T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OVER KANSERİNİN ERKEN TANISI İÇİN ADAY MİRNA'LARDAN BİYOMARKIR SEÇİMİ

Berkcan DOĞAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Tuba GÜNEL

Mayıs, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 11.05.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Tuba GÜNEL(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Samet TOPUZ
İstanbul Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Nazife ÇEVİK
İstanbul Arel Üniversitesi
Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi

Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 24059 numaralı projesi ile desteklenmiştir

ÖNSÖZ

Bilimselliğin, emeğin ve insan sevgisinin mesleğimizin temelini oluşturduğunu bana öğreten, Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında desteğini hissettiğim, çalışma azmini her zaman örnek aldığım, bana olan inancı ve güveni için tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Tuba GÜNEL'e;

Çalışmalarım ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca sürekli iletişimde olduğumuz, her konuda yardımlarını ve fikirlerini zevkle sunan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA'ya ve bölümümüzün öğretim üyelerine;

Projenin ilerlemesinde tıbbi olarak destek aldığım bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Samet TOPUZ'a;

Tezimin istatistiksel verilerinin değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nazife Çevik'e;

Araştırma şevki ve bilimsel azmiyle beni motive eden, her çalışmada aynı heyecanı duyabilmemi sağlayan Sayın Arş. Gör. Ece GÜMÜŞOĞLU'na;

Laboratuvarımızda birlikte çalıştığımız tüm Yüksek Lisans ve Doktora yapan arkadaşlarıma;

Zorlu eğitim ve mesleki hayatımda hiçbir zaman destek ve sevgilerini benden esirgemeyen, tüm yorgunluk ve kahrımı çeken, bana emek veren, sahip olduğum en değerli hazinelerim biricik anneme, babama ve kız kardeşime;

Sonsuz teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım. Siz olmasaydınız bu tez de olamazdı.

Mayıs 2018 Berkcan DOĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xvi**
SUMMARY ..... **xviii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **6**
2.1. OVER ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ 6
2.2. OVER KANSERİ 7
2.2.1. Over Kanseri İnsidansı 7
2.2.2. Over Kanserinin Evreleri 8
2.2.3. Over Kanserinin Sınıflandırılması 9
2.2.4. Over Kanser Biyolojisi 10
2.2.5. Over Kanseri Risk Faktörleri 12
2.2.6. Over Kanseri Tanısında Kullanılan Yöntemler 13
2.2.6.1. Fiziksel Muayene 13
2.2.6.2. Tanısal Görüntüleme 13
2.2.6.3. Laparoskopi 13
2.2.6.4. Kolonoskopi 13
2.2.6.5. Biyopsi 14
2.2.6.6. Kan Testleri 14
2.2.7. Over Kanserinin Kalıtımı 14
2.3. KANSER BİYOMARKIRLARI 16
2.4. MİKRORNA (MİRNA) 18
2.4.1. MiRNA Biyogenezi 18
2.4.2. MiRNA'ların Fonksiyonu ve Regülasyonu 20
2.4.3. MiRNA ve Hedef mRNA İlişkisini Belirlemeye Yönelik Geliştirilen *"In Silico"* Yöntemler 22

2.4.3.1. MiRNA Dizileri 22
2.4.3.2. MRNA'nın 3'UTR'si 22
2.4.3.3. Çekirdek Bölgesi 22
2.4.3.4. Serbest ve Erişilebilir Enerji 23
2.4.3.5. MiRNA 3' Bölgesi 23
2.4.3.6. Korunma Durumu 23
2.4.3.7. Diğer Hedef Bölgeler 23
2.5. OVER KANSERİNDE KULLANILAN BİYOMARKIRLAR 24
2.5.1. Protein Temelli Over Kanseri Biyomarkırları 25
2.5.2. Metabolit Temelli Over Kanseri Biyomarkırları 25
2.5.3. Gen Temelli Over Kanseri Biyomarkırları 26
2.5.3.1. Gen Anlatımı 26
2.5.3.2. Kalıtsal Gen Mutasyonları 27
2.5.3.3. Tüm Genom Dizileme 27
2.5.3.4. Epigenetik Değişiklikler 28
2.6. OVER KANSERİ TANISINDA KULLANILAN MİRNA ANLATIM ANALİZİ TEKNOLOJİLERİ 30
2.7. *hmga2* GENİNİN HSA- LET-7D-3P TARAFINDAN DÜZENLENMESİ 32
3. MALZEME VE YÖNTEM 35
3.1. ÖRNEK TOPLAMA 35
3.2. MİRNA ANLATIM ANALİZİ 35
3.2.1. Serumdan Total RNA İzolasyonu 35
3.2.2. *"Spike-In"* Sentetik miRNA Kullanımı 36
3.2.3. cDNA Sentezi 37
3.2.4. Aday miRNA'ların Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) 37
3.3. GEN ANLATIM ANALİZİ 38
3.3.1. cDNA Sentezi 38
3.3.2. *hmga2* Geninin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) 38
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER 39
4. BULGULAR 41
4.1. MİRNA ANLATIM ANALİZİ 41
4.1.1. Örneklerin Özellikleri 41
4.1.2. Örneklerin Kalite Kontrolü 41
4.1.3. Anlatım Analizi Sonuçları 42

4.2. AĞ TABANLI YÖNTEMLER İLE *"IN SILICO"* MİRNA'LARIN HEDEF GEN TESPİTİ....46
4.3. GEN ANLATIM ANALİZİ....51
4.3.1. Örneklerin Kalite Kontrolü....51
4.3.2. Anlatım Analizi Sonuçları....52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ....53
KAYNAKLAR....64
EKLER....72
EK 1. Etik kurul belgesi....72
ÖZGEÇMİŞ....73

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Sağlıklı over yapısı. 6

Şekil 2.2: Over kanseri ve sağlıklı over yapısı. 7

Şekil 2.3: Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen 10 kanser türünün yüzde dağılımı. 8

Şekil 2.4: FIGO'ya göre over kanserinin evreleri (Cancer Research U.K, 2016). 9

Şekil 2.5: Epitelyal over tümörlerinin biyolojisi (Karlan ve diğ., 2016). 11

Şekil 2.6: "MiRISCs"in gen ifadesini baskılama mekanizmaları (Romero-Cordoba ve ark., 2014). 21

Şekil 2.7: TaqMan miRNA assaylerinin şematik açıklaması (Chen ve diğ., 2005). 32

Şekil 4.1: EOK hasta grubu ve kontrol örneklerindeki rölatif miRNA anlatım seviyeleri. 44

Şekil 4.2: Aday miRNA'ların ROC eğrisi analizi. 45

Şekil 4.3: Mikrodizilim ve qPCR yöntemleri ile miRNA'ların logaritmik kat değişimleri. 45

Şekil 4.4: Hsa-miR-1909'un insan genomundaki lokalizasyonu. 46

Şekil 4.5: Hsa-miR-548am'nin insan genomundaki lokalizasyonu. 47

Şekil 4.6: Hsa-miR-885'in insan genomundaki lokalizasyonu. 49

Şekil 4.7: Hsa-let-7d'nin insan genomundaki lokalizasyonu. 50

Şekil 4.8: Hsa-let-7d-3p'nin hedeflediği *hmga2* geninin web görüntüsü (TargetScan). 51

Şekil 5.1: *"Pathway Studio"* ile hsa-miR-1909-5p'nin hedeflediği genler. 55

Şekil 5.2: *"Pathway Studio"* ile hsa-miR-548am-5p'nin hedeflediği genler. 56

Şekil 5.3: *"Pathway Studio"* ile hsa-miR-885-5p'nin hedeflediği genler. 57

Şekil 5.4: *"Pathway Studio"* ile hsa-miR-885-5p'nin katıldığı biyolojik yolaklar. 59

Şekil 5.5: *"Pathway Studio"* ile hsa-let-7d-3p'nin hedeflediği genler. 60

Şekil 5.6: *"Pathway Studio"* ile hsa-let-7d-3p'nin katıldığı biyolojik yolaklar. 62

Şekil 5.7: *"Pathway Studio"* aracılığıyla hsa-let-7d-3p ile *hmga2* geninin regülasyonu. 63

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Over kanseri risk faktörleri (Hunn ve Rodriguez, 2012). 12

Tablo 2.2: Epitelyal over karsinomalarında karakteristik mutasyonlar (Karlan ve diğ., 2016).....16

Tablo 2.3: Over kanseri için gen anlatım temelli biyomarkırlar (Lee ve diğ., 2013).....26

Tablo 2.4: NGS tekniği ile tespit edilen over kanseri biyomarkırları (Lee ve diğ., 2013). 27

Tablo 2.5: EOK tanısı için miRNA temelli potansiyel biyomarkılar (Srivastava ve diğ., 2017).....29

Tablo 3.1: A) Çalışma çözeltisi bileşenleri B) Reaksiyonun bileşenleri C) Reaksiyon koşulları. 37

Tablo 3.2: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri ve reaksiyon koşulları. 38

Tablo 3.3: A)Çalışma çözeltisi bileşenleri B)Reaksiyonun bileşenleri C)Reaksiyon koşulları. 38

Tablo 3.4: Gen anlatım analizi için qPCR reaksiyonunun bileşenleri ve reaksiyon koşulları. 39

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan EOK hastalarının özellikleri.....41

Tablo 4.2: Sağlıklı bireylerin ve EOK hasta örneklerinin kalite ve kantitite sonuçları.....42

Tablo 4.3: Aday 4 miRNA'nın mikrodizilim sonucu (Gümüşoğlu, 2016, Yüksek Lisans Tezi).....42

Tablo 4.4: Anlatımı değişen miRNA'ların qPCR sonuçlarının çok değişkenli analizi.....43

Tablo 4.5: Aday miRNA'ların miRBase erişim ve olgun dizi bilgisi. 46

Tablo 4.6: Hsa-miR-1909-5p'nin hedeflediği ilk 10 gen. 47

Tablo 4.7: Hsa-miR-548am-5p'nin hedeflediği ilk 10 gen. 48

Tablo 4.8: Hsa-miR-885-5p'nin hedeflediği ilk 10 gen. 49

Tablo 4.9: Hsa-let-7d-3p'nin hedeflediği ilk 10 gen. 50

Tablo 4.10: Sağlıklı bireylerin ve EOK hasta örneklerinin kantitite sonuçları. 52

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	:Yüzde
cm	:Santimetre
dk	:Dakika
g	:Gram
g	:RCF "Bağıl Santrifüj Alanı"
kcal	:Kilokalori
mL	:Mililitre
mM	:Milimolar
ng	:Nanogram
rpm	:Dakikadaki dönüş
sn	:Saniye
T_m	:Erime sıcaklığı
µl	:Mikrolitre
µg	:Mikrogram
^oC	:Derece

Kısaltmalar	Açıklama
$\Delta\Delta C_t$	:Karşılaştırmalı C_t
ADP	:Adenozin Difosfat
AGO2	:Argonat 2 Protein
AKAP14	:A-Kinaz *"Anchoring"* Protein 14
APC	:Adenomatöz Polipozis Koli
ATP	:Adenozin Trifosfat
BARD1	:BRCA1 İlişkili RING Domain 1
BCL-2	:B Hücreli Lenfoma 2
BRAF	:B-Raf Protoonkogen
BRCA1	:Meme Kanseri 1
BRCA2	:Meme Kanseri 2
BRIP1	:BRCA1 Etkileşen Protein C-Terminal Helikaz 1

C8orf88 :Kromozom 8 Açık Okuma Çerçevesi 88
CA-125 :Kanser Antijen 125
cAMP :Siklik Adenozin Monofosfat
CASP-3 :Kaspaz 3
CCL7 :C-C Motif Kemokin Ligandı 7
CCND1 :Siklin D1
CD25 :İnterlökin-2 Reseptör Alfa Zinciri
CDK2 :Siklin Bağımlı Kinaz 2
CDK6 :Siklin Bağımlı Kinaz 6
CDK12 :Siklin Bağımlı Kinaz 12
cDNA :Tamamlayıcı DNA
CDS :Kodlanan Dizi
CHEK2 :Kontrol Noktası Kinaz 2
CLDN3 :Claudin 3
c-MYC (MYC) :Myc Protoonkogen
COL3A1 :Kollajen Tip III Alfa 1 Zinciri
COL11A1 :Kollajen Tip XI Alfa 1 Zinciri
COL18A1 :Kollajen Tip XVIII Alfa 1 Zinciri
CPEB2 :Sitoplazmik Poliadenilasyon Elemanı Bağlayıcı Protein
CS :Bağlam Skoru
CSMD3 :CUB ve Sushi Çoklu Etki Alanları 3
CT :Bilgisayarlı Tomografi
C_t :Döngü Eşik Değeri
ctDNA :Dolaşımdaki Tümör DNA
DGCR8 :DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8 Protein
dH_2O :Distile Su
DLEC :Akciğer Ve Özofagus Kanserinde Silinen 1
DNA :Deoksiribonükleik Asit
dNTP :Deoksinükleotid
E2F :E2 Faktör
EAOC :Endometriozis İlişkili Over Kanseri
EMT :Epiyelyal Mezenkimal Geçiş
EOK :Epitelyal Over Kanseri
ERBB2 :Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2

Exp-5 :Exportin 5
FAM229B :Sıra Benzerlik Ailesi 229, B Üyesi
FAT3 :FAT Atipik Kadherin 3
FDA :Gıda ve İlaç İdaresi
FIGO :Uluslararası Obstetrik ve Jinekoloji Federasyonu
FOL3 :Folik Asit Sentezi 3
FOLR1 :Folat Reseptörü 1
GABRA6 :Gama Aminobütirik Asit Tip A Reseptör Alfa 6 Alt Birimi
GALNT3 :Asetilgalaktozaminiltransferaz 3
GLUT :Glikoz Taşıyıcı
GTPaz :Guanozin Trifosfataz
G Protein :Guanin Nükleotid Bağlayıcı Protein
HGSC :Yüksek Dereceli Seröz Karsinoma
HE-4 :İnsan Epididimis Protein 4
HMGA2 :Yüksek Hareketlilik Grubu AT-Hook 2
hMLH1 :İnsan Mutl Homolog 1
HNPCC :Kalıtsal Nonpolipolipozis Kolorektal Kanser
HRAS :Harvey Rat Sarkoma Viral Onkogen Homolog
ICAM4 :Hücrelerarası Yapışma Molekülü 4
IMP-1 :IGFII mRNA Bağlama Proteini
KNDC1 :Kinaz Non Katalitik C-Lob Alanı Containing 1
KRAB :Krüppel İlişkili Kutu
KRAS :Kirsten Rat Sarkoma Viral Protoonkogen
LGSC :Düşük Dereceli Seröz Over Karsinomu
LNA :Kilitli Nükleik Asit
LOC134466 :Çinko Parmak Proteini 300 Psödogen
LOH :Heterozigosite Kaybı
LS :Lynch Sendromu
MAGE-A1 :Melanom Antijen Ailesi A, 1
MCM3 :Minikromozom Bakım Kompleksi Bileşeni 3
MCM5 :Minikromozom Bakım Kompleksi Bileşeni 5
MIA :Çoklu Endeks Yaklaşımı
MLH1 :Mutl Homolog 1
MLH3 :Mutl Homolog 3

MMP-9 :Matriks Metallopeptidaz 9
MMR :Yanlış Eşleşme Onarım Genleri
MR :Manyetik Rezonans
MRE :Mirna Tepki Elemanları
mRNA :Mesajcı RNA
MS :Kütle Spektroskopisi
MSH2 :Muts Homolog 2
MSH6 :Muts Homolog 6
MUC16 :Müsin 16
NBN :Nibrin
NCCN :Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı
ND :Belirlenmemiş
NF1 :Nörofibromatoz Tip 1
NGS :Yeni Nesil Dizileme
NIH :Ulusal Sağlık Enstitüleri
NMR :Nükleer Manyetik Rezonans
NOTCH1 :Nörojenik Lokus Notch Homolog Protein 1
NRAS :Nöroblastom RAS Viral Onkogen Homolog
NTC :Negatif Kontrol
NUDCD2 :Nudc Alanı Containing 2
ORF :Açık Okuma Çerçevesi
P14ARF :Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A ($P16^{INK}4A$)
PALB2 :BRCA2'nin Ortak ve Lokalizörü
PCR :Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
PDCD5 :Programlanmış Hücre Ölümü 5
PET :Pozitronm Emisyon Tomografi
PIK3CA :Fosfatidilinositol 4,5-Bisfosfat 3 Kinaz Katalitik Alt Birim Alfa
PMS2 :PMS1 Homolog 2, Yanlış Eşleşme Onarım Sistemi Bileşe
PYCARD :PYD ve CARD Domain Containing
RAD50 :Çift Zincir Kırıkları Onarım Proteini
RAD51C :RAD51 Paralog C
RAD51D :RAD51 Paralog D
RAN-GTP :Ras İlişkili Nükleer Protein - Guanozin Trifosfat
RASSF1A :Ras İlişkili Domain Aile Üyesi 1

RB1 :RB Transkripsiyonel Corepressor 1
RCC :Renal Hücreli Karsinoma
RICS :RNA İndüklü Susturucu Kompleksi
ROMA :Over Malignite Algoritması Riski
RNA :Ribonükleik Asit
Rnaaz :Ribonükleaz
RNA Pol II :RNA Polimeraz II
RNA Pol III :RNA Polimeraz III
RT :Ters Transkriptaz
SAGE :Gen İfadesinin Seri Analizi
SGNE1 :Secretogranin V
SOC :Seröz Over Kanseri
STIC :Seröz Tubal İntraepitelyal Karsinom
SYNE1 :Spektrin İçeren Nükleer Zarf Proteini Tekrarı 1
QC :Kalite Kontrolü
Qpcr :Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)
T.C :Türkiye Cumhuriyeti
TCGA :Kanser Genom Atlası
THSK :Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
TIC :Tümor *"Initiating"* Hücreleri
TMEM218 :Transmembran Protein 218
TMEM230 :Transmembran Protein 230
TP53 :Tümor Protein P53
TRBP :HIV Transaktivasyon Cevabı RNA Bağlayıcı Protein
TWIST1 :Twist Ailesi BHLH Transkripsiyon Faktörü 1
UCSC :Santa Cruz, Kaliforniya Üniversitesi
U.K :Birleşik Krallık
UTR :Kodlanmamış Bölge
VTCN1 :T-Hücre Aktivasyon İnhibitörü İçeren V-Set Alanı 1
ZADH2 :Çinko Bağlayıcı Alkol Dehidrogenaz Domain Containing 2
ZAR1L :Zigot Tutuklayıcı 1 Benzeri
ZNF812 :Çinko Parmak Proteini 812

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OVER KANSERİNİN ERKEN TANISI İÇİN ADAY MİRNA'LARDAN BİYOMARKIR SEÇİMİ

Berkcan DOĞAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Tuba GÜNEL

Over kanseri dünya çapında kadın ölümlerine neden olan beşinci kanser tipidir. Epitelyal over kanseri (EOK) ölüm oranı en yüksek over kanseri çeşididir, genellikle asemptomiktir ve uygun tarama testlerinin sayısı azdır. EOK'nin erken teşhisi klinikte büyük önem taşır. EOK yaklaşık %70 oranında ileri evrede kendini gösterir ve bu hastaların %30'undan daha azı 5 yıldan fazla yaşamını devam ettirebilir. Buna karşılık, evre I'de tanısı koyulan hastaların 5 yıllık sağkalım oranı %90'a, evre II'dekilerin 5 yıllık sağkalım oranları %70'e kadar çıkmaktadır.

