catenin ($p=0,263$) (**Şekil 4.21.A**) veya sitoplazmik fosfo- β -catenin ifadesinin ($p=0,132$) (**Şekil 4.21.B**) genel sağkalıma etkisi olmadığı gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Fosfo- β -catenin ifadesinin kolorektal kanser olgularında sağkalıma etkisi. Nükleer fosfo- β -catenin'in kolorektal kanser hastalarında sağkalıma etkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi. Mavi eğri nükleer boyanmanın olmadığı (0) olguları gösterirken, yeşil eğri zayıf-orta-kuvvetli (≥ 1) boyanmayı belirtmektedir (A). Sitoplazmik fosfo- β -catenin'in kolorektal kanser hastalarında sağkalıma etkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi. Mavi eğri nükleer boyanmanın olmadığı (0) olguları gösterirken, yeşil eğri zayıf orta-kuvvetli (≥ 1) boyanmayı belirtmektedir (B).

5. TARTIŞMA

Tez çalışmasının birinci bölümünü oluşturan ve SANT doku örneklerini kullanarak yaptığımız araştırmayla, tanımlamış olduğumuz β -catenin immünohistokimyasal boyama yönteminin etiyojisi ve patogenezi bilinmeyen tümörlerde N-terminal bölge değişikliklerinin incelenmesi için kullanılabileceğini göstermiş olduk. Son yıllarda yapılan çalışmalar, *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının juvenil nazofaringeal anjiyofibroma, sinonazal hemanjiyoperisitom veya akciğerin sklerozan hemanjiyomu gibi bazı nadir fibrovasküler lezyonların patogeneğinde önemli rol oynayabileceğini göstermiştir (137–139). WNT/ β -catenin sinyal yolağının fibrozisi desteklediği ve fibrozisle ilerleyen çok sayıda hastalıkla ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (140); bu nedenle nadir görülen ve fibrozis ile karakterize olan dalağın fibrovasküler lezyonu SANT, β -catenin N-terminal bölge değişikliklerinin araştırılması için seçilmiştir.

Bu amaçla ilk olarak, histopatolojik ve immünofenotipik olarak SANT tanısının kesinleştirildiği doku örneklerinde, daha önceki çalışmamızda tanımlamış olduğumuz (5) immünohistokimyasal boyama yöntemini kullanarak β -catenin N-terminal bölge değişiklikleri araştırılmıştır. Yaptığımız immünohistokimyasal boyama sonucunda olguların tamamında mutant β -catenin boyanma deseni olarak adlandırdığımız ve SANT olgularının *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonu taşıdığını düşündüren boyanma görünümü elde edilmiştir. Uyguladığımız bu yaklaşım, ekzon 3 mutasyonlarının moleküler yöntemlerle detaylı analizi öncesinde uygulanabilecek pratik bir mutasyon tarama stratejisi olarak tercih edilmiştir.

Nokta mutasyonları, *CTNNB1* ekzon 3'ü etkileyen mutasyonların yaklaşık olarak %90'ını oluşturmaktadır (101), fakat yapılan Sanger sekans analizi sonucunda SANT olgularının hiçbirinin nokta mutasyonu taşımadığı gösterilmiştir. Bu nedenle ikinci adım olarak bu olgularda delesyon analizi yapılmıştır ve üç SANT olgusunda ekzon 3'ün tamamının kaybına neden olan geniş interstisyel delesyonlar tespit edilmiştir. *CTNNB1* ekzon 3'ün kaybına neden olan geniş delesyonların neoplazi gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Bu delesyonlar, β -catenin N-terminal bölgede yer alan ve proteinin protezomal olarak yıkılmasını sağlayan kritik amino asit dizisinin

tamamen kaybolmasına neden olmaktadır. Bu durum β -catenin'in stabilizasyonu, nükleusa geçişi ve WNT sinyal yolağının hiperaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (141,142). Çalışma sonucunda elde edilen bir diğer önemli bulgu ise delesyon tespit edilen SANT olgularından iki tanesindeki (olgu 1 ve olgu 3) delesyonun, intronik bölgelerde yer alan 5' ve 3' uçlarındaki kırılma noktalarının aynı olmasıdır. Aynı delesyonun iki farklı olguda tespit edilmiş olması, bu genetik değişikliğin SANT hastalığının patogenezinde kritik bir görevi olduğunu düşündürmektedir.

Yedi olgudan dört tanesinde (olgu 4-7) ekzon 3'ün genomik delesyonu gösterilememiştir, fakat bu olgulara ait cDNA örnekleri incelendiğinde ekzon 3 kaybının olduğu tespit edilmiştir. Dört olguda genomik DNA düzeyinde delesyon tespit edilememesine rağmen mRNA seviyesinde ekzon 3'ün kaybolduğunun belirlenmesi, sonuçlar arasında önemli bir uyumsuzluk olduğuna işaret etmektedir. Bu uyumsuzluğun birkaç olası nedeni bulunmaktadır. Bu olasılıklardan ilki FFPG doku örneklerinden izole edilen DNA'nın kırılmaya uğraması ve ancak kısa DNA fragmanlarının PZR ile çoğaltılabilir duruma gelmesidir. Özellikle formalin fiksasyonunun kalitesi ile ilişkili olan bu durum elde edilen DNA kalitesini doğrudan etkilemektedir (141, 142). Çalışmada kullanılan SANT olguları farklı zamanlarda tanı almıştır ve her olguya ait doku bloğu üç farklı üniversite hastanesinin patoloji departmanına ait arşivden elde edilmiştir. Bu nedenle her bir olguya ait doku örneğinin farklı fiksasyon kalitesine ve bunun bir sonucu olarak farklı DNA kalitesine sahip olması beklenen bir durumdur. Olgulara ait genomik DNA kullanılarak yapılan PZR sonucunda 931 baz çiftlik normal amplikon, olgu 6 dışında hiçbir SANT olgusunda gösterilememiştir. DNA kırılmasına bağlı gerçekleştiği düşünülen bu durum FFPG doku örnekleri ile çalışmanın teknik zorluğunu göstermektedir ve dört SANT olgusunda mRNA seviyesinde ekzon 3 kaybı bulunmasına rağmen neden genomik DNA ile yapılan PZR'de ürün elde edilemediğini açıklamaktadır.

Genomik DNA ve mRNA sonuçları arasındaki farklılığın bir diğer nedeni ise *CTNNB1* ekzon 3 bölgesinin "ekzon atlama" gibi alternatif *splicing* mekanizmaları ile kaybı olabilir. Ekzon atlama sonucu, kritik ekzonların olmadığı mRNA transkriptlerinin üretiminin, farklı organlardan köken alan çok sayıda neoplastik hastalığın gelişiminde

rol oynadığı gösterilmiştir (145–147). İnsan örneklerinde bu *splicing* mekanizmasının *CTNNB1* ekzon 3'ün kaybına neden olduğu henüz gösterilmemiş olsa da, *in vitro* deneylerde, *CTNNB1* geninin intronik bölgelerinde CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak ekzon atlama motifleri yaratılabildiği ve bu sayede ekzon 3 taşımayan onkojenik β -catenin formlarının oluşturulabildiği kanıtlanmıştır (148).