Kanser kitlesinin gözlenmesi ve biyopsisi erken evrelerde zor olduğu için invaziv olmayan yöntemlerle tanı koyulması gittikçe önem kazanmaktadır. Bu nedenle; kanserin ilk evresinden itibaren vücut sıvılarına geçen tümör materyallerinin (dolaşımdaki tümör hücreleri, serbest nükleik asitler ve eksozomlar) tespiti, erken evrelerde tanı koyulmasına olanak tanıyacaktır. Likit biyopsi olarak adlandırılan bu yöntem ile elde edilen materyallerin over kanserine spesifik olduğu kanıtlanırsa daha nesnel ve karşılaştırılabilir potansiyel serum biyomarkıları olarak kullanılabilir. Son yıllarda en çok çalışılan serum biyomarkırlarından mikroRNA'lar (miRNA'lar), mRNA'ları hedefleyerek gen ifadesini düzenleyen, kodlama yapmayan kısa RNA molekülleridir. Sağlıklı bireylerden farklı olarak; hastalığa, hastaya ve hastalığın evresine göre anlatımı değişkenlik gösteren miRNA'lar, EOK dahil olmak üzere özellikle kanser ve birçok hastalığın erken tanısında potansiyel biyomarkır özelliği taşımaktadır. Son yıllardaki EOK ile ilgili çalışmalar; miRNA anlatım profillerinin oluşturulması ve periferik kan kökenli miRNA'ların dolaşımdaki yeni biyomarkırlar olarak tanımlanmasına odaklanmıştır.

EOK hastalarının serumları ve aynı yaş aralığındaki sağlıklı bireylerin serum örnekleri ile yapılan mikrodizilim sonucunda anlatım farklılığı saptanan 4 aday miRNA'nın (hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-548am-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-let-7d-3p) biyomarkır potansiyelleri bu tez kapsamında araştırılmıştır. Mikrodizilim verileri, 4 miRNA'nın over kanseri hastalarının serumlarında anlatımının önemli derecede azaldığını göstermiştir ($p<0.05$). Real-time PCR tekniği ile yapılan validasyon sonucunda da aynı miRNA'ların anlatımının sağlıklı bireylere göre azaldığı tespit edilmiştir. Hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-let-7d-3p anlatım değişimleri istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Validasyonu yapılan miRNA'ların *"Pathway Studio"* veri tabanı ile hangi genleri ve yolakları etkilediği belirlenmiştir. Kanserde önemli bir düzenleyici olan hsa-let-7d-3p'nin hedef genlerinden biri olan *hmga2* geni veri tabanına göre belirlenmiştir. Hsa-let-7d-3p'nin over kanseriyle ilişkisi bilinen *hmga2* genine etkisini araştırmak üzere anlatım analizi yapılmıştır. Bu araştırma sonucunda, hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-548am-5p ve hsa-miR-885-5p miRNA'larının erken tanı panellerine eklenebileceği ve potansiyel biyomarkır olabileceği ileri sürülmüştür. EOK'un patofizyolojisini araştırmaya yönelik yapılan çalışmalarda, hsa-let-7d-3p'nin *hmga2* geninin regülasyonu üzerindeki etkisi tam olarak belirlenememiştir.

Mayıs 2018, 92 sayfa.

Anahtar kelimeler: over kanseri, miRNA, biyomarkır, erken tanı, real-time PCR, yolak analizi

SUMMARY

M.Sc. THESIS

SELECTION OF BIOMARKER FROM CANDIDATE MIRNAS FOR EARLY DETECTION OF OVARIAN CANCER

Berkcan DOĞAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Ovarian cancer is the fifth cancer type which is the cause of women deaths in worldwide. Epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal ovarian cancer type, is usually asymptomatic, and few screening tests are available. Early detection of EOC has a great importance in the clinic. EOC shows itself at the rate of approximately %70 on the advanced-stage and less than 30% of these patients may continue their life for 5 years more. In contrast, the 5-year survival rate of patients diagnosed in stage I is 90% and the 5-year survival rate of patients diagnosed in stage II is up to 70%.

Since observing of cancer mass and biopsy are difficult in early stages, diagnosis by noninvasive methods are getting more and more important nowadays. Therefore, the detection of tumor materials (in circulating tumor cells, free nucleic acids, and exosomes) passed to body fluids in the first stage of cancer can make possible the early diagnosis of cancer. If the materials obtained by the method, called liquid biopsy, are proven to be specific to ovarian cancer, they can be used as more objective and comparable potential serum biomarkers. In recent years, one of the most studied serum biomarkers is microRNAs (miRNAs) which are non-coding short RNAs family and also regulate gene expression by targeting mRNAs. Unlike healthy individuals, as having the expression variability according to the disease, the patient and the stage of disease, miRNAs have the potential biomarker in early detection of many diseases and especially cancer, including EOC. The studies on EOC in recent years have focused on the

creation of miRNA expression profiling and the identification of miRNAs derived from peripheral blood as new biomarkers in circulation.

The biomarker potentials of 4 candidate miRNAs (hsa-miR-885-5p, hsa-let-7d-3p, hsa-miR-548am- 5p, hsa-miR-1909-5p), whose expression levels have been determined as different using microarray by comparing serum samples of healthy individuals with the serum of EOC patients in the same age range as, were investigated in this thesis. Microarray data have shown that expression of 4 miRNAs decreases significantly in the serum of EOC patients ($p < 0.05$). Also, the expression of same miRNAs has been validated by Real-time PCR technique in this study. Different expressions of hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-let-7d-3p were statistically significant ($p < 0.05$). It has been detected which genes and related pathways affected by the validated miRNAs using "Pathway Studio" database. An important regulator of cancer as one target genes of hsa-let-7d-3p has been identified hmga2 gene according to the database. The expression analysis of this gene, which is known related to ovarian cancer, has been performed to determine the effect of hsa-let-7d-3p on hmga2 gene. As a result of this research, it has been suggested that hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-548am-5p, and hsa-miR-885-5p miRNAs can be added to early diagnosis panels and be utilized as potential biomarkers. In studies to investigate the pathophysiology of EOC, the effect of hsa-let-7d-3p on the regulation of the hmga2 gene has not been accurately determined.

May 2018, 92 pages.

Keywords: ovarian cancer, miRNA, biomarker, early diagnosis, real-time PCR, pathway analysis

1. GİRİŞ

Over kanseri, dünya genelinde en yaygın olarak teşhis edilen üçüncü kanser türüdür ve jinekolojik kanser ölümlerinin başlıca sebebidir (Shi ve diğ., 2017). Her yıl 140.000'nin üzerinde ölüme neden olan over kanserinde mevcut tedavilerin yetersiz kalması göz önüne alındığında, 5 yıllık sağkalım oranı %50'nin altındadır (Retamales-Ortega ve diğ., 2017). Buna karşılık, evre I'deki 5 yıllık sağkalım oranı %90'a, evre II'dekilerin 5 yıllık sağkalım oranları %70'e kadar çıkmaktadır. Over kanseri hastalarının büyük bir kısmı sporadiktir ve yaklaşık %90''lık kısmı epitelyal over kanseri (EOK)'dir. Araştırmamızdaki hasta grubu olarak seçilen EOK; overin yüzey epitelinden köken alır ve postmenopozal dönemdeki 50-60 yaş aralığında kadınlarda daha sık görülür (Retamales-Ortega ve diğ., 2017; Romero ve Bast, 2012). EOK'un tümörleri farklı morfolojik ve genetik özelliklere sahip olduğu için çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. WHO'nun (Dünya Sağlık Örgütü) güncel sınıflandırmasına göre EOK 5 ana sınıfa ayrılır. Bunlar; seröz tümörler, müsinöz tümörler, endometrioid tümörler, berrak hücreli tümörler, serömüsinöz tümörlerdir (Meinhold-Heerlein ve diğ., 2016). EOK türlerinin çoğunu seröz karsinomlar oluşturmaktadır. Bu tipteki tümörlerin kökenlerinin tam olarak anlaşılmasıyla birlikte hastalığın önlenmesi, taraması, erken tanısı, sağkalım oranının arttırılması ve tedavisi için yeni yöntemlerin geliştirilmesi sağlanabilecektir (Srivastava, 2017). Sağkalım oranlarını arttırmak ve en uygun tedavileri belirlemek için; hassas, invaziv olmayan, güvenilir biyomarkırlar gereklidir (Zheng ve diğ., 2013; Retamales-Ortega ve diğ., 2017).

MikroRNA'lar (miRNA) dokuda ve kanda serbest dolaşan nükleik asitler olarak stabil olduklarından araştırmalarda biyomarkır olarak belirlenebilecek moleküllerdir. Son yıllardaki over kanseri ile ilgili çalışmalar; miRNA anlatım profillerinin oluşturulması ve periferik kan kökenli miRNA'ların dolaşımdaki yeni biyomarkırlar olarak tanımlanmasına odaklanmıştır (Nguyen ve diğ., 2013). Ayrıca bu çalışmalar; serum, plazma ve idrar gibi vücut sıvıları içinde dolaşan miRNA'ların tanısal potansiyellerini göstermiştir (Nakamura ve diğ., 2016). Bununla birlikte, miRNA'lar önümüzdeki yıllarda kanser teşhisinde ve kişiselleştirilmiş tıpta köklü değişikliklere neden olabilir (Prahm ve diğ., 2016).

MiRNA'lar bir nematod türü olan *Caenorhabditis elegans*'da Ambros ve diğ. (1993) tarafından keşfedilmiştir. Çoğu türde yüksek derecede korunmuş RNA molekülleridir. Gen anlatımının

düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir. Yaklaşık 18-22 nükleotid uzunluğundaki miRNA'ların düzenleyici işlevleri vardır. Hedeflediği gene bağlanarak; translasyonu baskılar veya mRNA'nın degredasyonunu indükler. Hücre gelişimi, farklılaşması, proliferasyonu ve apoptozu gibi çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesine katılabilir. MiRNA'lar insan genomunda tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'unu düzenler. Bir miRNA yüzlerce mRNA'yı düzenleyebilir ve sonuç olarak gen anlatım ağlarını önemli ölçüde etkileyebilir (Pritchard ve diğ., 2012).

Hücre döngülerindeki işlevsel rollerine dayanarak, bir dizi miRNA'nın tümör progresyonuna dâhil olduğu bildirilmiştir (Gong ve diğ., 2016). Bu nedenle, miRNA'lar çeşitli kanserlerin patogenezinde görev alır. Karaciğer kanseri, prostat kanseri, kolorektal kanser, glioma, medulloblastoma, hepatosellüler karsinom, mide adenokarsinoması, osteosarkom, meme kanseri ve over kanseri oluşumunda rol oynarlar (Gasparri ve diğ., 2017).

MiRNA'lar, onkogenik veya tümör baskılayıcı yolakları etkileyebilirken, onkogenler veya tümör baskılayıcılar tarafından da düzenlenebilir. (Dong ve diğ., 2013). Tümör baskılayıcı miRNA'lar *"tumor supressor miRs"* ve onkogenik miRNA'lar *"oncomiRs"* olmak üzere iki farklı fonksiyon ile tümör gelişiminde etkilidirler. OncomiR'ler, tümör büyümesini baskılayan mRNA'ları hedef alırken; tümör baskılayıcı miRNA'lar, tümör büyümesini teşvik eden mRNA'ları hedef alır. Her iki tipteki miRNA'nın hata tümör hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu, epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) ve metastazını etkiler (Yanokura ve diğ., 2015).

"High-throughput" miRNA teknolojileri, miRNA anlatım analizleri için kullanılan yöntemlerdir. Son zamanlarda mikrodizilim tekniği ile farklı kanser tiplerinde miRNA anlatım profilleri analiz edilmiştir (Zhang ve diğ., 2011). Teknolojik ilerlemeler, miRNA'ların sistematik değerlendirmesi için çok sayıda platform geliştirmiştir. Bu teknikler; büyük ölçüde mRNA anlatım analizlerinden ve mikrodizilim temelli karşılaştırmalı genomik melezlemeden oluşmaktadır. Bununla birlikte miRNA'ların; kısa nükleotid dizilimi, aile üyeleri arasındaki benzerlikleri, olgun ve birincil formlar arasındaki farklılıklardan dolayı diğer nükleik asitlerle karşılaştırıldığında analizleri karmaşıktır (Tam ve diğ., 2014). MiRNA'ların anlatım seviyelerini ölçmek için üç temel yöntem kullanılır; gerçek zamanlı PCR (Real-time PCR, qPCR), mikrodizilim ve yeni nesil dizileme (NGS) (Git ve diğ., 2010). Dolaşımdaki RNA'lar da dahil olmak üzere RNA kantitasyonu için en uygun yöntem qPCR'dir. Kantitasyon için

gerekli RNA miktarı oldukça düşük olmasına rağmen; TaqMan, LNA *"Locked Nucleic Acid"* veya SYBR-Green*"N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine"* teknolojileriyle verimli sonuçlar elde edilir (Rapisuwon ve diğ., 2016).

MiRNA ve mRNA etkileşimi öncelikle biyoinformatik analizler ile tanımlanır. MiRNA-mRNA etkileşimleri biyoinformatik olarak incelendikten sonra deneysel olarak doğrulanır. Bu bilgiler hem normal fizyolojik süreçlerde hem de hastalıkta miRNA'nın etki mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlar (Riffo-Campos ve diğ., 2016).

Bu tez kapsamında, EOK hastalarının serumlarından elde edilen miRNA'ların profilleri ile aynı yaş aralığındaki sağlıklı bireylerin serumlarında anlatım farklılığı göstermiş 4 adet miRNA'nın (hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-548am-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-let-7d-3p) TaqMan prob temelli qPCR tekniği ile validasyonu yapılmıştır. Validasyon için qPCR tekniği, literatürde benzer çalışmalar referans alınarak ve bu tekniğin spesifik hedefleri çoğaltmadaki etkinliğinin yüksek olması göz önünde bulundurularak seçilmiştir.

İnsanda bulunan hsa-miR-1909-5p, 19. kromozomun kısa kolunda (p kolu) 19p13.3 bölgesinde lokalize olan intronik bir miRNA'dır. Literatürdeki çalışmalardan elde edilen bilgilere göre hsa-miR-1909; akciğer adenokarsinomda, skuamöz hücreli özefagus kanserinde ve disembriyoplastik nöroepitelyal tümör oluşumunda rol oynamaktadır (Okumura ve diğ., 2016; Braoudaki ve diğ., 2016; Sato ve diğ., 2017).

İnsanda bulunan hsa-miR-548am-5p, X kromozomunun kısa kolunda (p kolu) Xp22.2 bölgesinde lokalize olan intronik bir miRNA'dır. MiR-548 ailesinin insanda kanser gelişiminde rol oynadığını ve bazı aile üyelerinin tümör hücresi büyümesinin inhibisyonuna katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir (Liu ve diğ., 2017). Bunun yanı sıra, miR-548 ailesinin MAPK sinyal yolağı, hücre siklusu, TP53 sinyal yolağı, melanogenezis, kolorektal kanser, glioma ve küçük hücreli akciğer kanseri, renal hücreli karsinoma gibi yolaklara katılan genleri hedeflediği bilinmektedir (Liang ve diğ., 2012).

İnsanda bulunan hsa-miR-885-5p, 3. kromozomun kısa kolunda (p kolu) 3p25.3 bölgesinde lokalize olan intronik bir miRNA'dır. Literatürdeki çalışmalardan elde edilen bilgilere göre hsa-miR-885-5p'in; preeklampsi, osteoartrit ve kolorektal kanserinde farklı anlatım profiline sahip

olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca karsinoid tümörlerin oluşumunda rol oynadığı da bilinmektedir (Sandrim ve diğ., 2016; Beyer ve diğ., 2015).