Bugüne kadar SANT hastalığının etiopatogenezini açıklamaya çalışan bir dizi çalışma gerçekleştirilmiştir, fakat yapılan çalışmaların hiçbiri bu hastalığın oluşum mekanizmasını açıklamaya yakın değildir. İlk olarak Martel ve ark. (136) anormal stromal hücre proliferasyonunun, küçük damar yapılarını tıkayarak anjiyomatoid nodüllerin oluşumunu tetikleyebileceğini öne sürmüştür ve damarlardan yeterli kan akışının uzun süreli bozulması sonucunda ise nodülleri çevreleyen fibrotik alanların ortaya çıkabileceğini belirtmiştir. Bu çalışmayı takip eden diğer araştırmalarda ise SANT olgularında EBV (Epstein-Barr Virüsü) pozitif stromal hücrelerin bulunduğu bildirilmiş ve bu hastalığın EBV ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (149,150). SANT'ın etiolojisini açıklamaya çalışan diğer çalışmalarda ise stromal alanda IgG4 pozitif plazma hücrelerinin yer aldığı bildirilmiştir ve bu hastalığın IgG4 ilişkili hastalık grubu içerisinde yer alabileceği düşünülmüştür (150,151). Fakat yapılan bu çalışmaların hiçbiri SANT'ın nasıl ortaya çıktığını tam olarak açıklamayı başaramamıştır. Bu çalışmaların neredeyse tamamı SANT'ı, damar hasarına ikincil olarak gelişen ve immün sistemin bu cevaba reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan immünreaktif bir hastalık olarak kabul etmiştir. Buna karşın bizim bulgularımız, çalışmaya dahil edilen tüm SANT olgularında somatik bir değişiklik olduğunu göstermiştir ve SANT'ın reaktif bir hastalık değil, neoplastik bir hastalık olduğunu destekleyen önemli bir kanıt sunmuştur. Yakın zamanlı bir çalışmada X kromozom inaktivasyonuna dayalı bir yöntem (HUMARA analizi) kullanılarak SANT'ın monoklonal bir hastalık mı yoksa poliklonal bir hastalık mı olduğu incelenmiştir ve bizim çalışmamızın gösterdiğinin aksine bu hastalığın poliklonal reaktif bir hastalık olduğu öne sürülmüştür (152). Bizim çalışmamızla yapılan bu çalışma arasındaki uyumsuzluğun nedenini belirlemek zor olmakla beraber şu şekilde bir açıklama getirilebilir: Araştırma kapsamında oluşturduğumuz çalışma grubumuz histopatolojik

ve immünofenotipik olarak belirgin SANT morfolojisini taşımaktadır; fakat çalışmaya dahil ettiğimiz olgular, hastalığın *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonu sonucu ortaya çıkan farklı bir alt grubunu temsil ediyor olabilir. Bu hipotezi destekleyen ilginç bir bulgu, SANT hastalığına histopatolojik ve immünofenotipik olarak oldukça benzeyen, dalağın nadir vasküler hastalıklarından biri olan kord kapiller hemanjiyom (KKH) olgularının HUMARA yöntemiyle klonalitesinin incelenmesi sonucunda elde edilmiştir. Bu çalışma ile SANT'a büyük benzerlik gösteren KKH'nin, monoklonal bir hastalık olduğu anlaşılmıştır (153,154). Bu bulgudan yola çıkarak dalağın bu iki nadir lezyonun, WNT sinyal yolağının hiperaktivasyonu ile ilişkili benzer histogenetik mekanizmalar sonucu ortaya çıktığı düşünülebilir. Bu nedenle SANT hastalığının daha iyi anlaşılabilmesi için benzer morfolojik özelliklere sahip olgular daha geniş vaka serilerinde *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonu varlığı açısından detaylı incelenmelidir ve ek olarak farklı sinyal yollarındaki bozuklukların da hastalığın etiopatogenezine katkıları araştırılmalıdır.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde, önceden tanımlamış olduğumuz mutant β -catenin deseni ile β -catenin'in post-translasyonel modifikasyonları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu amaçla ilk olarak S33, S37 ve T41 amino asitlerinden fosforilasyona uğramış β -catenin'in (fosfo- β -catenin) kolorektal kanser olgularındaki ifade düzeyi ve hücre içi dağılımı değerlendirilmiştir. WNT sinyal yolağı bozukluklarının olmadığı normal dokularda fosfo- β -catenin, proteazom kompleksi tarafından sitoplazmik olarak hızla yıkılmaktadır ve bu nedenle kısa bir yarı ömre sahiptir. Bununla birlikte bazı çalışmalar, fosfo- β -catenin lokalizasyonunun sitoplazma ile sınırlı olmadığını, hücre çekirdeğinde veya membranında da lokalizasyon gösterebileceğini öne sürmüştür (155,156). Çalışmamızda, kolorektal kanser olgularının yaklaşık %30'unda immünohistokimyasal boyama ile nükleer fosfo- β -catenin birikimi gösterilmiştir ve nükleer birikim gösteren olguların yaklaşık olarak yarısında (tüm olguların %13'ü) orta-kuvvetli fosfo- β -catenin boyanması tespit edilmiştir. Chung ve ark. (135) tarafından gerçekleştirilen ve 650 kolorektal kanser olgusunu içeren çalışmada da immünohistokimyasal boyama sonucunda benzer sıklıkta nükleer fosfo- β -catenin ifadesi gösterilmiştir. Fakat bu çalışmada fosfo- β -catenin lokalizasyonu nükleusla sınırlıyken, bizim çalışmamızda olguların yaklaşık %15'inde sitoplazmik fosfo- β -

catenin boyanması tespit edilmiştir. İnvazif meme kanseri doku örneklerinin incelendiği bir çalışmada, nükleer fosfo- β -catenin birikimi agresif tümör fenotipi ile ilişkilendirilirken, fosfo- β -catenin'in sitoplazmik lokalizasyonunun daha az agresif tümör fenotipine neden olduğu öne sürülmüştür (157). Kolorektal kanser örnekleri kullanarak gerçekleştirdiğimiz çalışmada fosfo- β -catenin'in hücre içi lokalizasyonu ile tümör fenotipi arasında belirgin bir ilişki gözlenmemiştir. Nükleer ve sitoplazmik fosfo- β -catenin ifadesinin yalnızca üç olguda eş zamanlı bulunması, sitoplazmik fosfo- β -catenin birikiminin nükleer birikimden farklı bir mekanizma sonucunda ortaya çıktığını düşündürmüştür.

Kolorektal kanser olgularında fosfo- β catenin birikimini hücresel düzeyde daha detaylı değerlendirebilmek için 20 kolorektal kanser olgusundan taze normal kolon ve kanser dokusu toplanmış ve bu olgulardan yeni bir DMD (DMD-5) oluşturulmuştur. İlk olarak farklı β catenin formlarının birbirleri ile ilişkisini incelemek amacıyla DMD-5; β catenin, aktif β -catenin ve fosfo- β catenin antikolarıyla boyanmıştır. İki olguda araştırma grubumuz tarafından tanımlanan mutant β catenin boyanma deseni olduğu fark edilmiş, bu iki olgudan birinde ise nükleer fosfo- β catenin birikimi olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu bulgu, fosfo- β catenin'in nükleusta birikerek mutant β catenin boyanma desenine neden olabileceği hipotezini desteklemiştir.

Nükleer/perinükleer alana yerleşen fosfo- β catenin'in hücre içi fonksiyonlarını araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. İlk olarak Huang ve ark. (158) sıçan fibroblast hücre hatlarında yaptığı *in vitro* çalışma ile fosfo- β catenin'in sentrozomlarda kümelenildiğini göstermiştir ve bu sayede fosfo- β catenin'in mikrotübül organizasyonunu ve sentrozom matürasyonunu düzenlediğini öne sürmüştür. Bu çalışmayı takip eden bir başka araştırmada ise fosfo- β catenin'in sentrozomlarda lokalize olduğu görüşü desteklenmiş ve sentrozomların kohezyonunda rol oynadığı belirtilmiştir (159). Bu çalışmalar sonucunda fosfo- β catenin'in sentrozomlara yerleşerek mikrotübül aktivitesini düzenlediğine yönelik kuvvetli kanıtlar elde edilmiş olsa da, bu işlevi hangi biyokimyasal mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirdiği henüz bilinmemektedir (160).

Bu tez çalışmasında immünofloresan boyama sonucunda kolorektal kanser olgularına ait doku örneklerinde nükleer fosfo- β catenin'in punktat bir boyanma deseni sergilediği gösterilmiştir. Fosfo- β catenin'in nükleusta ve perinükleer alanlarda bu şekilde birikim göstermesi, proteinin sentrozomlarda veya mikrotübül ağında konumlanabileceğini ve bu sayede hücre bölünmesinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Normal kolon epitel hücrelerinde de fosfo- β catenin antikoru ile yapılan immünofloresan boyaması sonucunda da punktat boyanma deseni elde edilmiştir. Fakat kanser dokusunun aksine bu boyanma deseni nükleusta değil sitoplazmada tespit edilmiştir. Normal kolon epitelinde sitoplazmada, kolon kanseri hücrelerinde ise nükleusta benzer boyanma deseni gösteren fosfo- β catenin'in, yıkım kompleksi proteinlerinin bulunduğu alanlarda lokalize olabileceği de akla gelmektedir. Genellikle sitoplazmada konumlanan yıkım kompleksi proteinlerinin nükleus ve sitoplazma arasında hareket edebildiği bilinmektedir ve bu proteinlerin β -catenin proteininin N-terminal fosforilasyonunu yalnızca sitoplazmada değil, aynı zamanda nükleus içerisinde de gerçekleştirebileceği gösterilmiştir (161–163). Literatürde yer alan bu gözlemlerden yola çıkarak, yıkım kompleksi tarafından fizyolojik bir sürecin parçası olarak sitoplazmada gerçekleşen β -catenin fosforilasyonu, kolon kanseri hücrelerinde yıkım kompleksi proteinleri veya henüz tanımlanmamış başka serin treonin kinazlar tarafından nükleusta gerçekleşiyor olabilir.

İmmünofloresan boyama sonucunda elde edilen bir diğer ilginç sonuç ise neoplastik hücrelerde fosfo- β catenin antikoru ile nükleer boyanma gözlemlerken, aynı proteinin C-terminal bölgesini tanıyan β -catenin antikoru ile yalnızca membranöz boyanma görülmesi ve β -catenin antikorunun fosfo- β catenin ile nükleer kolokalizasyon göstermemesidir. Bu durumun olası açıklamalarından bir tanesi C-terminal bölgesi olmayan ve bu nedenle C-terminal bölgeye bağlanan β -catenin antikoru tarafından tanınamayan kısa β catenin formlarının nükleusta birikiyor olmasıdır. Bu hipotezi test etmek amacıyla yapılan western blot analizinde, aynı kolorektal kanser örneğine ait protein lizatı fosfo- β catenin antikoru ile blotlanmıştır ve sonuç olarak 60-65 kDa ağırlığında kuvvetli bir β catenin bandı tespit edilmiştir.

Fakat aynı membranın β -catenin antikoru ile blotlanması sonucunda ise 70 kDa'dan daha düşük moleküler ağırlığa sahip hiçbir bant gösterilememiştir. Western blot analizi ile elde edilen bu bulgu, immunofloresan boyama sonucunda yapmış olduğumuz gözlemler ile uyumludur ve C-terminali olmayan kısa β -catenin formlarının varlığına işaret etmektedir.

β -catenin sıkça post-translasyonel modifikasyona uğrayan proteinlerden biridir ve bu modifikasyonlardan en sık görülenlerden biri proteinin proteolitik kesimidir. Goretsky ve ark. (164) tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada β -catenin'in hem C-terminal hem de N-terminal bölgeden proteozomların kemotripsin benzeri aktivitesi aracılığıyla proteolitik olarak kesilebildiği ve böylece onkojenik özellik gösteren düşük moleküler ağırlığa sahip β -catenin formlarının oluşabildiği gösterilmiştir. Yakın zamanlı bir başka çalışmada ise 48 kDa ağırlığa sahip kısa bir β -catenin formunun siroz ve hepatoselüler kanser ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (165). Bu araştırmalarda elde edilen sonuçlar ile bu tez çalışmasında gözlemlenen bulgular bir arada değerlendirildiğinde , C-terminali kesilmiş fakat N-terminal bölgesi korunarak fosforile olmuş kısa β -catenin formlarının henüz bilinmeyen bir mekanizmayla nükleusta biriktiği çıkarımı yapılabilir.

Tez çalışması kapsamında yapılan western blot deneyleri ile β -catenin'in proteolitik olarak kesildiğini destekleyen başka bulgular da elde edilmiştir. Kolorektal kanser olgularına ait protein lizatlarının β -catenin antikoru ile blotlanması sonucunda 92 kDa ağırlığındaki normal β -catenin bandının yanı sıra iki tane düşük moleküler ağırlığa sahip ekstra bant gözlemlenmiştir. İlginç olarak bu iki bant, proteinin spesifik olarak N-terminal bölgesini tanıyan aktif β -catenin antikoru ile yapılan western blot analizinde kaybolmuştur.

Literatür incelendiğinde, çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz bulguları destekleyen çok sayıda farklı araştırma bulunduğu fark edilmiştir. Bu çalışmaların büyük bölümünde, fosforilasyon motifinin yer aldığı β -catenin N-terminal bölgesinin çeşitli proteazlar ile kesildiği ve bu sayede düşük moleküler ağırlığa sahip onkojenik β -catenin formlarının oluştuğu bildirilmiştir. Li ve İyengar (166) tarafından bu konuda yayımlanmış ilk çalışmalardan birinde kolorektal kanser hücre hatlarından elde edilen

protein lizatlarının western blot yöntemi ile incelenmesi sonucunda 75 kDa ağırlığında düşük moleküler ağırlığa sahip β -catenin bandının olduğu gözlemlenmiştir ve bu bandın kaspaz ailesi proteinlere benzerlik gösteren “calpain” proteinlerinin proteolitik aktivitesi sonucu ortaya çıktığı öne sürülmüştür. Bu çalışmayı takip eden diğer bir çalışmada ise aynı 75 kDa moleküler ağırlığa sahip β -catenin bandının prostat ve meme kanseri gibi farklı hücre hatlarında bulunduğu bildirilmiş ve önceki çalışmaya benzer bir şekilde bu durum calpain proteaz ailesi ile ilişkilendirilmiştir (167). Her iki araştırmada da 75 kDa’luk bandın yanı sıra yaklaşık 90 kDa ağırlığa sahip başka bir β -catenin bandı daha gözlemlenmiştir fakat bu bandın nasıl ortaya çıktığı ile ilgili bir mekanizma henüz tanımlanmamıştır. Sonuç olarak çalışmamızda gözlemlediğimiz düşük moleküler ağırlığa sahip β -catenin bantlarının, β -catenin’in N-terminal kesimi sonucunda ortaya çıkmış olabileceği düşünülmüştür ve bu çıkarımın literatür bilgisi ile uyum içinde olduğu görülmektedir.