Let-7 ailesi; kanser kök hücrelerinin (CSCs) yenilenmesinde, hücre apoptozu, proliferasyon inhibisyonunun indüklenmesinde etkilidir (Sun ve diğ., 2016). Let-7 aile üyelerinin anlatım seviyelerindeki değişim kardiyovasküler hastalıklar, akciğer hastalıkları ve kanser ile ilişkilendirilmiştir (Wagner ve diğ., 2014). Over kanseri de dahil olmak üzere birçok farklı kanser türü içinde genellikle anlatımları azalır. Çalışmalar sonucu let-7 ailesinin bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü düşünülmektedir (Prahm ve diğ., 2016). Let-7 ailesinin bir üyesi olan hsa-let-7d-3p, 9. kromozomun uzun kolunda (q kolu) 9q22.32 bölgesinde lokalize olan intronik bir miRNA'dır. Hsa-let-7d-3p endometriyozisde, dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğunda, epitelyal mezenkimal geçişte (EMT), over kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin kemoterapi direncinde, renal hücreli kanser (RCC), meme kanseri, osteosarkom ve prostat kanserinin oluşumunda rol oynamaktadır (Cho ve diğ., 2015; Wu ve diğ., 2015; Chang ve diğ., 2011; Su ve diğ., 2014; Boyerinas ve diğ., 2012; Sakurai ve diğ., 2012; Ramberg ve diğ., 2011). Bu fonksiyonlarından dolayı, let-7 aile üyelerinden biri olan hsa-let-7d-3p'nin analizleri büyük önem taşır.

Let 7 ailesinin gen regülasyonuna etkileri üzerine, literatüre ve "Pathway Studio®" (v11.4.0.8) analizine dayalı çalışmalar sonunda *kras, c-myc* ve *hmga-2* gibi over kanserinde etkisi bilinen onkogenleri baskıladığı tespit edilmiştir. Fakat aile üyelerinden biri olan hsa-let-7d-3p ile *hmga2* geninin ilişkisi incelenmiştir. HMGA "High Mobility Group A" protein ailesi, DNA sarmalında küçük oluğun A-T'ce zengin bölgelerine bağlanan histon olmayan proteinlerdir (Wagner ve diğ., 2014). Histonlar tarafından gerçekleştirilen kromatin modifikasyonu mekanizmasında lokal ve geçici olarak görev alır (Sgarra ve diğ., 2004). Ayrıca diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşebilir ve dolaylı olarak hedef genlerin transkripsiyonunu düzenleyebilirler (Ozturk ve diğ., 2014). Sağlıklı dokularda, HMGA protein seviyelerinin çok düşük miktarda olduğu tespit edilmiştir (Jingjing ve ark., 2011). *hmga2* yüksek dereceli seröz karsinomada aşırı anlatım yapan birkaç onkogenden biridir. Hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptoz için önemli bir düzenleyicidir. Ayrıca HMGA2 proteini; agresif seyirli tümör büyümesinde, kök hücre yenilenmesinde, DNA hasar tepkisinde ve tümör hücre farklılaşmasında, epitelyal mezenkimal geçişte (EMT) rol oynar. (Jingjing ve ark., 2011). Bazı kanser türlerinde *hmga2* geni let-7 aile üyeleri tarafından negatif olarak düzenlenir. Ayrıca

hmga2, 3'UTR *"Untranslated region"* bölgesinde yedi farklı let-7 bağlanma bölgesi içerir. 3'UTR bağlanma bölgesinin kaybı ile *hmga2*'nin aşırı anlatımına neden olur, bu da tümör oluşumunu başlatır (Wagner ve diğ., 2014).

Mikrodizilim sonuçlarına göre anlatımı anlamlı şekilde değişen 4 adet miRNA'nın validasyonları bu tez kapsamında yapılmıştır. Sonuçlara göre, EOK hasta serum örneklerinde sağlıklı bireylere göre 4 miRNA'nın anlatımının anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur. qPCR yöntemiyle hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-548am-5p, hsa-miR-885-5p ve hsa-let-7d-3p validasyonu gerçekleşmiştir. Validasyon sonuçları aday 4 miRNA'nın anlatımının EOK hastalarında azaldığını doğrulamıştır. *"Pathway Studio"* ve *"TargetScan"* veri tabanı aracılığı ile validasyonu yapılan miRNA'ların hedef gen analizi ve hedef genlerin ilişkili olduğu biyolojik yolaklar değerlendirilmiştir. Tez kapsamında validasyonu yapılan miRNA hsa-let-7d-3p'nin hedef genlerinden biri olan *hmga2* geninin qPCR ile anlatım analizi yapılmıştır.

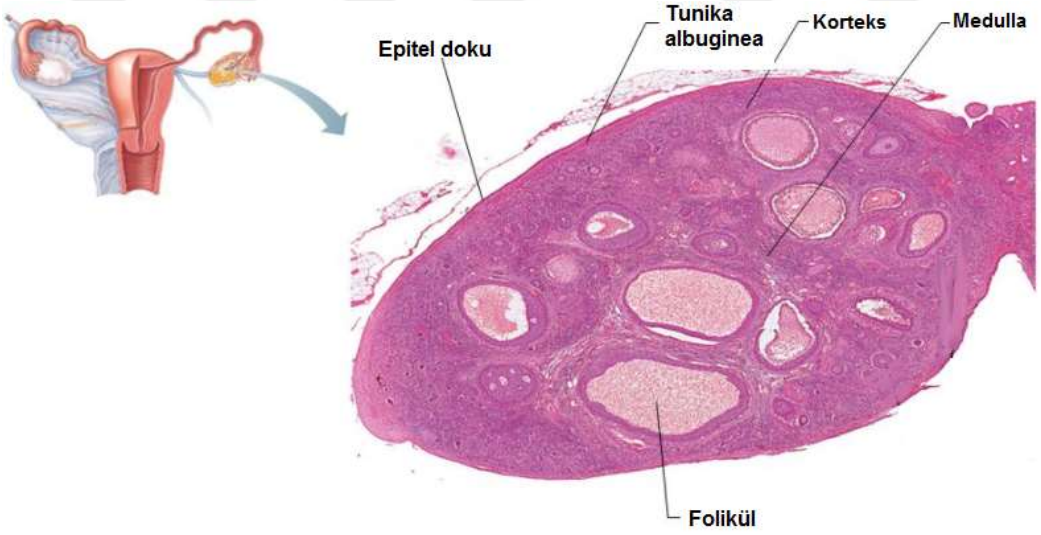
Bu tez çalışması, EOK hastalarının erken tanısında girişimsel olmayan yöntemlerle serumdan elde edilen miRNA'ların biyomarkır olarak kullanılması açısından önemlidir. Hastalığa özgü aday biyomarkır olarak analizleri yapılan miRNA ve aday genlerin, ileride yapılacak bilimsel çalışmalarla desteklenmesi, hastalığın moleküler mekanizmasını açıklama ve tanısını koymaya bizleri bir adım daha yaklaştıracaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. OVER ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Overler, uterusun her iki yanında ve pelvis boşluğunda yer alan organlardır. 2-3 cm uzunluğunda olan overler bir badem büyüklüğündedir. Overlerin büyüklüğü yaşa ve hormonal duruma bağlıdır. Overlerin fonksiyonları; oosit üretmek, östrojen ve progesteron hormonlarını salgılamaktır (Miranda ve Schnatz, 2017).

Sağlıklı bir over yapısında 3 farklı tipte hücre bulunur. Bunlar oositlere farklılaşan germ hücreleri, östrojen ve progesteron üreten stromal hücreler, overlerin yüzeyini örten epitel hücreleridir (Romero ve Bast, 2012). Overlerin yüzeyi tek sıra kübik epitel ile örtülüdür ve bu epitelin altında sıkı bağ doku "*tunika albuginea*" bulunur. Histolojik olarak over 2 kısımdan oluşur: Korteks (kabuk) ve medulla (öz). Oositi içeren korteks sıkı bağ doku yapısındadır ve oosit, bu dokunun dış yüzeyinde gelişir. Gevşek bağ dokudan oluşan medulla da ise; kan damarı, lenf damarları ve sinir ağı bulunur (Şekil 2.1)[1] (Young ve diğ., 2013; Miranda ve Schnatz, 2017).

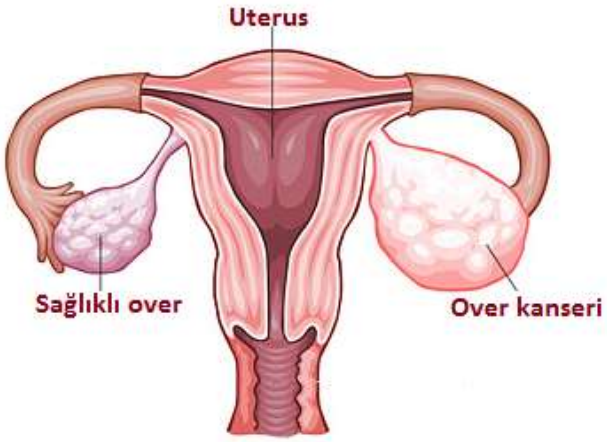


Şekil 2.1: Sağlıklı over yapısı.

[1] http://slideplayer.com/slide/4878971/16/images/55/Cortex+Medulla+Primary+follicles.jpg [Ziyaret tarihi: 20 Ekim 2017]

2.2. OVER KANSERİ

Over kanseri, dünya genelinde jinekolojik kanser türleri arasında en yüksek ölüm oranına sahiptir ve kadınlarda en sık rastlanan beşinci kanser türüdür (Gong ve diğ., 2016; Nakamura ve diğ., 2016). Dünya genelinde her yıl yaklaşık 225.000 kişiye over kanseri tanısı koyulur ve over kanseri her yıl yaklaşık 140.000 ölüme neden olur. Over kanseri hastalarının büyük bir kısmı sporadiktir ve yaklaşık %90'lık kısmı epitelyal over kanseridir (Şekil 2.2) (Nakamura ve diğ., 2016).

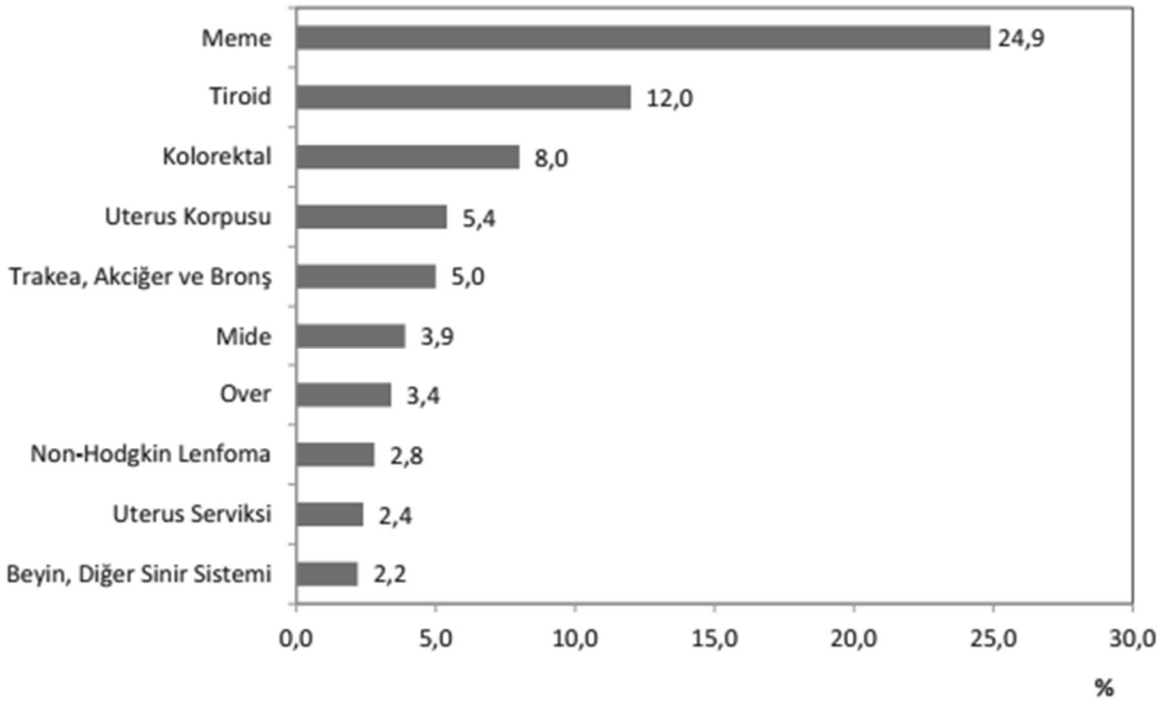


Şekil 2.2: Over kanseri ve sağlıklı over yapısı.[2]

2.2.1. Over Kanseri İnsidansı

Over kanserinin insidansı coğrafi alana ve yaşa göre değişir (Gong ve diğ., 2016). 2017 yılında Türkiye Kanser Daire Başkanlığı'nın yayınladığı istatistiklere göre; Türkiye'de over kanseri kadınlar arasındaki kanser ölümlerinin %4'ünü oluşturmaktadır (Şekil 2.3). 2016 yılı içinde yaklaşık 2.361 kadına over kanseri tanısı koyulmuştur (THSK Kanser Daire Başkanlığı, 2017).

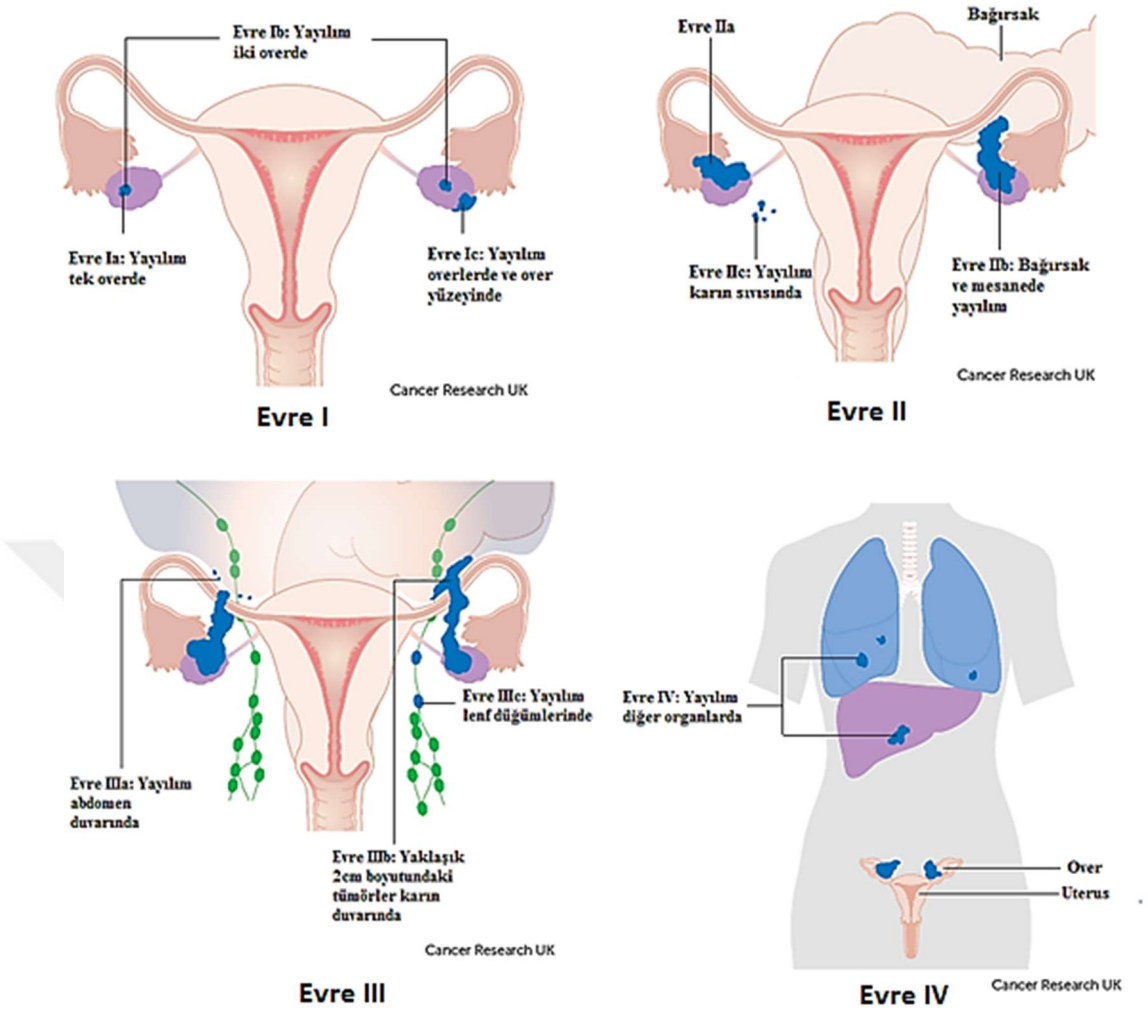
[2]https://www.kkh.com.sg/HealthPedia/Pages/GynaecologicalCancersOvarian.aspx[Ziyaret tarihi: 4 Şubat 2017].



Şekil 2.3: Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen 10 kanser türünün yüzde dağılımı.