Çalışmamızın sonunda fosfo- β catenin ifadesi ile kolorektal kanser olgularının genel sağkalımı arasındaki ilişki de incelenmiştir. Yapılan sağkalım analizinde, Chung ve ark. (135) tarafından yapılan çalışmanın aksine nükleer veya sitoplazmik fosfo- β catenin ifadesinin genel sağkalım üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. İki çalışma arasındaki uyumsuzluğun olası nedenlerinden biri, bu tez çalışmasında kullanılan örneklem boyutunun önceki çalışmaya kıyasla daha küçük olması olabilir. Tez çalışmasının örneklemine oluşturan olguların %70’inde fosfo- β catenin ifadesi negatiftir. Bu nedenle örneklem boyutunun küçük olması, kohortu oluşturan fosfo- β catenin pozitif ve negatif gruplar arasında olgu sayısı açısından büyük bir eşitsizlik yaratmaktadır ve bu eşitsizliğin sağkalım analizi sonucunu etkileyebileceği düşünülmektedir. İki çalışma arasındaki sağkalım analizi sonucunu etkileyebilecek bir diğer temel fark ise, DMD’lerde kullanılan doku boyutlarının bu iki çalışma arasında farklılık göstermesidir. Chung ve ark. (135) DMD dizaynı sırasında kullanılan dokuların çapı boyutu 0,6 mm iken bu tez çalışmasında tercih edilen doku çapı boyutu 1 mm’dir. Çaplar arasındaki bu farklılık diffüz boyanma gösteren örneklerde büyük bir öneme sahip olmasa da fokal boyanma gösteren pozitif örneklerin negatif olarak

skorlanmasına neden olmakta ve bu nedenle sağkalım analizi sonucunu direk olarak etkileyebilmektedir.

Sonuç olarak tez çalışmasının ikinci bölümünde β -catenin, aktif- β -catenin ve fosfo- β -catenin gibi β -catenin proteininin farklı formlarının hücre içerisinde farklı bölgelerde konumlanabileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda fosfo- β -catenin'in nükleer birikiminin kolorektal kanser olgularında oldukça sık görüldüğü ve tanımlamış olduğumuz mutant β -catenin desenine neden olabileceği öne sürülmüştür. Ek olarak yapılan immünofloresan boyama ve western blot deneyleriyle β -catenin'in farklı moleküler ağırlığı sahip kısa formlarının olduğu tespit edilmiş ve bu formların kolorektal kanser patogenezi ile ilişkili olabileceği düşünölmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, araştırma grubumuz tarafından tanımlanmış olan ve β -catenin N-terminal bölge değişikliklerinin kolay bir şekilde tespit edilmesini sağlayan immünohistokimyasal boyama temelli yöntemin farklı kullanım alanları incelenmiştir. Sonuç olarak, dalağın nadir bir fibrovasküler lezyonu olan SANT hastalığında bu yöntem kullanılarak β -catenin N-terminal bölge değişikliği tespit edilmiştir ve böylece bu yöntemin etiopatogenezi henüz bilinmeyen neoplastik hastalıklarda *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının araştırılabilmesi için pratik ve etkili bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Çalışmamız sonucunda *CTNNB1* ekzon 3 kaybının SANT hastalığı ile ilişkisi moleküler düzeyde ispatlanmıştır. Fakat araştırmada incelenen dört SANT olgusunda ekzon 3 kaybının yalnızca cDNA düzeyinde gösterilebilmesi, ekzon 3 kaybına neden olabilecek “alternatif *splicing*” gibi genomik delesyon harici mekanizmaların araştırılmasını gerektirmektedir. Yakın zamanlı pek çok çalışmada *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonlarının sıklığının mezenkimal tümörlerde oldukça yüksek olduğu fark edilmiştir. Wnt sinyal yolağının fibrozis ile ilişkisi göz önüne alındığında, fibrozisin eşlik ettiği mezenkimal tümörlerin *CTNNB1* ekzon 3 mutasyonları yönünden araştırılması β -catenin bozukluğu sonucu ortaya çıkan yeni tümörlerin keşfedilmesini sağlayacaktır.

Çalışmamızın bir diğer önemli sonucu ise β -catenin N-terminal bölgede görülen post-translasyonel modifikasyonların kolorektal kanser ile ilişkisinin gösterilmesidir. Kolorektal kanser olgularının önemli bir bölümünde nükleer fosfo- β -catenin birikimi görülmektedir. Klasik Wnt/ β -catenin sinyal yolağına göre proteozomal olarak yıkılması gereken fosfo- β -catenin’in neoplastik hücrelerin nükleusunda neden biriktiği araştırılmalı ve kolorektal kanser gelişimiyle ilgili olası işlevleri aydınlatılmalıdır. Çalışmada elde ettiğimiz bir diğer ilginç sonuç ise kolorektal kanser olgularında β -catenin’in, N-terminal ve C-terminal bölgeden kesilerek kısa β -catenin formlarının ortaya çıktığının gösterilmesidir. Literatürde bulunan önceki çalışmalarla desteklenen bu bulgu, β -catenin’in proteolitik kesiminin neoplazi gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda bu kısa β -catenin formlarının hangi proteolitik sistemler tarafından

oluşturulduğu incelenmeli ve bu formların neoplazi gelişimi ile ilişkisi *in vitro* ve *in vivo* fonksiyonel deneylerle belirlenmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Logan CY, Nusse R. The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004 Nov;20(1):781–810.
2. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell.* 2012 Jun;149(6):1192–205.
3. Stamos JL, Weis WI. The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Jan 1;5(1):a007898–a007898.
4. Dar MS, Singh P, Mir RA, Dar MJ. Beta-catenin N-terminal domain: An enigmatic region prone to cancer causing mutations. *Mutat Res Mutat Res.* 2017 Jul;773:122–33.
5. Akyol A, Güner G, Özşeker HS, Işık A, Atıcı Ö, Uzun S, et al. An immunohistochemical approach to detect oncogenic CTNNB1 mutations in primary neoplastic tissues. *Lab Invest.* 2019 Jan;99(1):128–37.
6. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* 1982 Nov;31(1):99–109.
7. Sharma RP, Chopra VL. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 1976 Feb;48(2):461–5.
8. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980 Oct 30;287(5785):795–801.
9. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell.* 1987 Aug 14;50(4):649–57.
10. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, et al. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell.* 1991 Jan 25;64(2):231.
11. Klingensmith J, Nusse R, Perrimon N. The *Drosophila* segment polarity gene dishevelled encodes a novel protein required for response to the wingless signal. *Genes Dev.* 1994 Jan 1;8(1):118–30.
12. Siegfried E, Wilder EL, Perrimon N. Components of wingless signalling in *Drosophila*. *Nature.* 1994 Jan;367(6458):76–80.
13. van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, et al. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell.* 1997 Mar 21;88(6):789–99.
14. McMahon AP, Moon RT. Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell.* 1989 Sep 22;58(6):1075–84.

15. Thomas KR, Capecchi MR. Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature*. 1990 Aug;346(6287):847–50.
16. Ikeya M, Lee SMK, Johnson JE, McMahon AP, Takada S. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature*. 1997 Oct;389(6654):966–70.
17. Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Dev Camb Engl*. 1999 Mar;126(6):1211–23.
18. Parr BA, McMahon AP. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature*. 1998 Oct;395(6703):707–10.
19. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*. 1997 Dec 15;11(24):3286–305.
20. Clevers H, Loh KM, Nusse R. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*. 2014 Oct 3;346(6205):1248012.
21. Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet*. 1998 Aug;19(4):379–83.
22. Kim K-A. Mitogenic Influence of Human R-Spondin1 on the Intestinal Epithelium. *Science*. 2005 Aug 19;309(5738):1256–9.
23. Raslan AA, Yoon JK. R-spondins: Multi-mode WNT signaling regulators in adult stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019 Jan;106:26–34.
24. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*. 2007 Oct;449(7165):1003–7.
25. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991 Aug;66(3):589–600.
26. Kinzler K, Nilbert M, Su L, Vogelstein B, Bryan T, Levy D, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*. 1991 Aug 9;253(5020):661–5.
27. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain S, Masiarz F, et al. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science*. 1993 Dec 10;262(5140):1731–4.
28. Polakis P. Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 May 1;4(5):a008052–a008052.
29. De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2011 Oct;43(10):745–56.

30. Simons M, Mlodzik M. Planar Cell Polarity Signaling: From Fly Development to Human Disease. *Annu Rev Genet.* 2008 Dec;42(1):517–40.
31. Nusse R, Varmus H. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed: Three decades of Wnts: a personal perspective. *EMBO J.* 2012 Jun 13;31(12):2670–84.
32. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell.* 2009 Jul;17(1):9–26.
33. Willert K, Nusse R. Wnt Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Sep 1;4(9):a007864–a007864.
34. Neumann S, Coudreuse DYM, van der Westhuyzen DR, Eckhardt ERM, Korswagen HC, Schmitz G, et al. Mammalian Wnt3a is Released on Lipoprotein Particles. *Traffic.* 2009 Mar;10(3):334–43.
35. Chen Q, Takada R, Noda C, Kobayashi S, Takada S. Different populations of Wnt-containing vesicles are individually released from polarized epithelial cells. *Sci Rep.* 2016 Dec;6(1):35562.
36. Stanganello E, Hagemann AIH, Mattes B, Sinner C, Meyen D, Weber S, et al. Filopodia-based Wnt transport during vertebrate tissue patterning. *Nat Commun.* 2015 May;6(1):5846.
37. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Dec;13(12):767–79.
38. Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled. *Science.* 2012 Jul 6;337(6090):59–64.
39. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O’Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, et al. arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature.* 2000 Sep;407(6803):527–30.
40. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* 2000 Sep;407(6803):530–5.
41. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature.* 2000 Sep;407(6803):535–8.
42. Kimelman D, Xu W. β -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene.* 2006 Dec;25(57):7482–91.
43. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 1996 Jun 15;10(12):1443–54.
44. Amit S. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta -catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 2002 May 1;16(9):1066–76.

45. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G-H, Tan Y, et al. Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell*. 2002 Mar;108(6):837–47.
46. Wu G, Xu G, Schulman BA, Jeffrey PD, Harper JW, Pavletich NP. Structure of a β -TrCP1-Skp1- β -Catenin Complex. *Mol Cell*. 2003 Jun;11(6):1445–56.
47. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. β -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *EMBO J*. 1997 Jul 1;16(13):3797–804.
48. Hsu W, Zeng L, Costantini F. Identification of a Domain of Axin That Binds to the Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A and a Self-binding Domain. *J Biol Chem*. 1999 Feb 5;274(6):3439–45.
49. Su Y, Fu C, Ishikawa S, Stella A, Kojima M, Shitoh K, et al. APC Is Essential for Targeting Phosphorylated β -Catenin to the SCF β -TrCP Ubiquitin Ligase. *Mol Cell*. 2008 Dec;32(5):652–61.
50. Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, et al. *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*. 1998 Oct;395(6702):604–8.
51. Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, et al. The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*. 1998 Oct;395(6702):608–12.
52. Brantjes H. All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res*. 2001 Apr 1;29(7):1410–9.
53. Bilic J, Huang Y-L, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat C-M, Bienz M, et al. Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6 Phosphorylation. *Science*. 2007 Jun 15;316(5831):1619–22.
54. Schwarz-Romond T, Metcalfe C, Bienz M. Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci*. 2007 Jul 15;120(14):2402–12.
55. Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, et al. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*. 2007 Dec 5;135(2):367–75.
56. Tortelote GG, Reis RR, de Almeida Mendes F, Abreu JG. Complexity of the Wnt/ β -catenin pathway: Searching for an activation model. *Cell Signal*. 2017 Dec;40:30–43.
57. Archbold HC, Yang YX, Chen L, Cadigan KM. How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ β -catenin pathway: Wnt/ β -catenin transcriptional regulation. *Acta Physiol*. 2012 Jan;204(1):74–109.
58. Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J*. 1989 Jun;8(6):1711–7.

59. McCrea P, Turck C, Gumbiner B. A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*. 1991 Nov 29;254(5036):1359–61.
60. Noordermeer J, Klingensmith J, Perrimon N, Nusse R. Dishevelled and armadillo act in the Wingless signalling pathway in *Drosophila*. *Nature*. 1994 Jan;367(6458):80–3.
61. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin: β -Catenin: a life by, beyond, and against the Wnt canon. *EMBO J*. 2012 Jun 13;31(12):2714–36.
62. Kraus C, Liehr T, Hülken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik K-H, et al. Localization of the Human β -Catenin Gene (CTNNB1) to 3p21: A Region Implicated in Tumor Development. *Genomics*. 1994 Sep;23(1):272–4.
63. Nollet F, Berx G, Molemans F, van Roy F. Genomic Organization of the Human β -Catenin Gene (CTNNB1). *Genomics*. 1996 Mar;32(3):413–24.
64. Thiele A, Nagamine Y, Hauschildt S, Clevers H. AU-rich elements and alternative splicing in the β -catenin 3'UTR can influence the human β -catenin mRNA stability. *Exp Cell Res*. 2006 Jul;312(12):2367–78.
65. McCrea PD, Gottardi CJ. Beyond β -catenin: prospects for a larger catenin network in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Jan;17(1):55–64.
66. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of β -Catenin. *Cell*. 1997 Sep;90(5):871–82.
67. Xu W, Kimelman D. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J Cell Sci*. 2007 Oct 1;120(19):3337–44.
68. Graham TA, Weaver C, Mao F, Kimelman D, Xu W. Crystal Structure of a β -Catenin/Tcf Complex. *Cell*. 2000 Dec;103(6):885–96.
69. Eklof Spink K. Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex. *EMBO J*. 2001 Nov 15;20(22):6203–12.
70. Huber AH, Weis WI. The Structure of the β -Catenin/E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by β -Catenin. *Cell*. 2001 May;105(3):391–402.
71. Rebouissou S, Franconi A, Calderaro J, Letouzé E, Imbeaud S, Pilati C, et al. Genotype-phenotype correlation of CTNNB1 mutations reveals different β -catenin activity associated with liver tumor progression. *Hepatology*. 2016 Dec;64(6):2047–61.
72. Liu P, Liang B, Liu M, Lebbink JHG, Li S, Qian M, et al. Oncogenic Mutations in Armadillo Repeats 5 and 6 of β -Catenin Reduce Binding to APC, Increasing Signaling and Transcription of Target Genes. *Gastroenterology*. 2020 Mar;158(4):1029-1043.e10.