2.2.2. Over Kanserinin Evreleri

Over kanseri evrelemede FIGO'nun "*International Federation of Obstetrics and Gynecology*" 2014'te tekrar düzenlediği yeni sistem kullanılmaktadır. FIGO sisteminde, over kanseri dört evreden (Evre I, Evre II, Evre III ve Evre IV) oluşmaktadır. İlk üç evrenin a, b, c alt evreleri mevcuttur (Şekil 2.4). Evre I'de kanser hücreleri sadece overlerde görülür ve yayılımı yavaştır. Evre II, yayılımın overlerin dışında ve pelvisin çevrelediği alan içinde, evre III yayılımın karın boşluğu içinde olduğu evredir. Kanser hücreleri kasık veya rahmin arkasındaki lenf düğümlerinde de bulunabilir. Evre IV ise, kanserin karaciğer, akciğerler gibi diğer vücut organlarına yayılmış olduğu evredir (Cancer Research U.K, 2016).



Şekil 2.4: FIGO'ya göre over kanserinin evreleri (Cancer Research U.K, 2016).

2.2.3. Over Kanserinin Sınıflandırılması

Over tümörleri farklı morfolojik ve genetik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Over kanserleri ilk olarak epitelyal ve epitelyal olmayan over kanserleri olarak 2 gruba ayrılır. Epitelyal olmayan over tümörleri; germ hücre kökenli, stromal hücre kökenli, küçük hücreli karsinomlar ve sarkomalardan olmak üzere dört alt gruba ayrılır. Bu tümörler over kanserlerinin %10-15'ini oluşturur ve tüm yaş gruplarında görülür (Boussios ve diğ., 2016).

Epitelyal over tümörleri ise 2014 yılında FIGO'nun güncel over kanseri evrelendirmesinden sonra, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yeniden sınıflandırılmıştır. Yeni sınıflandırma güncel histopatolojik bulgulara dayanarak yapılmıştır. WHO, farklı tipteki EOK kökenini, patogenezini ve prognozunu göz önünde bulundurmuştur. FIGO sınıflandırmasını tümör derecesine göre yaparken, WHO sınıflandırmasını tümör tipine göre yapmıştır. Bu

sınıflandırılmalar, hastalık prognozunun belirlenmesinde ve etkili bir tedavi yönteminin seçilmesinde temel kriterdir.

FIGO tarafından 2014 yılından önceki sınıflandırmada overin yüzey epiteli, epitelyal over tümörlerinin kökeni olarak ele alınmıştır. 2014 yılındaki güncel sınıflandırmada, EOK'un bir alt sınıfı olan yüksek dereceli seröz karsinomaları tubal karsinogenezis ile ilişkilendirilmiştir. Fakat bu tümörlerin yaklaşık %30'unda tubal öncü lezyon bulunmamıştır. WHO, yüksek dereceli seröz kanserlerin kökenini kesin olarak tespit etmenin mümkün olmadığını vurgulamıştır. Yeni sınıflandırmada over kanserinin transizyonel hücreli tümör sınıfı kaldırılmıştır. Seromüsinöz tümörler olarak yeni bir alt sınıf eklenmiştir (Meinhold-Heerlein ve diğ., 2016). WHO'ye göre güncel EOK histolojik sınıflandırılması;

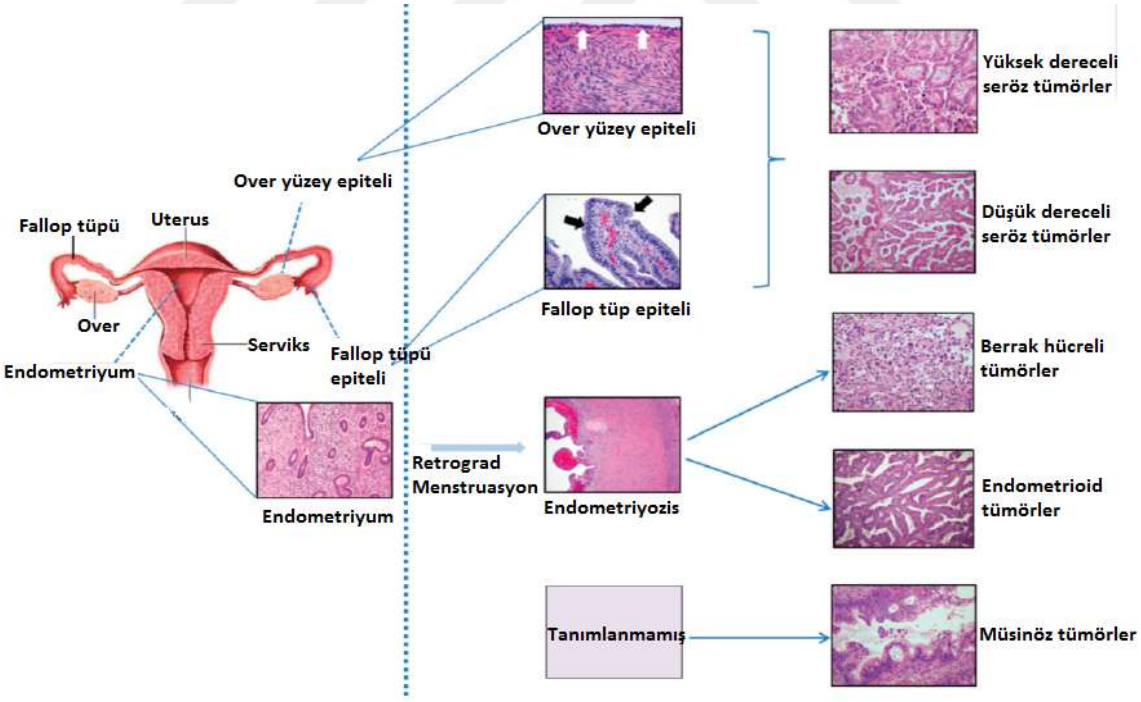
- ✓ Seröz tümörler (yüksek dereceli seröz tümörler ve düşük dereceli seröz tümörler),
- ✓ Müsinöz tümörler,
- ✓ Endometrioid tümörler,
- ✓ Berrak hücreli tümörler,
- ✓ Serömüsinöz tümörler şeklindedir (Meinhold-Heerlein ve diğ., 2016).

2.2.4. Over Kanser Biyolojisi

Over tümörlerinin büyük bir kısmı, normal over yapısında bulunmayan hücre tiplerinden (endometriyal veya fallop tüpü epiteli) oluşabilir (Karlan ve diğ., 2016). Over kökenli tümörler ise germ hücreleri, stromal hücreler ve epitel hücrelerden oluşur (Romero ve Bast, 2012). EOK'un oluşumu tümör tipine göre değişmektedir (Şekil 2.5).

Epitelyal over kanserinin histopatolojik alt sınıfından biri olan seröz tümörler iki gruba ayrılır: Yüksek dereceli seröz tümörler ve düşük dereceli seröz tümörler. Yüksek dereceli seröz karsinomlar *"High Grade Serous Carcinoma"* (HGSC), over kanserlerinin %70-74'ünü oluşturur. HGSC'ler; *tp53, brca1* ve *brca2* tümör baskılayıcı genlerinde sık görülen mutasyonlara bağlı olarak gelişir. HGSC'lerin önemli bir bölümü fallop tüpü epitelinden kaynaklanır ve anormal hücre çekirdeği ile hücre çoğalmasında artış ile karakterizedir. Over yüzey epiteli dışında gelişen seröz tubal intraepitelyal karsinomlar "*Serous Tubal İntraepithelial Carcinoma*" (STIC) ile HGSC'ın benzer yapıda olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar daha sonra HGSC'li kadınların %50-70'inde, seröz tubal intraepitelyal tümörleri

tespit etmişlerdir. HGSC'li kadınlarda seröz tubal intraepitelyal karsinom lezyonları yüksek oranda bulunurken, fallop tüpü epitelinden kaynaklanmayan HGSC'nin kökeni belirsizdir (Karlan ve diğ., 2016). Düşük dereceli seröz tümörler (LGSC), seröz borderline over tümörleri ile birlikte ortaya çıkarlar ve genellikle iyi huylu tümörlerdir. Bununla birlikte, seröz borderline tümörlerin kökeni belirsizdir. Bazı araştırmacılar, LGSC'nin fallop tüpü lezyonlarından ayrılan hücrelerin overe yerleşmesiyle meydana geldiğini düşünmektedir. Morfolojik ve moleküler genetik çalışmalar, endometrioid ve berrak hücreli tümörlerin %15-50'sinin, endometriyosizle ilişkili olduğunu göstermiştir. Endometriyozisli kadınlarda over kanseri gelişme riski 2-3 kat artmaktadır. Bu tümörler, endometriyum kök hücrelerinden veya doğum sırasında endometriyumun dışına çıkan öncül hücre kaynaklıdır. Bu hücreler, ilk menstrüasyondan sonra farklılaşır. Endometriotik kistler, endometrioid ve berrak hücreli tümörlere farklılaşabilir. Müsinöz tümörlerin (MC) hücresel kökeni hala belirsizdir. MC'lerin bir kısmı, over germ hücreli tümörlerden köken alır. Son zamanlardaki çalışmalar, bazı müsinöz tümörlerin farklı over tümörlerinden kaynaklanabileceğini göstermiştir. Özetle, over kanserlerinin yalnızca küçük bir kısmı over yapısından kaynaklanır (Karlan ve diğ., 2016).



Şekil 2.5: Epitelyal over tümörlerinin biyolojisi (Karlan ve diğ., 2016).[3]

[3] Retrograd Menstruasyon: Kanın -ters yön izleyerek- fallop borularından batın içine geçişi.

2.2.5. Over Kanseri Risk Faktörleri

Over kanseri, geç evrelere kadar asemptomatik olmasından dolayı sessiz katil "*silent killer*" olarak adlandırılır (Gajjar ve diğ., 2012). Bu nedenle, over kanseri risk faktörleri göz önüne alınarak hastalığın gelişimi ile ilgili tespitler yapılabilir. Over kanseri popülasyonda 50-60 yaş aralığındaki bireylerde en yüksek oranda görülür. En önemli risk faktörü ailesel meme veya over kanseri geçmişinin olmasıdır. Tablo 2.1'de over kanseri gelişimini arttıran, azaltan ve henüz tam olarak aydınlatılmamış risk faktörleri gösterilmiştir (Hunn ve Rodriguez, 2012; Nguyen ve diğ., 2013).

Tablo 2.1: Over kanseri risk faktörleri (Hunn ve Rodriguez, 2012).

ARTTIRAN	AZALTAN	BELİRSİZ
Kalıtsal	**Üreme ile İlgili**	Fertilize ilaçlar
Over kanseri aile geçmişi	Multiparite	Egzersiz
Meme kanseri aile geçmişi	Emzirme	Sigara
brca1, brca2 mutasyonu	**Hormonal**	
Lynch sendromu	Progesteron	
Üreme ile İlgili	Doğum kontrol hapları	
İleri yaş	**Ameliyat**	
Kısırlık	Histerektomi	
Nuligravid	Tüp ligasyonu	
Hormonal		
Östrojen		
Erken menarş		
Geç menopoz		
Hormon replasman tedavisi		
Androjen		
Enflamatuvar		
Endometriyozis		
Perineal talk pudrası kullanımı		
Pelvik enflamatuvar hastalık		
Yaşam Stili		
Obezite		
Coğrafya		
Uç enlemler		

2.2.6. Over Kanseri Tanısında Kullanılan Yöntemler

Over kanserinin büyük bir kısmının sporadik gelişmesi ve hastalığa ait spesifik semptomların olmaması, tarama testlerinin belirlenmesindeki güçlüklerdir (Srivastava, 2017). Yapılan araştırmalara rağmen, over kanseri tanısında kullanılabilecek verimli tarama yöntemleri hala oluşturulamamıştır (Nakamura ve diğ., 2016; Hunn ve Rodriguez, 2012). Aşağıdaki bölümde over kanseri tanısında kullanılan bazı yöntemler açıklanmıştır.

2.2.6.1. Fiziksel Muayene

Over kanseri hastalarında belirgin bir pelvik kitle bulunur. Pelvik muayenesi, kötü ve iyi huylu tümör ayrımının yapılmasında etkili bir yöntem değildir. Ayrıca özgüllük ve duyarlılık oranı etkin bir tarama testi için yeterli değildir (Nguyen ve diğ., 2013).

2.2.6.2. Tanısal Görüntüleme

Jinekolojik onkolojide primer görüntüleme yöntemi ultrasonografidir. Ultrason, jinekolojik kanserlerin; primer tanısında, pelvis ve karın boşluğundaki tümör boyutlarının değerlendirilmesinde, tedavi yanıtının izlenmesi ve değerlendirilmesinde kullanılır (Fischerova ve Cibula, 2015).

Bir diğer tanısal görüntüleme yöntemi bilgisayarlı tomografidir. *"Computed Tomography"* CT taraması vücudu kesitler halinde detaylı olarak görüntüleyen X-ray prosedürüdür. Başlıca avantajı ileri evredeki over kanseri hastalarında tedavi planlamasıdır. CT ile küçük over tümörleri tespit edilemez (American Cancer Society, 2016; Schorge ve diğ., 2008).

2.2.6.3. Laparoskopi

Bu yöntemde overleri, diğer pelvik organları ve dokuları inceleyebilen ince bir tüp kullanır. Laparoskopi ile kanserin evresi ve tümörün yayılma derecesi belirlenir (American Cancer Society, 2017).

2.2.6.4. Kolonoskopi

Kolonoskopi, kalın bağırsağın iç kısmını (kolon) incelemek için bir yoldur. Bu yöntem, kolorektal kanseri teşhisi için daha sık kullanılır. Bu prosedürün over kanserinde kullanımı konstipasyon (kabızlık) gibi over kanseri semptomlarını araştırmaktır (American Cancer Society, 2017).

2.2.6.5. Biyopsi

Over kanserinde biyopsi çoğunlukla tümör dokunun alınmasıyla yapılır. Bu yöntem genellikle ileri evredeki kanser hastalarında kullanılır çünkü biyopsi ile kanserin yayılma olasılığı göz önünde bulundurulur. Parasentez tekniği ile karın boşluğu içinde birikmiş sıvı (asit) örnekleri de tanı amacıyla kullanılır (American Cancer Society, 2017).

2.2.6.6. Kan Testleri

Over kanseri şüphesiyle yapılan kan testi analizlerinde, yüksek miktardaki CA-125 *"Cancer Antigen 125"* seviyesinin tümör dokusundan kaynaklandığı bulunmuştur. CA-125 glikoprotein antijeni, over kanserlerinin %85-90'ını oluşturan epitelyal over tümörleri için en sık ölçülen tümör biyomarkırıdır (Nguyen ve diğ., 2013). İleri evredeki over kanseri hastalarının %80'inden fazlasında, erken evredeki over kanserlerinde ise %50'sinde CA-125 anlatımının yükseldiği tespit edilmiştir (American Cancer Society, 2017). Ancak, CA-125 hem normal fizyolojik koşullarda hem de kanser gelişiminde anlatımı artabilmektedir. İyi ve kötü huylu tümörlerin ayrımını da yapamaz. Buna ek olarak; ırk, yaş, sigara öyküsü, obezite ve histerektomi gibi bazı faktörlerin CA-125 düzeylerini değiştirebileceği bulunmuştur. Bu yüzden CA-125'in özgüllüğü ve duyarlılığı zayıftır (El Bairi ve diğ., 2017; Rauh-Hain ve diğ., 2011).

2.2.7. Over Kanserinin Kalıtımı

Over kanserlerinin yaklaşık %23'ü kalıtsal bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Kalıtsal bozukluklarla ilişkilendirilmiş tümörlerin yaklaşık %65-85'i; DNA onarım bozukluklarına neden olan *brca "breast cancer"* genlerindeki germline mutasyonudur. Mutasyon taşıyan bireylerde over kanseri gelişim riski farklılık gösterebilir. Örneğin; *brca1* ve *brca2* mutasyonu meme kanseri gelişim riskini %85'e, over kanseri gelişim riskini %54'e kadar çıkarır. Ayrıca, *brca* genlerindeki mutasyon pankreas ve prostat kanseri gelişimine de sebep olabilir (Toss ve diğ., 2015). *brca* genlerindeki mutasyonla oluşan over kanserinde, *tp53 "tumor protein p53"* geninin inaktivasyonu gereklidir. Tümör baskılayıcı bir gen olan *tp53*'ün protein ürünü hücre bölünme evreleri arasındaki geçişi engeller böylece tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını durdurur (Schorge ve diğ., 2008).

"Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer" (HNPCC) olarak da bilinen Lynch sendromu (LS), kalıtsal bozukluklarla ilişkilendirilmiş over kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. LS, MMR

"*Mismatch Repair*" yanlış eşleşme tamiri genlerindeki (*mlh1, msh2, msh6, mlh3* ve *pms2*) germline mutasyonları ile meydana gelir. Mutasyon sonucunda MMR proteinlerinin anlatımı azalır. Bu da DNA hasarlarının onarılmamasına bağlı olarak kanserleşmeyi tetikler (Toss ve diğ., 2015).

tp53 genindeki mutasyon ise over kanserinde en sık görülen bir diğer genetik anomalilerden biridir. *tp53* geni, DNA hasarları da dahil olmak üzere, çeşitli hücresel streslere tepki olarak bir transkripsiyon faktörü kodlar. Aktive olmuş TP53 proteini, hücre döngüsünü durdurmak için hedef genlerin düzenleyici dizilerine (promotör, enhancer veya silencer) bağlanır. *tp53* mutasyonları sonucu meydana gelen tümörler; düşük sağkalım oranı, yüksek nüks oranı, kemoterapi ve radyasyona karşı artmış direnç ile karakterizedir (Toss ve diğ., 2015; Lee ve diğ., 2013). Bazı over tümörlerinin oluşum evresinde, *kras "kirsten rat sarcoma viral proto-oncogene"* onkogenik mutasyonları oluşur. Onkogen *ras* ailesi; *kras, hras "harvey rat sarcoma viral oncogene homolog"* ve *nras "neuroblastoma ras viral oncogene homolog"* genlerini içerir. Bu genlerin protein ürünleri, hücre döngüsünün düzenlenmesine ve hücre proliferasyonunun kontrolüne katılır. Bu nedenle, Ras genlerindeki mutasyonlar, apoptozu inhibe ederek hücre proliferasyonun ilerlemesini sağlar. Bu özelliğinden dolayı bu genlerdeki mutasyonlar karsinogenezle ilişkilendirilmiştir (Schorge ve diğ., 2008). EOK'un alt tiplerinde mutasyona uğrayan onkogenler ve tümör baskılayıcı genler farklılık gösterebilir (Karlan ve diğ., 2016) (Tablo 2.2).

Genetik değişimler bakımından over kanseri, yüksek dereceli ve düşük dereceli tümörler olmak üzere iki sınıfa ayrılır. *tp53, brca1* ve *brca2* gen mutasyonları, kromozom 7q ve 9p bölgelerinde heterozigosite kaybı (LOH) olan tümörler yüksek dereceli tümörlerdir. *kras, braf "b-raf proto-oncogene"* ve *pık3ca "phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3 kinase catalytic subunit alpha"* gen mutasyonları, kromozom Xq bölgesindeki heterozigosite kaybı (LOH), mikrosatellit instabilitesi ve tümör hücrelerinin büyümesini baskılayan amfiregulin proteinin anlatımı olan tümör tipleri ise düşük dereceli tümörler olarak adlandırılır (Bast ve diğ., 2009).

Tablo 2.2: Epitelyal over karsinomalarında karakteristik mutasyonlar (Karlan ve diğ., 2016).

KARSİNOM TİPİ	ONKOGENLER	TÜMÖR BASKILAYICI GENLER
Yüksek dereceli seröz karsinomlar	Mutasyon tespit edilmemiş	•*brca1, brca2:* DNA hasarının onarılmasına yardımcı olur ve DNA hasarı tamir edilemiyorsa hücreleri yok eder •*tp53:* Çoğu kanserde mutasyona uğramış ve DNA onarımında görevlidir
Düşük dereceli seröz karsinomlar	•*braf:* Hücre içi sinyal iletimi ile hücre büyümesini kontrol eder •*kras:* Tümör büyümesi için gerekli proteinleri aktive eder	Tanımlanmamış
Müsinöz karsinom	•*braf* •*erbb2:* Tümör gelişimini hızlandırır ve hücre ölümünü engellemek için sinyal moleküller ile etkileşime giren reseptör tirozin kinazı. •*kras*	•*cdkn2a:* Hücre döngüsünün tutuklanmasını indükler •*rnf43:* Wnt sinyal yolunu inhibe eder •*tp53*
Endometrioid karsinom	•*ctnnb1:* Gen transkripsiyonunu ve hücre-hücre adhezyonunu düzenler •*kras* •*pık3ca:* hücre çoğalmasını, hücre göçünü ve hücre sağkalımını yönetir •*ppp2r1a:* Hücre büyümesini ve bölünmesini inhibe eden sinyal yollarını düzenler	•*arıd1a:* DNA'ya transkripsiyon faktörlerinin erişilebilirliğini değiştirerek geni düzenler •*brca1, brca2* •*pten:* Hücre büyümesini inhibe eder
Berrak hücreli karsinom	•*kras* •*pık3ca* •*ppp2r1a*	•*arıd1a* •*pten* •*tp53*

2.3. KANSER BİYOMARKIRLARI

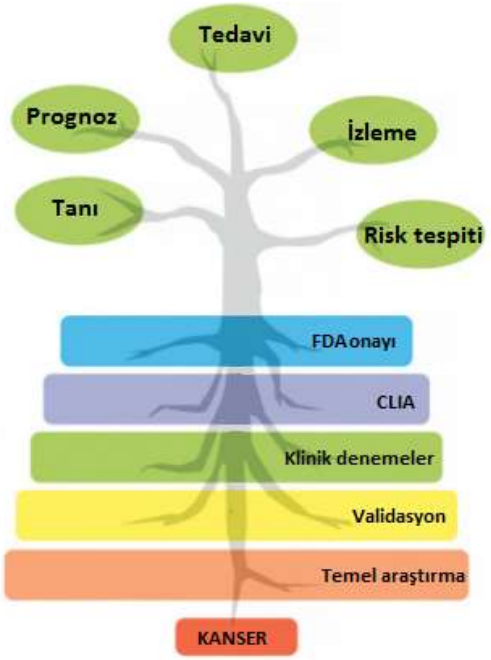
Biyomarkır, normal bir fizyolojik durumu patolojik bir durumdan ayırt edilmesini sağlayan veya terapötik müdahaleye karşı oluşturulan moleküllerdir. NIH'a *"National Institutes of Health"* göre biyomarkırlar; kan, diğer vücut sıvıları veya dokularda (solid tümörler, lenf düğümleri, kemik iliği veya dolaşımdaki tümör hücreleri) bulunan, normal veya anormal bir sürecin ya da bir hastalığın işareti olan biyolojik moleküllerdir. Son yıllarda klinik onkolojide kanser biyomarkırlarının önemi giderek artmıştır. Germline ve somatik mutasyonlar, kromozomlardaki yapısal değişiklikler ve epigenetik değişiklikler; tümör biyomarkırların oluşumunu sağlar. Epigenetik çalışmalar; kanser riskinin değerlendirilmesinde, hastalığın tanısında ve prognozunda, tedavi yanıtının izlenmesinde kullanılan biyomarkır panellerinin gelişmesine neden olmuştur (Srivastava, 2017).

İdeal bir tümör biyomarkırında bulunması gereken özellikler aşağıda verilmiştir:

- ✓ Sadece bir tümör tipine özgül olmalı ve aynı tümör dokusuna sahip tüm hastalarda saptanabilir seviyede bulunmalıdır.
- ✓ Fizyolojik bir durumda ya da iyi huylu tümör olması durumunda saptanmamalıdır.
- ✓ İnvaziv olmayan veya kolayca erişilebilen vücut sıvılarında bulunmalıdır.
- ✓ Nicel olarak tümör hacmiyle ve özellikleriyle, hastalığın derecesiyle ilişkili düzeyde olmalıdır.
- ✓ Nispeten kısa yarılanma ömürlü olmalı ve tedavi yanıtını yansıtmalıdır.
- ✓ Standartlaştırılmış, tekrarlanabilir, onaylanmış, objektif ve niceliksel analizleri belirlenmiş olmalıdır (Velpula ve diğ., 2017).

NCCN "*National Comprehensive Cancer Network*" tümör biyomarkırlarını fonksiyonel görevlerine göre 4 gruba ayırmıştır. Bunlar; tanı, prognostik, prediktif ve tamamlayıcı biyomarkırlardır. Tanı biyomarkırları; kan, diğer vücut sıvıları, doku gibi örneklerin analiz edilerek hastalığın belirlenmesinde esas olarak yararlanılan biyomarkır tipidir. Prognostik biyomarkırlar hastalığın prognozunun değerlendirilmesinde yardımcı olur. Prediktif biyomarkırlar belirli bir tedavinin değerlendirilmesinde kullanılarak tedavi planlamasına yardımcı olurlar. Tamamlayıcı biyomarkırlar ise bir tedavinin başarılı olduğu hasta grubunu tanımlamak için kullanılır ve diğer tanı, prognostik veya prediktif sınıflarını da kapsayabilir. Dokuda bulunan tümör biyomarkıları patologlar tarafından kullanılırken; serolojik tümör biyomarkırları klinisyenler tarafından kullanılır (Velpula ve diğ., 2017).

Normal fizyolojik koşullarda da tümör biyomarkırları normalden daha yüksek veya daha düşük miktarda olabilir (Nagpal ve diğ., 2016). Ortalama değerler oluşturulmadan önce preanalitik ve analitik değişkenler standartlaştırılmalıdır. Bu nedenle, validasyon aşamasından sonra klinik denemeler yapılmalıdır. Klinik değerlendirmelerden sonra, analizlerin FDA *"Food and Drug Administration"* ve CLIA "*Clinical Laboratory Improvement Amendments"* tarafından onaylanması gerekmektedir. Tanımlanan ve kapsamlı olarak araştırılan tümör biyomarkırlarından sadece birkaçı rutin olarak klinik uygulamada kullanılmaktadır (Velpula ve diğ., 2017; Nagpal ve diğ., 2016; Srivastava, 2017). Kanserin tanısında, prognozunda, risk tespitinde, tedavi seçiminde ve yanıtında kullanılan biyomarkıların gelişim süreci Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



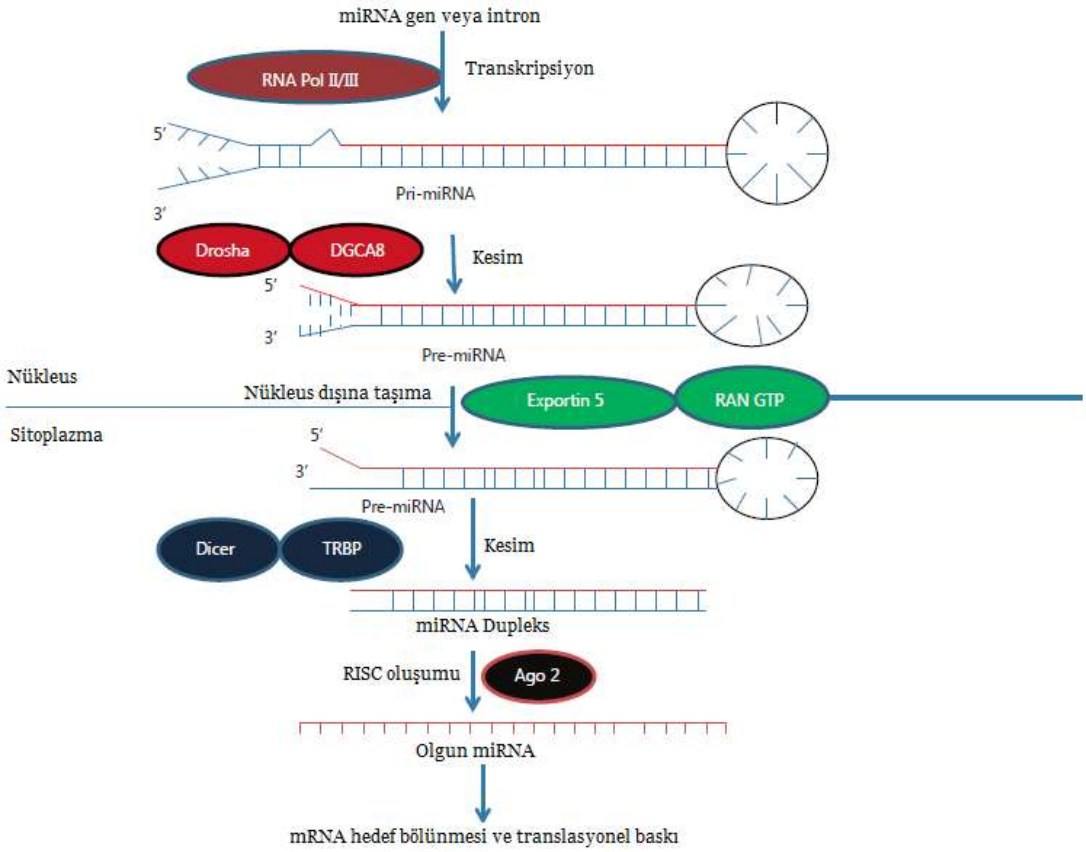
Şekil 2.6: Biyomarkırların gelişim süreci (Srivastava, 2017).

2.4. MİKRORNA (MİRNA)

RNA (Ribonükleik asit) molekülü, protein dizilerini kodlayan RNA'lar (mRNA) ve kodlanmayan RNA'lar (ncRNA) olarak iki grupta incelenir. MiRNA'lar, kendi nükleotid dizilerine tamamlayıcı hedef mRNA'nın 3'UTR *"Untranslated region"* bölgesine bağlanarak gen anlatımının düzenlenmesinde etkili olan kodlanmayan RNA molekülleridir (Srivastava, 2017).

2.4.1. MiRNA Biyogenezi

MiRNA'ların biyogenezi 3 basamaktan oluşur. Birinci basamakta, miRNA genlerinden primer miRNA'ların (pri-miRNA) transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci basamakta, pri-miRNA'ların nükleus içinde prekürsör miRNA'lara (pre-miRNA) dönüştürülür ve son basamakta sitoplazma içinde olgun miRNA'ların oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.7) (Gunel ve diğ., 2014).



Şekil 2.7: MiRNA biyogenezi (Pal ve diğ., 2015).

MiRNA'ların transkripsiyonu RNA polimeraz II tarafından yapılır. İlk molekül olarak nükleusta sentezlenen pri-miRNA olarak adlandırılır (Prahm ve diğ., 2016). Pri-miRNA yaklaşık 3-4 kilobaz boyutundadır ve 5' şapka yapısına, 3' poli (A) kuyruğuna sahiptir. RNAaz III ailesi üyesi enzim "Drosha", pri-miRNA'yı endonükleaz aktivitesiyle keserek öncül miRNA (pre-miRNA)'ya dönüştürür (Romero-Cordoba ve diğ., 2014). Kesim işlemini gerçekleştiren mikroişlemci kompleksi; "Drosha" ve "Drosha"nın C-terminal bölgesi ile etkileşerek stabilize eden çift zincirli RNA bağlayıcı protein DGCR8'den "*DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Protein*" oluşur. "Drosha", pri-miRNA üzerinde katalitik birim olarak iş görürken; DGCR8 ise RNA molekülünü tanır. 60-70 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA'lar, "Exportin 5" (*Exp-5*) ve RAN-GTPaz "*Ras-related nuclear protein*" proteinleri ile sitoplazmaya taşınır (Romero-Cordoba ve diğ., 2014). Sitoplazmada saç tokası şeklindeki pre-miRNA'lar bir diğer RNaz III enzimi olan "Dicer" tarafından tekrar kesilir. 22 nükleotid uzunluğunda kısa, çift iplikli, olgun miRNA oluşur. Bu işlem sırasında "Dicer", TRBP "*Human Immunodeficiency Virus Transactivating Response RNA Binding Protein*" proteinine bağlanarak stabilitesini ve aktivitesini arttırır. Çift iplikli pre-miRNA oluşumundan sonra, bir helikazla yaklaşık 20

nükleotidlik olgun tek zincirli miRNA'lara dönüşür. Çift zincirden biri kılavuz zincir diğeri ise yolcu (komplementer) zincir olarak adlandırılır. Kılavuz zincir, çift iplikli RNA'ya bağlanan proteinlerin yardımıyla ATP'ye bağımlı şekilde RISC kompleksine "*RNA-Induced Silencing Complex*" bağlanır. RISC ise "Dicer", TRBP, Argonaute 2 proteini (Ago2) ve GW182 proteininden oluşur. GW182, Argonat kararlılığını düzenleyen GW protein ailesinin üyesidir. Ago2 proteinleri ise, endonükleaz aktivitesi ile hedef mRNA 3'UTR ucunda RISC kompleksinin stabil olmasını sağlayarak hedef mRNA'nın degradasyonundan sorumlu olan katalitik enzimlerdir. Kılavuz zincir ile RISC'in birleşmesiyle oluşan yapıya miRNA aracılığıyla susturucu kompleks "miRISC" denir. Komplementer zincir bu yapıya katılmaz ve genellikle parçalanır. Ancak, güncel çalışmalar çoğu komplementer zincirin parçalanmadığını ve kılavuz zincir ile benzer oranda anlatım yaptığını göstermiştir. Bu veriler, tamamlayıcı zincirin de RISC kompleksine katılabileceğini göstermektedir. MRNA hedeflerini tanıma kılavuzu olarak işlev gören "miRISC", mRNA'ları negatif olarak düzenler (Pfaff ve Meister, 2013; Romero-Cordoba ve diğ., 2014; Gunel ve diğ., 2014).