73. Gottardi CJ, Peifer M. Terminal Regions of β -Catenin Come into View. *Structure*. 2008 Mar;16(3):336–8.
74. Xing Y, Takemaru K-I, Liu J, Berndt JD, Zheng JJ, Moon RT, et al. Crystal Structure of a Full-Length β -Catenin. *Structure*. 2008 Mar;16(3):478–87.
75. Dar MS, Singh P, Singh G, Jamwal G, Hussain SS, Rana A, et al. Terminal regions of β -catenin are critical for regulating its adhesion and transcription functions. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2016 Sep;1863(9):2345–57.
76. Zhao B, Xue B. Self-regulation of functional pathways by motifs inside the disordered tails of beta-catenin. *BMC Genomics*. 2016 Aug;17(S5):484.
77. Stadeli R, Hoffmans R, Basler K. Transcription under the Control of Nuclear Arm/ β -Catenin. *Curr Biol*. 2006 May;16(10):R378–85.
78. Cox RT, Pai LM, Kirkpatrick C, Stein J, Peifer M. Roles of the C terminus of Armadillo in Wingless signaling in *Drosophila*. *Genetics*. 1999 Sep;153(1):319–32.
79. Gottardi CJ, Gumbiner BM. Distinct molecular forms of β -catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol*. 2004 Oct 25;167(2):339–49.
80. Mo R, Chew T-L, Maher MT, Bellipanni G, Weinberg ES, Gottardi CJ. The Terminal Region of β -Catenin Promotes Stability by Shielding the Armadillo Repeats from the Axin-scaffold Destruction Complex. *J Biol Chem*. 2009 Oct 9;284(41):28222–31.
81. Maturana JL, Niechi I, Silva E, Huerta H, Cataldo R, Hartel S, et al. Transactivation activity and nucleocytoplasmic transport of β -catenin are independently regulated by its C-terminal end. *Gene*. 2015 Nov;573(1):115–22.
82. Sharma M, Jamieson C, Lui C, Henderson BR. Distinct hydrophobic “patches” in the N- and C-tails of beta-catenin contribute to nuclear transport. *Exp Cell Res*. 2016 Nov;348(2):132–45.
83. Choi H-J, Huber AH, Weis WI. Thermodynamics of β -Catenin-Ligand Interactions: THE ROLES OF THE N- AND C-TERMINAL TAILS IN MODULATING BINDING AFFINITY. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):1027–38.
84. Harris TJC, Tepass U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Jul;11(7):502–14.
85. Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci*. 1994 Dec;107 (Pt 12):3655–63.
86. Bush M, Alhanshali BM, Qian S, Stanley CB, Heller WT, Matsui T, et al. An ensemble of flexible conformations underlies mechanotransduction by the cadherin–catenin adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci*. 2019 Oct 22;116(43):21545–55.

87. Trautmann M, Rehkämper J, Gevensleben H, Becker J, Wardelmann E, Hartmann W, et al. Novel pathogenic alterations in pediatric and adult desmoid-type fibromatosis – A systematic analysis of 204 cases. *Sci Rep*. 2020 Dec;10(1):3368.
88. Sampietro J, Dahlberg CL, Cho US, Hinds TR, Kimelman D, Xu W. Crystal Structure of a β -Catenin/BCL9/Tcf4 Complex. *Mol Cell*. 2006 Oct;24(2):293–300.
89. Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, et al. Wnt/Wingless Signaling Requires BCL9/Legless-Mediated Recruitment of Pygopus to the Nuclear β -Catenin-TCF Complex. *Cell*. 2002 Apr;109(1):47–60.
90. Brembeck FH. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2225–30.
91. Adachi S, Jigami T, Yasui T, Nakano T, Ohwada S, Omori Y, et al. Role of a BCL9-Related β -Catenin-Binding Protein, B9L, in Tumorigenesis Induced by Aberrant Activation of Wnt Signaling. *Cancer Res*. 2004 Dec 1;64(23):8496–501.
92. Mani M, Carrasco DE, Zhang Y, Takada K, Gatt ME, Dutta-Simmons J, et al. BCL9 Promotes Tumor Progression by Conferring Enhanced Proliferative, Metastatic, and Angiogenic Properties to Cancer Cells. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7577–86.
93. Sakamoto I, Ohwada S, Toya H, Togo N, Kashiwabara K, Oyama T, et al. Up-regulation of a BCL9-related β -catenin-binding protein, B9L, in different stages of sporadic colorectal adenoma. *Cancer Sci*. 2007 Jan;98(1):83–7.
94. Xu W, Zhou W, Cheng M, Wang J, Liu Z, He S, et al. Hypoxia activates Wnt/ β -catenin signaling by regulating the expression of BCL9 in human hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 2017 Mar;7(1):40446.
95. Takada K, Zhu D, Bird GH, Sukhdeo K, Zhao J-J, Mani M, et al. Targeted Disruption of the BCL9/ β -Catenin Complex Inhibits Oncogenic Wnt Signaling. *Sci Transl Med*. 2012 Aug 22;4(148):148ra117-148ra117.
96. Hsu S-C, Galceran J, Grosschedl R. Modulation of Transcriptional Regulation by LEF-1 in Response to Wnt-1 Signaling and Association with β -Catenin. *Mol Cell Biol*. 1998 Aug 1;18(8):4807–18.
97. Aoki M, Sobek V, Maslyar DJ, Hecht A, Vogt PK. Oncogenic transformation by β -catenin: deletion analysis and characterization of selected target genes. *Oncogene*. 2002 Oct;21(46):6983–91.
98. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of β -Catenin Adhesion and Signaling Functions. *Physiology*. 2007 Oct;22(5):303–9.
99. Gao C, Wang Y, Broaddus R, Sun L, Xue F, Zhang W. Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review. *Oncotarget* [Internet]. 2018 Jan 12

[cited 2020 Mar 31];9(4). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/23695>

100. Kim S, Jeong S. Mutation Hotspots in the β -Catenin Gene: Lessons from the Human Cancer Genome Databases. *Mol Cells* [Internet]. 2019 [cited 2020 Mar 31];42. Available from: <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2018.0436>
101. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D941–7.
102. Yaeger R, Chatila WK, Lipsyc MD, Hechtman JF, Cercek A, Sanchez-Vega F, et al. Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell*. 2018 Jan;33(1):125-136.e3.
103. Morin PJ. Activation of beta -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in beta -Catenin or APC. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1787–90.
104. Rubinfeld B. Stabilization of beta -Catenin by Genetic Defects in Melanoma Cell Lines. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1790–2.
105. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 2000 Aug 1;14(15):1837–51.
106. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014 Jan;505(7484):495–501.
107. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007 Jun;132(7):2557–76.
108. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2010 Sep;29(36):4989–5005.
109. Perugorria MJ, Olaizola P, Labiano I, Esparza-Baquer A, Marzioni M, Marin JJG, et al. Wnt– β -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Feb;16(2):121–36.
110. Boyault S, Rickman DS, de Reyniès A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*. 2007 Jan;45(1):42–52.
111. Wang W, Smits R, Hao H, He C. Wnt/ β -Catenin Signaling in Liver Cancers. *Cancers*. 2019 Jul 2;11(7):926.
112. Monga SP. β -Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2015 Jun;148(7):1294–310.
113. Adebayo Michael AO, Ko S, Tao J, Moghe A, Yang H, Xu M, et al. Inhibiting Glutamine-Dependent mTORC1 Activation Ameliorates Liver Cancers Driven by β -Catenin Mutations. *Cell Metab*. 2019 May;29(5):1135-1150.e6.

114. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
115. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011 Feb 28;6(1):479–507.
116. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul;487(7407):330–7.
117. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 2013 Mar 29;339(6127):1546–58.
118. McNeill KA. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol Clin*. 2016 Nov;34(4):981–98.
119. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, et al. The Molecular Basis of Turcot's Syndrome. *N Engl J Med*. 1995 Mar 30;332(13):839–47.
120. Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui C, Mainprize TG, Zhang X, et al. Mutations in *SUFU* predispose to medulloblastoma. *Nat Genet*. 2002 Jul;31(3):306–10.
121. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho Y-J, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2012 Apr;123(4):465–72.
122. Northcott PA, Robinson GW, Kratz CP, Mabbott DJ, Pomeroy SL, Clifford SC, et al. Medulloblastoma. *Nat Rev Dis Primer*. 2019 Dec;5(1):11.
123. Ellison DW, Dalton J, Kocak M, Nicholson SL, Fraga C, Neale G, et al. Medulloblastoma: clinicopathological correlates of *SHH*, *WNT*, and non-*SHH/WNT* molecular subgroups. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2011 Mar;121(3):381–96.
124. Goschzik T, zur Mühlen A, Kristiansen G, Haberler C, Stefanits H, Friedrich C, et al. Molecular stratification of medulloblastoma: comparison of histological and genetic methods to detect Wnt activated tumours: Detection of Wnt activated medulloblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2015 Feb;41(2):135–44.
125. Alman B, Attia S, Baumgarten C, Benson C, Blay J-Y, Bonvalot S, et al. The management of desmoid tumours: A joint global consensus-based guideline approach for adult and paediatric patients. *Eur J Cancer*. 2020 Mar;127:96–107.
126. Penel N, Chibon F, Salas S. Adult desmoid tumors: biology, management and ongoing trials. *Curr Opin Oncol*. 2017 Jul;29(4):268–74.
127. Wang W-L, Nero C, Pappo A, Lev D, Lazar AJ, López-Terrada D. *CTNNB1* Genotyping and *APC* Screening in Pediatric Desmoid Tumors: A Proposed Algorithm. *Pediatr Dev Pathol*. 2012 Sep;15(5):361–7.

128. Timbergen MJM, Smits R, Grünhagen DJ, Verhoef C, Sleijfer S, Wiemer EAC. Activated Signaling Pathways and Targeted Therapies in Desmoid-Type Fibromatosis: A Literature Review. *Front Oncol*. 2019 May 17;9:397.
129. Fletcher CDM, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, editors. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2013. 468 p. (World Health Organization classification of tumours).
130. Pretto D, Barco R, Rivera J, Neel N, Gustavson MD, Eid JE. The synovial sarcoma translocation protein SYT-SSX2 recruits β -catenin to the nucleus and associates with it in an active complex. *Oncogene*. 2006 Jun;25(26):3661–9.
131. Annavarapu SR, Cialfi S, Dominici C, Kokai GK, Uccini S, Ceccarelli S, et al. Characterization of Wnt/ β -catenin signaling in rhabdomyosarcoma. *Lab Invest*. 2013 Oct;93(10):1090–9.
132. Kanojia D, Nagata Y, Garg M, Lee DH, Sato A, Yoshida K, et al. Genomic landscape of liposarcoma. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Dec 15 [cited 2020 Apr 2];6(40). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/6464>
133. Agaimy A, Haller F. CTNNB1 (β -Catenin)-altered Neoplasia: A Review Focusing on Soft Tissue Neoplasms and Parenchymal Lesions of Uncertain Histogenesis. *Adv Anat Pathol*. 2016 Jan;23(1):1–12.
134. Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR. Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *BioTechniques*. 1995 May;18(5):768–70, 772–3.
135. Chung GG, Provost E, Kielhorn EP, Charette LA, Smith BL, Rimm DL. Tissue microarray analysis of beta-catenin in colorectal cancer shows nuclear phospho-beta-catenin is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2001 Dec;7(12):4013–20.
136. Martel M, Cheuk W, Lombardi L, Lifschitz-Mercer B, Chan JKC, Rosai J. Sclerosing Angiomatoid Nodular Transformation (SANT): Report of 25 Cases of a Distinctive Benign Splenic Lesion. *Am J Surg Pathol*. 2004 Oct;28(10):1268–79.
137. Abraham SC, Montgomery EA, Giardiello FM, Wu T-T. Frequent β -Catenin Mutations in Juvenile Nasopharyngeal Angiofibromas. *Am J Pathol*. 2001 Mar;158(3):1073–8.
138. Haller F, Bieg M, Moskalev EA, Barthelmeß S, Geddert H, Boltze C, et al. Recurrent Mutations within the Amino-Terminal Region of β -Catenin Are Probable Key Molecular Driver Events in Sinonasal Hemangiopericytoma. *Am J Pathol*. 2015 Feb;185(2):563–71.
139. Jung S-H, Kim MS, Lee S-H, Park H-C, Choi HJ, Maeng L, et al. Whole-exome sequencing identifies recurrent *AKT1* mutations in sclerosing hemangioma of lung. *Proc Natl Acad Sci*. 2016 Sep 20;113(38):10672–7.

140. Guo Y, Xiao L, Sun L, Liu F. Wnt/ β -Catenin Signaling: a Promising New Target for Fibrosis Diseases. *Physiol Res*. 2012 Aug 31;337–46.
141. Iwao K, Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Kinoshita M, Fukui T, et al. Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res*. 1998 Mar 1;58(5):1021–6.
142. Liang Y, Feng Y, Zong M, Wei X-F, Lee J, Feng Y, et al. β -catenin deficiency in hepatocytes aggravates hepatocarcinogenesis driven by oncogenic β -catenin and MET: LIANG, FENG, ET AL. *Hepatology*. 2018 May;67(5):1807–22.
143. Gilbert MTP, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, et al. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues—Which Methods Are Useful When? Volff J-N, editor. *PLoS ONE*. 2007 Jun 20;2(6):e537.
144. Campos PF, Gilbert TMP. DNA Extraction from Formalin-Fixed Material. In: Shapiro B, Hofreiter M, editors. *Ancient DNA* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2012 [cited 2020 Oct 22]. p. 81–5. (Methods in Molecular Biology; vol. 840). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-516-9_11
145. Pagenstecher C, Wehner M, Friedl W, Rahner N, Aretz S, Friedrichs N, et al. Aberrant splicing in MLH1 and MSH2 due to exonic and intronic variants. *Hum Genet*. 2006 Mar;119(1–2):9–22.
146. Eswaran J, Horvath A, Godbole S, Reddy SD, Mudvari P, Ohshiro K, et al. RNA sequencing of cancer reveals novel splicing alterations. *Sci Rep*. 2013 Dec;3(1):1689.
147. Schrock AB, Frampton GM, Suh J, Chalmers ZR, Rosenzweig M, Erlich RL, et al. Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations. *J Thorac Oncol*. 2016 Sep;11(9):1493–502.
148. Mou H, Smith JL, Peng L, Yin H, Moore J, Zhang X-O, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion. *Genome Biol*. 2017 Dec;18(1):108.
149. Weinreb I, Bailey D, Battaglia D, Kennedy M, Perez-Ordoñez B. CD30 and Epstein–Barr virus RNA expression in sclerosing angiomatoid nodular transformation of spleen. *Virchows Arch*. 2007 Jul;451(1):73–9.
150. Kashiwagi S, Kumasaka T, Bunsei N, Fukumura Y, Yamasaki S, Abe K, et al. Detection of Epstein–Barr virus-encoded small RNA-expressed myofibroblasts and IgG4-producing plasma cells in sclerosing angiomatoid nodular transformation of the spleen. *Virchows Arch*. 2008 Sep;453(3):275–82.
151. Nagai Y, Hayama N, Kishimoto T, Furuya M, Takahashi Y, Otsuka M, et al. Predominance of IgG4+ plasma cells and CD68 positivity in sclerosing angiomatoid nodular transformation (SANT). *Histopathology*. 2008 Oct;53(4):495–8.