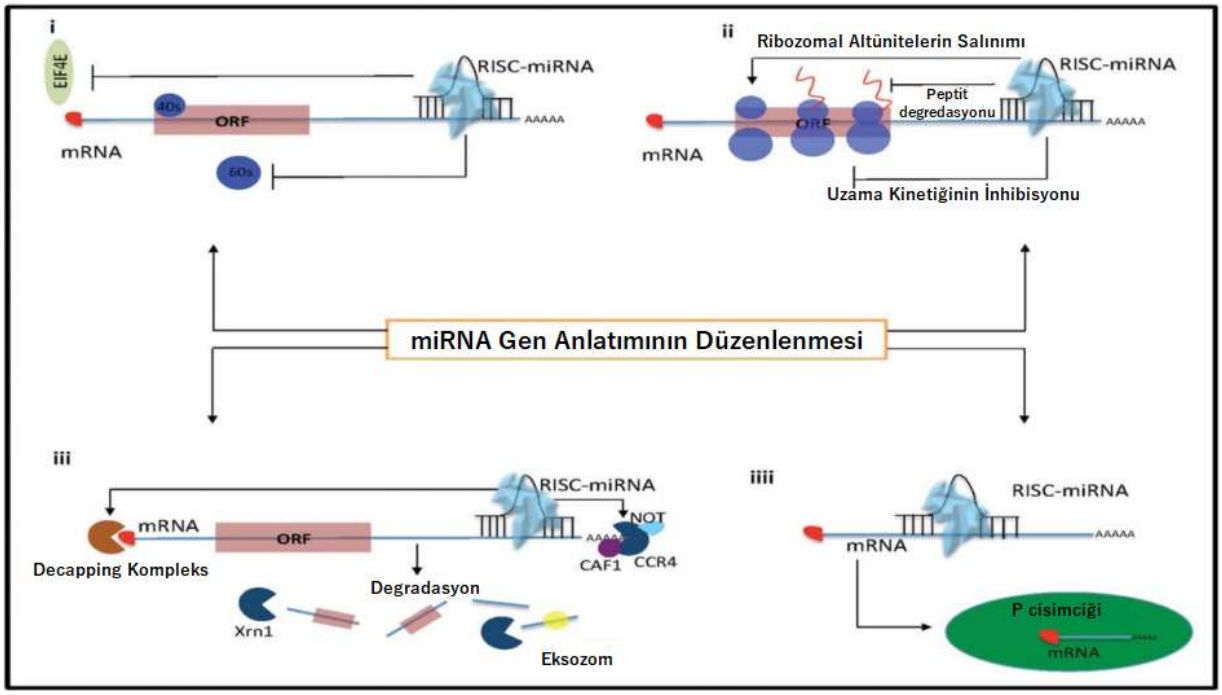
2.4.2. MiRNA'ların Fonksiyonu ve Regülasyonu

MiRNA'lar genel olarak; hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu, hücre ölümü, immün yanıt, insülin sekresyonu, nörotransmitter madde sentezi, sirkadiyen ritim ve viral replikasyon gibi önemli biyolojik süreçte rol oynamaktadır. Ayrıca, miRNA'lar onkogenik veya tümör baskılayıcı yolakları etkiliyebilirken, onkogenler veya tümör baskılayıcılar tarafından da düzenlenebilir (Gong ve diğ., 2016; Dong ve diğ., 2013).

MiRNA'lar fonksiyonlarını nükleotid dizilerine komplementer olan hedef genleri tanıma özelliği sayesinde gerçekleştirir. "MiRISC" kompleksi hedef mRNA'ların 3'UTR ya da ORF *"Open Reading Frame"* bölgesine bağlanır. Bu bağlanma sonucu hedef mRNA'nın protein translasyonu durur ya da mRNA yıkıma gider. 3'UTR bölgesine tam olarak bağlanamazsa, translasyon baskılanır. ORF bölgesine bağlanma tam komplementerlik gösterir ve Ago2 tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır. Hedef mRNA'nın tespiti miRNA'ların 5' ucunda 2-7 nükletotid uzunluğunda çekirdek dizi tarafından gerçekleşir (Vidigal ve Ventura, 2015).

"MiRISCs" aracılığıyla gen ifadesinin baskılanmasında farklı mekanizmalar vardır (Şekil 2.6). İlk olarak, ökaryotik hücrelerde şapka tanımada görevli *"Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E"* e (elF4F) etki göstererek ribozomun 40s ve 60s alt birimlerinin bir araya gelmesini

önler. Diğer bir yol olarak, "miRISCs" kompleksi, translasyonun uzama aşamasında ribozom kompleksinin alt birimlerinin, bağlı bulunduğu mRNA'dan ayrılmasına neden olarak translasyonu inhibe eder. Farklı bir yol olarak, "miRISCs" kompleksinin hedef mRNA'ya bağlanması mRNA'nın enzimler tarafından deadenilasyonuna, şapka kaybının *"decapping"* gerçekleşmesine ve böylece yıkımına neden olur. Son olarak, p cisimcikleri hücrede bir anahtar organel olarak hedef mRNA, Ago2, DCP1 *"mRNA-decapping enzim"*, PABP *"Poly(A)-binding protein"* depolanmalarında ve yıkımlarında rol oynar. "MiRISCs"e bağlanan bazı hedef mRNA'lar depolanmak üzere p cisimciğine gönderilir ve stres koşulları altında yeniden translasyonları gerçekleşebilir (Li ve Rana, 2014).



Şekil 2.6: "MiRISCs"in gen ifadesini baskılama mekanizmaları (Romero-Cordoba ve ark., 2014).[4]

MiRNA'lar bazı durumlarda hedef mRNA'ların anlatımlarının artmasına neden olabilir. Çalışmalarda Ago2'ye bağlı olgun miRNA'lar, FXR1-iso-a *"Fragile X mental retardation related protein, 1"* proteini ile birlikte hedef mRNA'daki A-U'ca zengin olduğu bölgelere bağlanarak hedef mRNA'nın anlatımını arttırır (Vasudevan ve diğ., 2007).

[4] i) Translasyon baskılanması ile düzenlenme. ii) Ribozom alt ünitelerinin salınımı ile düzenleme. iii) mRNA degredasyonu ile düzenleme iv) P cisimciği ile mRNA hedeflerinin bozulması veya p cisimciğinde depolanması ile düzenleme.

2.4.3. MiRNA ve Hedef mRNA İlişkisini Belirlemeye Yönelik Geliştirilen *"In Silico"* Yöntemler

MiRNA ve hedef mRNA etkileşimi biyoinformatik analizler sayesinde tanımlanabilir. Bu analizlerden sonra deneysel olarak doğrulanır. MiRNA ve hedef mRNA ilişkisinin belirlemesinde kullanılan parametreler çoğu veri tabanında benzerdir (Dweep ve diğ., 2013). Hedef belirlemede bu algoritmalar tarafından kullanılan parametreler; miRNA dizileri, mRNA'nın 3'UTR'si, çekirdek bölgesi, serbest ve erişilebilir enerji, miRNA 3' bölgesi, korunma durumu, diğer hedef bölgelerdir (Riffo-Campos ve diğ., 2016).

2.4.3.1. MiRNA Dizileri

MiRNA-hedef mRNA etkileşimlerinin belirlenmesinde kullanılan tüm algoritmalar, miRNA dizilerinden oluşan bir veri grubu bulundurur. Veri grubuna ne kadar çok dizi eklenirse, miRNA-hedef mRNA belirlenmesi de o kadar güçlü olur. Bununla birlikte, bu veri tabanlarında bildirilen bazı diziler deneysel olarak doğrulanmamıştır. Bu bağlamda, *"Tarbase"* veri tabanında olduğu gibi, sadece doğrulanmış miRNA'lar hakkında bilgi içeren birkaç veri tabanı bulunmaktadır (Riffo-Campos ve diğ., 2016).

2.4.3.2. MRNA'nın 3'UTR'si

MiRNA'lar, hedef mRNA'larının 3'UTR bölgesinde bulunan MRE "*miRNA Response Elements*" ile baz eşleşmesi yapar. Çoğu algoritma, bir hedef bölgeyi aramak için 3'UTR veri kümesini kullanır. Birçok çalışma, miRNA'larda en sık hedeflenebilir bölgenin 3'UTR bölgesi olduğunu göstermiştir. Bir mRNA dizisi, (örneğin, 3'UTR'nin başlangıcı ve bitişi) *"Ensembl"*, Referans mRNA dizileri (RefSeq) veya *"UCSC Genome"* veri tabanından elde edilebilir (Riffo-Campos ve diğ., 2016).

2.4.3.3. Çekirdek Bölgesi

Çekirdek bölgesi miRNA'nın 5' ucundaki 2-7 veya 2-8 pozisyonunda bulunan ve miRNA'nın hedefini belirleyen 6-8 nükleotidlik dizidir. Bir miRNA'nın çekirdek bölgesi, miRNA aileleri arasında ve türler içinde oldukça korunmuş bir bölgedir. Bu nedenle "*TargetScan", "PicTar", "PITA", "RNAhybrid", "miRU"* gibi birçok veri tabanı, miRNA-hedef mRNA belirlenmesinde çekirdek bölgeyi inceler (Riffo-Campos ve diğ., 2016).

2.4.3.4. Serbest ve Erişilebilir Enerji

Biyolojik reaksiyonların tümü termodinamik ilkelere göre gerçekleşir. Bu nedenle, minimum serbest enerjinin ölçümü, miRNA ve hedef mRNA arasındaki bağlantının ne kadar güçlü olduğunu değerlendirmeyi mümkün kılar. Serbest enerji ne kadar düşükse, RNA-RNA bağlaması da o kadar büyük olur. Serbest enerji negatif gerçek değerle ifade edilir ve birim kcal/mol'dir (Riffo-Campos ve diğ., 2016).

2.4.3.5. MiRNA 3' Bölgesi

MiRNA 3' bölgesi, 3' ucundaki 13-16 nükleotid pozisyonundaki bölgedir ve genin negatif düzenlenmesinde etkili olabilir. Bu parametre *"TargetScan"* ve *"Miranda"* veri tabanında bulunur (Riffo-Campos ve diğ., 2016).

2.4.3.6. Korunma Durumu

Farklı türler arasında ortak bir miRNA bağlanma yeri bulunduğunda, bu alan korunmuş kabul edilir. Korunan bir dizi, miRNA dizisi içindeki herhangi bir bölgede olabilir. En çok korunmuş iki bölge; çekirdek bölgesi ve miRNA'nın 3' bölgesidir. Korunma durumu önemli bir parametredir ve filogenetik, evrimsel yakınlık hesaplamaları kullanılarak yapılır. *"TargetScan", "miRanda", "DIANA-microT", "PicTar"* ve *"PITA"* veri tabanı dahil olmak üzere miRNA ve hedef mRNA belirlenmesinde kullanılan birçok algoritmaya dahil edilmiştir (Riffo-Campos ve diğ., 2016).

2.4.3.7. Diğer Hedef Bölgeler

3'UTR'deki dışında diğer mRNA bölgeleri, miRNA için diğer hedef bölgeler olarak tanımlanmıştır. Bu bölgeler mRNA'lar için 5'UTR, ORF ve kodlama dizisi (CDS)' dir. *"MiRTar", "DIANA microT", "RNA22", "TargetS"* veri tabanları bu üç bölgeyi analiz eder (Riffo-Campos ve diğ., 2016).

En sık kullanılan veri tabanları; *"TargetScan", "miRanda"* ve *"DIANA microT"*dir (Riffo-Campos ve diğ., 2016). MiRNA hedeflerini belirlemek için geliştirilen ilk veri tabanı *"TargetScan"*dir. Riffo-Campos ve diğ. (2016) yaptıkları bir çalışmada, *"TargetScan"*in miRNA – mRNA etkileşimini belirlemede en iyi veri tabanı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, eşleşme doğruluğunu arttırmak için yeni sürümler ve ek parametreler eklenmiştir. Bu veri tabanında bir miRNA incelendiğinde, belirli parametrelere göre hedef genler sıralanır. Hedef sıralaması bağlam++ skoruna "*context++ score*" göre yapılır. Skor ne kadar negatif olursa,

hedefleme oranı da o kadar büyük olur. Bağlam++ skoru, mRNA – miRNA'nın 4 farklı bağlanma bölgesindeki (8mer, 7mer, 7mer-A1, 6mer) farklı parametreler değerlendirilerek elde edilen ortalama değerdir. Bu 4 farklı bağlanma bölgeleri; çekirdek bölgesindeki eşleşme alanlarıdır. Çekirdek bölgesi, miRNA'nın 5' ucundaki 2-7 veya 2-8 pozisyonunda bulunan ve miRNA'nın hedefini belirleyen 6-8 nükleotidlik dizidir. Bu bölgeler etkinliğine göre 8mer>7mer>7mer-A1>6mer şeklinde sıralanır. Hedef analizleri sırasında, seçilen çekirdek bölgesinin değiştirilmesi miRNA hedef sayısını da değiştirir (Riffo-Campos ve diğ., 2016). Bu tez kapsamında *"TargetScan"* ve *"Pathway Studio"* veri tabanları ile aday miRNA'ların hedef mRNA'ları belirlenmiştir.

2.5. OVER KANSERİNDE KULLANILAN BİYOMARKIRLAR

Günümüzde over kanserinin erken tanısı için yapılan çalışmalar, hassas ve güvenilir biyomarkırların belirlenmesine yöneliktir (Rauh-Hain ve diğ., 2011). FDA tarafından onaylanan biyomarkırlar; hastalığın tanısında, prognozunda ve tedavi yanıtının belirlenmesinde kullanılır (Lee ve diğ., 2013). FDA, 2009 yılında over kanseri için uygulanabilecek ilk serum biyomarkır analiz testini (OVA1) açıklamıştır. Beş yıl boyunca yapılan klinik testlerden sonra, OVA1 multivaryant analizlere "*Multiple Index Approach"* (MIA) dayanan bir indeks testi haline gelmiştir. OVA1 tanı testinde; CA-125, enflamatuvar ve transport proteinlerinin (transferrin, ß-2 mikroglobülin, apolipoprotein A-1 ve transtiretin) analizleri yapılmaktadır. 2010 yılında CA-125 ile birlikte HE-4'ü *"Human Epididimis protein 4"* analiz eden ROMA *"Risk of Ovarian Malignancy Algorithm"* testi FDA tarafından onaylanmıştır. 2016 yılında FDA, temel iki MIA testini birleştirmiştir ve tanı hassasiyetini arttıran yeni OVERA testini yayınlamıştır. Bu testte analizi yapılan biyomarkırlar; CA125-II, HE-4, apolipoprotein A-1, folikül uyarıcı hormon ve transferrindir. Over kanserinin erken tanısı için; özgünlüğü ve hassasiyet oranı daha yüksek, serum biyomarkır çalışmaları devam etmektedir. Yapılan analizler; serbest DNA, mRNA, miRNA'lar ve dolaşımdaki tümör DNA'larını (ctDNA) içeren yeni bir serum biyomarkır grubu, over kanseri tanı kitlerinin temelini oluşturacağını göstermiştir (Ueland, 2017). Over kanseri tanısında protein, metabolit ve gen temelli biyomarkırlar kullanılabilir (Zhang ve diğ., 2011).

2.5.1. Protein Temelli Over Kanseri Biyomarkırları

Over kanseri prognozunun zayıf olması ve başarılı bir tedavinin olmaması, proteomik analizleri kullanarak moleküler profilleme uygulamalarına son yıllarda ilgi uyanmıştır. Proteomik teknikler over kanseri için tümör sınıflandırmasında, tümör dokusunda, vücut sıvılarında biyomarkır taranmasında ve kemoterapi direncin araştırılmasında kullanılır (Elzek ve Rodland, 2015). Proteomik teknolojinin amacı; tek, spesifik ve alternatif bir biyomarkır tanımlanması ve geliştirilmesidir.

CA-125 antijeni, over kanserlerinin %85-90'ını oluşturan EOK'un erken tanısında kullanılan tümör biyomarkırıdır (Nguyen ve diğ., 2013). *muc16 "mucin 16"* geni tarafından kodlanan bir transmembran glikoproteindir. İleri evredeki over kanseri hastalarının %80'inden fazlasında, erken evredeki over kanserlerinde ise %50'sinde CA-125 anlatımının yükseldiği tespit edilmiştir (American Cancer Society, 2017). Over kanserinin erken teşhisinde kullanılmasına rağmen, CA-125 hem normal fizyolojik koşullarda hem de kanser gelişiminde anlatımı artabilir. Ayrıca ırk, yaş, sigara öyküsü, obezite ve histerektomi gibi bazı faktörlerin CA-125 düzeylerini değiştirebileceği bulunmuştur. İyi ve kötü huylu tümörlerin ayrımını da yapamaz. Bu yüzden CA-125'in özgüllüğü ve duyarlılığı zayıftır (El Bairi ve diğ., 2017; Rauh-Hain ve diğ., 2011). CA-125, EOK tanısı alan hastalarda hastalığın izlenmesi için FDA tarafından onaylanmıştır (El Bairi ve diğ., 2017). Bugüne kadar bir glikoprotein olan HE-4 "*Human Epididymis Secretory Protein 4*", mezotelin, osteoponin, prostasin, makrofaj koloni uyarıcı faktör, EGF *"Epidermal Growth Factor"* reseptörü, lizofosfatidik asit gibi tek başına veya CA-125 ile birlikte incelenen 30'dan fazla biyomarkır mevcuttur (Elzek ve Rodland, 2015). Gelecekte yeni proteomik tabanlı biyomarkırlar ile biyoinformatik ilerlemeler over kanseri hastalarının erken teşhisine katkıda bulunacak ve tedavilerinin optimizasyonu sağlanacaktır (El Bairi ve diğ., 2017).

2.5.2. Metabolit Temelli Over Kanseri Biyomarkırları

Metabolomik teknoloji birçok kanser türünde etkili ve invaziv olmayan bir tanı yöntemidir. Bazı metabolitler, birçok kanser türünde biyomarkır olarak kullanılır (Fan ve diğ., 2012). Hücrede, dokuda veya biyolojik sıvı materyallerinde metabolitlerin tespiti, NMR "*Nuclear Magnetic Resonance*" veya MS "*Mass Spectrometry"* yöntemleri ile yapılır (Zhang ve diğ., 2011). Değişen hücresel sinyallerinin ve metabolik yolakların yanı sıra proteinlerin, karbonhidratların ve lipidlerin sekonder modifikasyonlarının da kanser gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Enerji ihtiyacı olan kanser hücreleri oksidatif fosforilasyon yerine

glikolize geçebilir, oksijensiz solunum ile ATP üretimi yapılarak sonuçta laktik asit üretirler (Warburg etkisi). Kanser hücrelerinin bu yolağı tercih etmesi ile glikoz yıkımı artar dolayısıyla glikoz taşıyıcılarının (GLUT 1-9) miktarının da artması sonucu glikoz alımı fazlalaşır. Over kanserinin aminoaçil-tRNA, fenilalanin, tirozin ve triptofanın sentez yolaklarıyla, üre döngüsü ve glisin, serin, treonin, glutamat ve amino gruplarının metabolizması ile ilişkili olduğu bulunmuştur (El Bairi ve diğ., 2017).

2.5.3. Gen Temelli Over Kanseri Biyomarkırları

İnsan genomunun dizilenmesi kanser teşhisinde ve doğru kanser tedavisinin seçilmesinde gelişme sağlamıştır. Genetik mutasyonlar ile over tümörogenezi arasındaki ilişki gen temelli yeni biyomarkırların tespitine hız kazandırmıştır. Gen temelli over kanseri biyomarkırları 4 sınıfa ayrılır: Kalıtsal gen mutasyonları, epigenetik değişiklikler, gen anlatımı ve tüm genom dizilemedir (Lee ve diğ., 2013)

2.5.3.1. Gen Anlatımı

DNA-mikrodizilim teknolojisi, bir tümör dokusunda binlerce genin anlatımının aynı anda analiz edilmesini sağlar. Bu teknoloji, normal ve kanser durumundaki gen anlatımının karşılaştırabilmesi ve kanser gelişiminde farklı şekilde düzenlenen genleri tanımlamayı mümkün hale getirmiştir. Normal over dokusunu, over tümörlerinden ayırt etmek için uygulanan gen anlatım analizi, yeni biyomarkırları tespit edebilir. Bu tür çalışmaların amacı, over kanserinde farklı şekilde anlatımı artan geni tanımlamak ve bu genlerin serumda tespit edilebilen proteinleri kodlayıp kodlamadığını belirlemektir. Erken teşhis için bir biyomarkır tespiti dışında gen anlatımının profillemesi over kanserinin; prognozunda, kemoterapi yanıtının belirlenmesinde, kemorezistans mekanizmalarında, farklı histolojik ve genetik alt tiplerin karakterize edilmesinde çeşitli bilgiler sağlayabilir (Lee ve diğ., 2013; Zhang ve diğ., 2011) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Over kanseri için gen anlatım temelli biyomarkırlar (Lee ve diğ., 2013).

MARKIR TİPİ	YÖNTEM	MARKIRLAR
Gen anlatımı	Mikrodizilim	CA-125, *osteopontin, kallikrein-10, secretory* lökoprosteaz inhibitörü, *mmp7, fol3*, survivin, *mcm3, e2fs, vtcn1, syne1, akap14, kndc1, dlec1*
		Over kanseri prognostik profilleme (115 gen)

2.5.3.2. Kalıtsal Gen Mutasyonları

EOK vakalarının %10'u kalıtsal kökenlidir. *brca1* ve *brca2* genlerindeki mutasyonlar, kalıtsal kökenli kanser oluşumunun yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Diğer %10'luk kısmı ise HNPCC'den kaynaklı olduğu kabul edilmektedir. Ailesinde over kanseri geçmişi bulunan hastalar; "*site specific"* over kanseri, meme ve over kanseri sendromu, HNPCC *"Lynch II sendromu"* olmak üzere 3 ana gruba ayrılmıştır.

İlk 2 grup *brca1* ve *brca2* genindeki germline mutasyonları ile ilişkilidir. HNPCC sendromu, DNA yanlış eşleşme onarım genlerinin, esas olarak *hmlh1* ve *hmsh2*'nin germline mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Bugüne kadar, *brca1, brca2, rad51c, rad51d, brıp1, bard1, chek2, mpe11a, nbn, palb2, rad50, mlh1, msh2, msh6, pms2, tp53* dahil en az 16 gen kalıtsal over kanseri ile ilişkili bulunmuştur. Kalıtsal mutasyona sahip olan kadınların %30'unda meme kanseri veya over kanseriyle ilgili aile geçmişi bulunmamaktadır (Lee ve diğ., 2013; Zhang ve diğ., 2011).

2.5.3.3. Tüm Genom Dizileme

Tüm genom dizileme, kanser genetiğinin kapsamlı bir şekilde tanımlanmasını sağlar. Bu da erken tanı oranlarının artmasını ve tedavinin doğru seçimini sağlar. Kromozomal düzenlenmelerin tespiti tüm genom dizileme ile mümkündür. Ayrıca promotörler, *"enhancerlar"*, intronlar ve kodlanmayan *"non-coding"* RNA'lar (ncRNA) gibi kodlamayan bölgelerin somatik mutasyonları gözlemlenebilir. Tüm genom dizileme, biyomarkır tespitinin yanı sıra, kanserin heterojenitesiyle ilgili bilgi de verir. Ayrıca farklı morfolojik tipler, transkripsiyonel ve yapısal değişiklikler de tüm genom dizileme ile kategorize edilebilir. Tüm genom dizilemenin başlıca zorluğu genomik verilerin hesaplanması, biyolojik ve klinik analizleridir. Bu analizler tekrarlanabilir olmalı ve istatistiksel olarak değerlendirilmelidir. Biyolojik analizler, mutasyona uğramış genlerin kansere fonksiyonel olarak uygunluğu değerlendirilmelidir. Klinik analizler ise, kanserin insidansı, histolojisi, prognozu ve terapötik etkisini değerlendirebilmelidir. Dizileme teknolojilerindeki gelişmelerle, kanser teşhisi için kullanılan yeni biyomarkırların tespiti mümkün olacaktır (Lee ve diğ., 2013) (Tablo 2.4).

Tablo 2.4: NGS tekniği ile tespit edilen over kanseri biyomarkırları (Lee ve diğ., 2013).

MARKIR TİPİ	YÖNTEM	MARKIRLAR
Tüm genom veya ekzom dizileme	Yeni Nesil Dizileme	*tp53* delesyonu
		brıp1'deki çerçeve kayması mutasyonu
		tp53, brca1, brca2, nf1, rb1, fat3, csmd3, gabra6, cdk12

2.5.3.4. Epigenetik Değişiklikler

Epigenetik değişiklikler, DNA dizisinin kendisini etkilemeyen kromatin değişiklikleri olarak tanımlanır. Bu değişiklikler DNA metilasyonu, histon metilasyonu, asetilasyonu veya fosforilasyonudur (El Bairi ve diğ., 2017). DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalar, gen anlatımının düzenleyicileri olarak tümör başlangıcında ve ilerlemesinde önemli rol oynar. Anormal DNA metilasyonu, kanser gelişiminin erken evrelerinde ortaya çıktığı için kolaylıkla tespit edilebilir. Bu yüzden, metilasyon durumunun tespiti over kanseri erken tanısına olanak sağlar. Over kanserinden *brca1, rassf1a, apc, p14arf, p16ınk4a, dapkinaz, armch1, ıcam4, loc134466, peg3, pycard, sgne1* genlerinin hipermetilasyona uğradığı bilinmektedir. Özetle, epigenetik değişiklikler erken tanı için kullanılan ve invaziv olmayan testlerin gelişmesini sağlamıştır (Lee ve diğ., 2013).

MiRNA genlerinin yaklaşık yarısı CpG adacıklarıyla ilişkilidir ve bu nedenle anlatımları metilasyon mekanizması aracılığıyla düzenlenir MiRNA'ların keşfi ve jinekolojik kanserlerin patolojisindeki rolü hakkındaki son bilgiler, miRNA analizlerinin rutin olarak klinikte uygulanma potansiyelini arttırmıştır. (Srivastava ve diğ., 2017). Günümüzde over kanseri ile ilgili çalışmalar; miRNA anlatım profillerinin oluşturulması ve periferik kan kökenli miRNA'ların dolaşımdaki yeni biyomarkırlar olarak tanımlanmasına odaklanmıştır (Nguyen ve diğ., 2013). MiRNA'ların anlatımı kanserli hücrelerde düzensizleşir. Anlatımı düzensiz miRNAlar, hücredeki fonksiyonuna bağlı olarak onkogen (miR-155, miR-21, miR-221, miR-222, miR-106b-93-25 kümesi, miR-17-92 kümesi) veya tümör baskılayıcısı (miR-15, miR-15, miR-16, let-7, miR-34, miR-29, miR-122, miR-125a-5p ve miR- 1343-3p) olarak işlev görebilir. RNA bağlayıcı proteinlerdeki ve hücresel sinyal yolaklarındaki değişiklikler de miRNA anlatımını değiştirerek kanserleşmeye yol açar. Ayrıca kanser oluşumunda, miRNA biyogenezindeki görev alan genlerin mutasyonları da etkili olabilir (Rapisuwon ve diğ., 2016). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda over kanseri hastalarının serum, plazma ve tüm kan gibi vücut sıvıları içinde saptanan anlatımı anlamlı şekilde değişkenlik gösteren miRNA'lar Tablo 2.5'te gösterilmiştir (Nakamura ve diğ., 2016).

Tablo 2.5: EOK tanısı için miRNA temelli potansiyel biyomarkılar (Srivastava ve diğ., 2017).

REFERANS	ANLATIMI ARTMIŞ MİRNA'LAR	ANLATIMI AZALMIŞ MİRNA'LAR	KAYNAK
Taylor D.D, 2008	miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205, miR-214		Serum (Eksozom)
Resnick K.E, 2009	miR-21, miR-92, miR-93, miR-126, miR-29a	miR-155, miR-127, miR-99b	Serum
Hausler S.F, 2010	miR-30c-1	miR-342-3p, miR-181a, miR-450-5p	Tüm kan
Kan C.W, 2012	miR-182, miR-200a, miR-200b, miR-200c		Serum
Chung Y.W, 2013		miR-132, miR-26a, let7-b, miR-145	Serum
Guo F, 2013	miR-92		Serum
Suryawanshi S, 2013	miR-16, miR-21, miR-191 (EAOC[5]) miR-16, miR-191, miR-4284 (SOC[6])		Plazma
Xu Y.Z, 2013	miR-21		Serum
Zheng H, 2013	miR-205	let-7f	Plazma
Guo F, 2013	miR-92		Serum
Hong F, 2013	miR-221		Serum
Ayaz L, 2014	miR-(191-5p, 206, 548a-3p, 320a, 574-3p, 590-5p, 34c-5p, 106b-5p)	miR-(19a-3p, 30a-5p, 645, 150-5p)	Plazma
Shapira I, 2014	miR-1274a, miR-625-3p, miR-720	miR-106b, miR-126, miR-150, miR-17, miR-20a, miR-92a	Serum
Zhou J, 2015	miR-30-5p		Serum
Gao Y, 2015	miR-141, miR-200c		Serum
Liang H, 2015		miR-145	Serum/Plazma
Langhe R, 2015		let-7i-5p, miR-122, miR-152, miR-25-3p	Serum
Zuberi M, 2015	miR-200a, miR-200b, miR-200c		Plazma
Langhe R, 2015	miR-200b		Serum
Sun X.C, 2016	miR-146a		Periferik kan
Zhu T, 2016	miR-125b		Serum
Fukagawa S, 2017	miR-135a-3p		Serum
Srivastava S.K, 2017	miR- (16, 17, 20a, 21, 23a, 23b, 27a, 29a, 30a, 92a, 93, 106b, 126, 141, 144, 150, 182, 196a, 196b, 199a, 200a, -200b, -200c,miR- 375, 486, 449a, 499-5p, 3613)	miR- (1, 99b, 127, 130b, 133a, 148a, 148b, 155, 375, 451)	Doku&Serum

[5]Endometriozis ile bağlantılı over karsinoması
[6] Seröz over karsinoması

2.6. OVER KANSERİ TANISINDA KULLANILAN MİRNA ANLATIM ANALİZİ TEKNOLOJİLERİ

Günümüzde yapılan çalışmalar, miRNA anlatım profillerin oluşturulması için kullanılacak tekniklerin hızla gelişmesine yol açmıştır. MiRNA tespit ve analiz yöntemlerinin çoğunluğu mRNA anlatım analizi ve DNA kopya sayısını değerlendiren dizilim temelli karşılaştırmalı genomik melezleme (aCGH) yöntemlerinden oluşmaktadır (Tam ve diğ., 2014).

MiRNA'lara özgü bazı özellikler nicel ve nitel analizlerin verimini azaltabilmektedir. Bunlar; mRNA'larda bulunan, bağlanmayı kolaylaştıran poliA kuyruğunun bulunmaması, kısa nükleotid dizilimlerinden dolayı primerlere bağlanmada yetersiz kalması, aile üyeleri arasındaki benzerlikleri, olgun ve birincil formlar arasındaki farklılıkları ve miRNA keşfinin yetersiz olmasıdır. Tüm bu zorluklara rağmen miRNA analizi için kullanılan yöntemler başarılı şekilde uygulanmaktadır. Dolaşımdaki RNA verilerini güvenilir elde edebilmek için sağlam metodolojik standardizasyon uygulanmalıdır (Rapisuwon ve diğ., 2016).

MiRNA'ların anlatım seviyelerini ölçmek için üç temel yöntem kullanılır; gerçek zamanlı PCR (Real-time PCR, qPCR), mikrodizilim ve yeni nesil dizileme (NGS) (Git ve diğ., 2010). Mikrodizilim tek bir aşamayla binlerce genin aynı anda kapsamlı bir şekilde profillenmesi için kullanılır. MiRNA mikrodizilim teknolojisi normal ve tümör örnekleri arasındaki miRNA anlatım farklarını tespit etmek için çok güçlü bir tekniktir. qPCR ile birlikte, miRNA'ların anlatımını değerlendirmek için en yaygın kullanılan tekniktir (Tam ve diğ., 2014). Son zamanlarda mikrodizilim ve qPCR teknikleri ile farklı kanser tiplerinde miRNA anlatım profilleri analiz edilmiştir (Zhang ve diğ., 2011). NGS, eşzamanlı olarak yeni miRNA'ların keşfedilmesini ve bilinen miRNA'ların analiz edilmesini sağlar. Yeni nesil dizileme cihazlarındaki veri üretme kapasitesi, RNA kütüphanesi hazırlama metotlarındaki gelişmelerle birleştirilmiştir. Araştırmacılar daha çok veri elde etmek için RNA kütüphanelerini indekslemede ve çoğaltmada bu tekniklerden faydalanırlar (Fan, 2012).

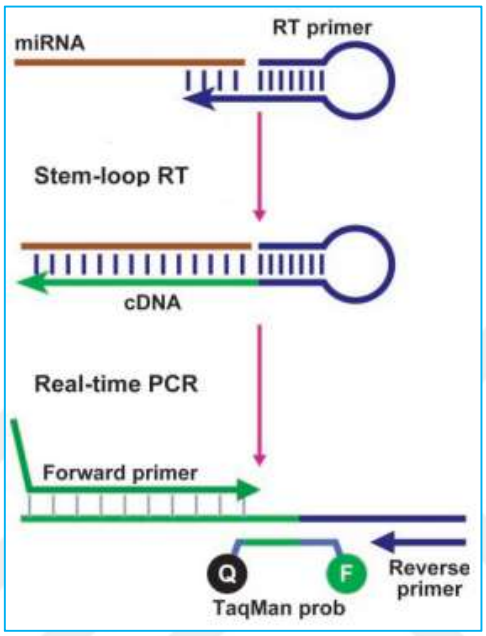
RNA kantitasyonu için en uygun yöntem qPCR'dir. qPCR, DNA çoğalımı ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile sayısal sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA düzeyini sayısal olarak belirleyebilme kısa sürede gerçekleşmektedir. Aynı zamanda düşük kontaminasyon riskiyle, yüksek verimlilikte ve hassasiyette sonuç vermektedir (Günel

ve diğ., 2012; Gunel, 2007). *"TaqMan MicroRNA Reverse Transcription"* yöntemi, olgun miRNA'ların cDNA'ya dönüştürmede günümüzde en etkili ve spesifik tekniktir. Bu teknikte, hedef miRNA'ya özgü problar *"stem-loop primer"* ile izole edilmiş total RNA'lardan hedef miRNA, cDNA'ya dönüştürülerek qPCR'da kantitatif ölçümü yapılır. qPCR aşamasında kantitatif ölçüm için iki farklı yöntem kullanılır. Birincisi spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında *"SYBR Green I"* yöntemidir. *"SYBR Green I"* yönteminde kullanılan floresans boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak cihazda okunan floresansın miktarı da eş zamanlı olarak artar. İkincisi özgül belirleme sistemidir; DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresans işaretli problar kullanılır. Bu tekniklerin başında *"TaqMan"* prob, *"Molecular beacon"*, *"Light-up"* prob, hibridizasyon prob ve *"Scorpion"* primer gibi floresans işaretli problar gelmektedir (Gunel, 2007).

"TaqMan" prob yöntemi "*Double-Dye Oligonucleotide",* "*Dual labeled probe*" veya "*5' Nuclease pro"* olarak da adlandırılır. *"TaqMan"* prob temelli PCR yönteminde çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda *"fluorophore"* (6-karboksifloresin=6-FAM) ve 3' ucunda *"quencher"* (6-karboksi tetrametil- rodamin= TAMRA) bulunur. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası, 5' uçtaki FAM boyasının sinyal olusturmasını engellemektedir. Probun hedef DNA'ya bağlanma durumunda da floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primer bağlanma bölgeleri arasına *"TaqMan"* problar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir olusmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder ve her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder. TaqMan prob yönteminde mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerlere de ulaşılabildiğinden araştırıcılar için avantaj sağlar. Bu yöntem standart bir protokolü, kolay bir dizaynı ve çok az bir optimizasyonla gerçekleştiği için anlatım profillerinin analizleri oldukça kolaydır (Gunel, 2007).