152. Chang K-C, Lee J-C, Wang Y-C, Hung L-Y, Huang Y, Huang W-T, et al. Polyclonality in Sclerosing Angiomatoid Nodular Transformation of the Spleen: *Am J Surg Pathol*. 2016 Oct;40(10):1343–51.
153. Chiu A, Czader M, Cheng L, Hasserjian RP, Wang M, Bhagavathi S, et al. Clonal X-chromosome inactivation suggests that splenic cord capillary hemangioma is a true neoplasm and not a subtype of splenic hamartoma. *Mod Pathol*. 2011 Jan;24(1):108–16.
154. Tajima S, Koda K. A case of cord capillary hemangioma of the spleen: A recently proven true neoplasm: Splenic cord capillary hemangioma. *Pathol Int*. 2015 May;65(5):254–8.
155. Sadot E, Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Shnizer D, Lando Z, Zharhary D, et al. Regulation of S33/S37 phosphorylated beta-catenin in normal and transformed cells. *J Cell Sci*. 2002 Jul 1;115(Pt 13):2771–80.
156. Maher MT, Flozak AS, Stocker AM, Chenn A, Gottardi CJ. Activity of the beta-catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion. *J Cell Biol*. 2009 Jul 27;186(2):219–28.
157. Nakopoulou L, Mylona E, Papadaki I, Kavantzias N, Giannopoulou I, Markaki S, et al. Study of phospho-beta-catenin subcellular distribution in invasive breast carcinomas in relation to their phenotype and the clinical outcome. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2006 Apr;19(4):556–63.
158. Huang P, Senga T, Hamaguchi M. A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene*. 2007 Jun 28;26(30):4357–71.
159. Hadjihannas MV, Brückner M, Behrens J. Conductin/axin2 and Wnt signalling regulates centrosome cohesion. *EMBO Rep*. 2010 Apr;11(4):317–24.
160. Mbom BC, Nelson WJ, Barth A. β -catenin at the centrosome: discrete pools of β -catenin communicate during mitosis and may co-ordinate centrosome functions and cell cycle progression. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2013 Sep;35(9):804–9.
161. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates β -catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol*. 2000 Sep;2(9):653–60.
162. Cong F, Varmus H. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *Proc Natl Acad Sci*. 2004 Mar 2;101(9):2882–7.
163. Topol L, Chen W, Song H, Day TF, Yang Y. Sox9 Inhibits Wnt Signaling by Promoting β -Catenin Phosphorylation in the Nucleus. *J Biol Chem*. 2009 Jan 30;284(5):3323–33.
164. Goretzky T, Bradford EM, Ye Q, Lamping OF, Vanagunas T, Moyer MP, et al. Beta-catenin cleavage enhances transcriptional activation. *Sci Rep*. 2018 12;8(1):671.
165. Ali N, Nguyen CB, Chandrakesan P, Wolf RF, Qu D, May R, et al. Doublecortin-like kinase 1 promotes hepatocyte clonogenicity and oncogenic programming

- via non-canonical β -catenin-dependent mechanism. *Sci Rep.* 2020 Dec;10(1):10578.
166. Li G, Iyengar R. Calpain as an effector of the Gq signaling pathway for inhibition of Wnt/ β -catenin-regulated cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 1;99(20):13254–9.
 167. Rios-Doria J, Kuefer R, Ethier SP, Day ML. Cleavage of beta-catenin by calpain in prostate and mammary tumor cells. *Cancer Res.* 2004 Oct 15;64(20):7237–40.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-544

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 15 MAYIS 2018 SALI
Toplantı No : 2018/13
Proje No : GO 18/485 (Değerlendirme Tarihi: 27.03.2018)
Karar No : GO 18/485-18

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Aytekin AKYOL'un sorumlu araştırmacı olduğu, Sarp UZUN'un doktora tezi olan, GO 18/485 kayıt numaralı ve "*β-Catenin N-Terminal Bölge Değişikliklerinin Neoplastik Süreçlerdeki Rolünün Araştırılması*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU	(Başkan)	10 Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞU	(Üye)	11 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım	(Üye)	12. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
4. Prof. Dr. Necdet KAYLAM	(Üye)	13. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan	(Üye)	14. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	(Üye)
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL	(Üye)	15. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN	
8. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	17. Av. Meltem ONURLU	(Üye)
İZİNLİ			
9. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)		

EK-2: Turnitin Ekran Görüntüsü

Tezin Tam Başlığı: β -CATENIN N-TERMİNAL BÖLGE DEĞİŞİKLİKLERİNİN NEOPLASTİK SÜREÇLERDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Öğrencinin Adı Soyadı: Sarp Uzun

Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 69

ORJİNALLİK RAPORU			
%3	%2	%2	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	www.epa.gov İnternet Kaynağı		<%1
2	repub.eur.nl İnternet Kaynağı		<%1
3	webdoc.sub.gwdg.de İnternet Kaynağı		<%1
4	www.scribd.com İnternet Kaynağı		<%1
5	Submitted to Kastamonu University Öğrenci Ödevi		<%1
6	AKDENİZ, Raşit, BAŞPINAR, Şirin, BİRCAN, Sema, KARAHAN, Nermin, ÇİRİŞ, Metin and BOZKURT, Kemal Kürşat. "Renal hücreli karsinomlarda immunohistokimyasal yöntemle saptanan FoxO1, anneksin 2 ve p53 ekspresyonunun klinikopatolojik parametreler ile ilişkisinin araştırılması", Süleyman Demirel Üniversitesi, 2017. Yayın		<%1

EK-3: Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Sarp Uzun
Ödev başlığı: Tez_son
Gönderi Başlığı: β -CATENIN N-TERMINAL BÖLGE DEĞİŞİKLİKLERİNİN NEOPLA...
Dosya adı: Tez_Orijinallik_Taramas.pdf
Dosya boyutu: 3.77M
Sayfa sayısı: 69
Kelime sayısı: 13,961
Karakter sayısı: 96,869
Gönderim Tarihi: 21-Nis-2021 10:28PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1565898471