"TaqMan" prob temelli PCR yönteminde, gen spesifik *"stem-loop"* primerler kullanılarak hem prekürsör hem de olgun miRNA'ların ters transkripsiyonu gerçekleşir. *"TaqMan"* temelli yöntemde miRNA'ların analizi iki aşamadan oluşur: Stem-loop RT ve Gerçek Zamanlı PCR (Şekil 2.7). Stem-loop RT primerleri, miRNA moleküllerinin 3' ucuna bağlanır ve ters

transkriptaz enzimi ile ters transkribe edilir. Daha sonra ters transkriptaz ürünü, miRNA'ya özgü forward primer, reverse primer ve bir boya etiketli *"TaqMan"* probları içeren *"TaqMan"* primerleri ile nicelendirilir (Chen ve diğ., 2005). Bu tez çalışmasında, *"TaqMan"* prob temelli qPCR yöntemi tercih edilmiştir.



Şekil 2.7: TaqMan miRNA assaylerinin şematik açıklaması (Chen ve diğ., 2005).

2.7. *HMGA2* GENİNİN HSA- LET-7D-3P TARAFINDAN DÜZENLENMESİ

Tez kapsamında validasyonu yapılan miRNA hsa-let-7d-3p'nin hedef genlerinden biri olan *hmga2* geninin anlatım analizi yapılmıştır. HMGA ailesi 4 protein içerir: HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c ve HMGA2. İlk üç protein alternatif kırpılma ile 6p21 kromozomundaki bir genden kodlanırken; HMGA2 proteini, kromozom 12q15'den ayrı bir gen ile kodlanır. HMGA proteinleri A-T'ce zengin DNA dizilerine bağlanabilir ve kromatin yapısını değiştirebilir, böylece doğrudan transkripsiyonu indükleyebilir veya baskılayabilir (Wu ve Wei, 2013). Ayrıca, *trp53* geninin apoptotik fonksiyonunu inhibe ederek ve hücre döngüsüne müdahale ederek tümör oluşumuna katkıda bulunur. Normal hücrelerde HMGA protein seviyelerinin çok düşük ya da hiç olmadığı, fakat çoğu tümörde, neoplastik dönüşüm geçirmiş hücrelerde ve embriyonik hücrelerde yüksek olduğu belirtilmektedir. *hmga* geninin aşırı anlatımı, kötü huylu tümör oluşumunda ve metastazla ilişkilidir (Ozturk ve diğ., 2014).

HMGA2 proteini, transkripsiyon aktivitesini düzenlemek üzere kromatin yapısını değiştirebilen bir kromatin yeniden modelleme faktörüdür (Ping ve diğ., 2017). DNA dizilerine bağlanıp kromatin yapısını düzenleyerek transkripsiyon aktivitesini düzenler (Ozturk ve diğ., 2014). Yeniden düzenlenme, *hmga2* geninin aşırı anlatımına neden olur. *hmga2* geninin yeniden düzenlenmesi temel olarak iki genetik değişiklikle sonuçlanır: (1) miRNA regülasyonu için tamamlayıcı dizisi içeren *hmga2* 3'UTR'nin kaybı ve (2) *hmga2* anlatımını arttırmak için promotör bölgede bir füzyon partner eklenmesi. *hmga2*'deki spesifik translokasyon bölgeleri durumdan duruma ve tümörden tümöre farklılık gösterir (Wu ve Wei, 2013).

hmga2 geni iyi ve kötü huylu tümörlerde yüksek oranda anlatım yapar (Ozturk ve diğ., 2014). Akciğer, meme ve kötü huylu epitelyal karsinomalarında *hmga2* geninin aşırı anlatımı tespit edilmiştir ve bu aşırı anlatım, *tp53* mutasyonu ile kısmen ilişkilidir. Over kanserinde de anlatımı artan *hmga2* onkogeni; hücre büyümesi, hücre farklılaşması, apoptoz, EMT, metastaz için önemli bir düzenleyicidir (Ping ve diğ., 2017; Mahajan ve diğ., 2010). Ayrıca diğer kötü huylu over tümörleriyle karşılaştırıldığında, berrak hücreli over tümörlerinde *hmga2* anlatımının en düşük düzeyde olduğu belirtilmiştir (Agostini ve diğ., 2017).

hmga2 geninin anlatımı, miRNA'lar ile düzenlenir (Mahajan ve diğ., 2010). *hmga2* geninin anlatımına yol açan mekanizmalar halen tam olarak anlaşılamamıştır, ancak mirna'lar ile *hmga2* geninin 3'utr'si arasındaki etkileşim önemli rol oynamaktadır. *hmga2* geninin 3'utr'si farklı mirna aileleri tarafından hedeflenen birçok düzenleyici diziye sahiptir. Bununla birlikte, mirna'ların *hmga2* geninin anlatım kontrolünde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Agostini ve diğ., 2017).

Let-7 *"The human lethal-7"* ailesi, gelişim ve karsinogenezin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Kolenda ve diğ., 2014). Bu aile 10 farklı olgun miRNA dizisinden (let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i, miR-98 ve miR-202) oluşur ve 3, 9-12, 19, 21, 22 ve X kromozomlarında 9 farklı lokasyonda bulunmaktadır. Let-7 ailesindeki miRNA'lar, tüm miRNA'lar arasında yaygın miktarda bulunurlar (de Vasconcellos ve diğ., 2017). Türler arasında korunurlar ve antik bir miRNA olarak kabul edilir. Tek tek ya da kümeler halinde bulunurlar. Ailenin tüm üyeleri birbirine benzer ve "çekirdek bölgesi" olarak adlandırılan "RISC" tarafından hedef tanıma için önemli bir bileşen olan ortak bir nükleotid motifini içerir (Kolenda ve diğ., 2014). Over kanseri de dahil olmak üzere birçok farklı kanser türü içinde genellikle anlatımları azalır (Prahm ve diğ., 2016).

Let-7 ailesi; *ras, interlökin-6, siklin d1, mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaz, lın28-a/b*, *c-myc*, *dıcer1* ve diğer onkogenlerin 3'UTR kısmına doğrudan bağlanarak baskılayıcı genler gibi davranırlar (Sun ve diğ., 2016). Let-7 ailesinin *kras, c-myc* ve *hmga-2* gibi over kanserinde etkili olan onkogenleri de baskıladığı bilinmektedir. Ayrıca CD25, CDK6 gibi hücre döngüsü aktivatörlerinin yanı sıra siklin A, D1, D2 ve D3'ü inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda let-7 ailesinin bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü düşünülmektedir (Prahm ve diğ., 2016). Aile üyelerinden biri olan let-7d; EMT, metastazda, kanser hücrelerinin direncinde önemli bir etkiye sahiptir. Let-7d, kişiselleştirilmiş tedavi için bir prognostik ve prediktif belirteç görevi görebilir (Kolenda ve diğ., 2014).

hmga2 geni let-7 bağlanma bölgelerinin kaybedilmesi ile let-7 düzenlemesi engellenebilir. Bu da proteinin aşırı anlatımına neden olur ve tümör oluşumuna yol açar. Gastroenteropankreatik nöroendokrin tümörler ve retinoblastomlarda *hmga2* geni let-7 tarafından negatif olarak düzenlenmiştir (Wagner ve diğ., 2014). Diğer kanser türlerinde etkili olan let-7 ailesinin bir üyesi olan hsa-let-7d-3p'nin analizleri büyük önem taşır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEK TOPLAMA

Proje için İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 09/12/2016 tarihli ve 21 sayılı kararla etik kurul onayı alınmıştır. Bu araştırma kapsamında örnek toplama işlemleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Primer EOK hastaları ve sağlıklı bireylerden oluşmak üzere toplam iki araştırma grubuyla çalışılmıştır. Kan örnekleri, tanısı koyulmuş primer EOK hastaları ve sağlıklı bireylerden toplanmıştır. Her iki araştırma grubu için de 10 farklı bireyden kan örneği alınarak toplamda 20 örnek ile çalışılmıştır. Alınan periferik kanlar aynı gün soğuk zincir ile İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Tanı ve Analiz Birimi Laboratuvarına transfer edilmiştir. Kan örnekleri 10 ml *"clot activator"* tüplere alındıktan sonra 3000x*g*'de 30 dakika santrifüj edilerek serumu ayrılmıştır ve izolasyon aşamasına kadar -80ºC'da saklanmıştır.

3.2. MİRNA ANLATIM ANALİZİ

3.2.1. Serumdan Total RNA İzolasyonu

Serumdan total RNA izolasyonu aşaması için *"mirVana PARIS RNA and Native Protein Purification Kit"* (*Ambion by Life Technologies*) kullanılarak firmanın önerdiği aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. 2 adet 2 ml'lik mikrotüplere 312,5µl serum örneği ve 312,5µl 2X denatürasyon solüsyonu eklenir. Buz üstünde oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir. 2X denatürasyon solüsyonu kullanılmadan önce 37^0C'a ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletilir.
2. Her bir örneğe firmanın önerdiği konsantrasyonda (1.6 x 10^8/mL) 3,5-4µl sentetik *"cel-miR-39" "spike-in*" çözeltisi eklenir.
3. Toplam hacim kadar fenol:kloroform karışımı eklenir. 30-60 saniye vorteksle karıştırılır. 10.000x*g* hızda 5 dakika santrifüjlenir.
4. Ayrılan fazlardan en üstteki şeffaf kısım yeni mikrotüpe aktarılır. Aktarılan hacim not edilir. Ayırım olmazsa elde karıştırılıp tekrar santrifüjlenir.
5. Oda sıcaklığındaki %100'lük etanolden hacmin 1,25 katı kadar eklenir.

6. Steril toplama tüplerine mikro filtreler yerleştirilir. Her bir tüpe yukarıdaki karışımdan 700µL aktarılır ve 10.000x*g* hızda 30 saniye santrifüjleme yapılır. Alt faz atılır, filtre yeniden tüpe yerleştirilir. İşlem tüm örnek filtrelere aktarılana kadar devam eder.
7. Her bir tüpe 700µL yıkama çözeltisi 1 eklenir ve 10.000x*g* hızda 5-10 saniye santrifüjleme yapılır. (Elüsyon tamponu 95ºC'da bekletilerek, daha sonraki aşama için hazırlanır).
8. Alt faz atılır, filtre yeniden tüpe yerleştirilir. Her bir tüpe 500µL yıkama çözeltisi 2/3 eklenir ve 8.000x*g* hızda 5-10 saniye santrifüjleme yapılır.
9. Alt faz atılır, filtre yeniden tüpe yerleştirilir ve 8. basamak tekrarlanır. Toplama tüpü boş olarak 1 dakika son hızda santrifüj edilir. Filtre temiz bir mikrotüpe alınır.
10. 95ºC'daki elüsyon tamponu 50µL filtreye dokunmadan dikkatlice filtrenin ortasına bırakılır. 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir. En yüksek hızda 30 saniye santrifüjlenir.
11. Filtreler atılır ve elde edilen RNA'nın konsantrasyonu ölçülür. Elde edilen total RNA karışımı -20°C'de saklanır.

3.2.2. *"Spike-In"* Sentetik miRNA Kullanımı

qPCR kullanılarak miRNA'ların doğru kantitatif tayini, normalizasyon tekniklerine bağlıdır ve bunların eksikliği; verilerin yanlış yorumlanmasına ve yanlış sonuçların elde edilmesine yol açabilir. Bununla birlikte, serum ve plazmadan elde edilen miRNA'ların düşük miktarlarda elde edilmeleri ve güvenilir endojen kontrollerin bulunmaması nedeniyle diğer örneklere göre daha zordur. Serumda güvenilir endojen kontrollerin olmaması durumunda, miRNA anlatım verilerinin normalizasyonu için ekzojen veya *"spike-in"* kontrolleri kullanılır. RNA izolasyonu ve PCR amplifikasyonunun etkinliği, çalışma sırasında *"spike-in"* kontrol olarak eklenen bir ekzojen sentetik miRNA (*C. elegans;* cel-miR-39 veya *A. thaliana;* ath-miR-159a) aracılığıyla izlenebilir. RNA izolasyonu sırasında denatürasyon solüsyonu ilave edildiği basamakta eklenen sentetik RNA, endojen miRNA'lar ile aynı koşullara tabi tutulduğundan, teknik normalizasyon için gereken süreç kontrolünü sağlar. Daha önce yapılmış çalışmalara dayanarak bu tez kapsamında *"spike-in"* kontrol olarak *"cel-miR-39"* seçilmiştir.

Tez kapsamında kullanılan *"spike-in"* solüsyonunun hazırlanmasında firmanın önerdiği protokol takip edilmiştir. Liyofilize durumdaki 10pmol *"spike-in"* karışımından bir adet ana ve bir adet de ara stok olmak üzere 2 farklı çözelti hazırlanır. Liyofilize karışım üzerine 300µL nükleazsız su eklenerek ana stok oluşturulur ($2x10^{10}$/µL). Ana stoktan 4µL alınıp 16µL nükleazsız su eklenerek ara stok çözeltisi hazırlanır ($4x10^{9}$/µL). Ana ve ara stok çözeltiler -

80°C'da saklanır. Ara stoktan 2µL alınıp, 48µL nükleazsız su eklenerek (1.6 x 10^8/mL) oluşturulan yeni karışım, izolasyon sırasında kullanılacak olan çözeltidir.

3.2.3. cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA'lardan *"TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit"* kullanılarak firmanın önerdiği protokole göre cDNA sentezlemiştir. Kit içerisindeki çözeltiler, 5X primer ve izole edilen total RNA buz üzerinde çözündürülür. Kit protokolüne göre çalışma çözeltisi *"master mix"* hazırlanır ve reaksiyon steril PCR tüplerinde gerçekleştirilir. Primer olarak *"TaqMan MicroRNA Assay (5X)"* leri kullanılmıştır. PCR reaksiyonunun bileşenlerinden olan çalışma çözeltisi, cDNA reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları sırasıyla Tablo 3.1'de verilmiştir. Termal döngü sonrası elde edilen sonra cDNA'lar -20°C'da saklanmıştır.

Tablo 3.1: A) Çalışma çözeltisi bileşenleri B) Reaksiyonun bileşenleri C) Reaksiyon koşulları.

BİLEŞEN	HACİM
dNTP karışımı (100 mM)	0,15µl
10X RT tamponu	1,5µl
Ters transkriptaz enzimi	1µl
RNaz inhibitörü	0,19µl
Nükleazsız su "UltraPure"	4,16µl
TOTAL	**7 µl**

A

BİLEŞEN	HACİM
Çalışma çözeltisi	7µl
Total RNA (4 ng/µl)	5µl
Primer (5X)	3µl
TOTAL	**15 µl**

B

SICAKLIK	ZAMAN
16°C	30'
42°C	30'
85°C	5'
4°C	∞

C

3.2.4. Aday miRNA'ların Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için *"TaqMan MicroRNA Assay (20x)"* leri ve elde edilen cDNA'lar kullanılmıştır. Validasyonu yapılmak üzere hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-548am-5p, hsa-let-7d-3p ve kontrol olarak kullanılan "*cel-miR-39"* için *"TaqMan MicroRNA Assay"* spesifik primer ve prob ile miRNA'ların anlatım analizleri gerçekleştirilmiştir. Kullanılacak malzemeler ve materyaller buzda eritilir ve reaksiyon karışımı PCR tüplerinde hazırlanır. Ön denemelerden sonra yürütülecek olan reaksiyon gruplarına NTC *"No Template Control"* olarak isimlendirilen negatif kontrol grubu da dahil edilir. NTC grubuna ait reaksiyon tüpleri hazırlanırken, test edilen genetik materyal yerine aynı oranda nükleazsız su eklenir. Reaksiyon tüpleri hazırlandıktan sonra, Stratagene Mx3000P cihazı ile qPCR analizi yapılmıştır. Reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri ve reaksiyon koşulları.

BİLEŞEN	HACİM
Universal PCR Master Mix	10µl
Nükleazsız su "UltraPure"	6,5µl
Primer (20X)	1µl
cDNA	2,5µl
TOTAL	**20µl**

	SICAKLIK	ZAMAN
	50°C	2'
	95°C	10'
40 DÖNGÜ	95°C	15"
	60°C	1'

3.3. GEN ANLATIM ANALİZİ

hmga2 geninin anlatım analiz aşamasında 10 EOK hasta kanı ve 10 sağlıklı kontrol kanı ile çalışılmıştır. Tüm kandan total RNA izolasyonu aşaması için *"mirVana PARIS RNA and Native Protein Purification Kit"* (*Ambion by Life Technologies*) kullanılarak firmanın önerdiği protokol takip edilmiştir. Bu protokol serumdan total RNA izolasyon protokolü ile aynı aşamalardan oluşmaktadır (3.2.1).

3.3.1. cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA'lardan *"High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit"* kullanılarak firmanın önerdiği protokole göre cDNA sentezlemiştir. Kit içerisindeki çözeltiler ve izole edilen total RNA buz üzerinde çözündürülür. Kit protokolüne göre çalışma çözeltisi hazırlanır ve reaksiyon steril PCR tüplerinde gerçekleştirilir. PCR reaksiyonunun bileşenlerinden olan çalışma çözeltisi, cDNA reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları sırasıyla Tablo 3.3'te verilmiştir. Termal döngü sonrası elde edilen sonra cDNA'lar -20°C'da saklanmıştır.

Tablo 3.3: A) Çalışma çözeltisi bileşenleri B) Reaksiyonun bileşenleri C) Reaksiyon koşulları.

BİLEŞEN	HACİM
dNTP karışımı (100 mM)	0,8µl
10X RT tamponu	2µl
Ters transkriptaz enzimi	1µl
10X Random primer	2µl
Nükleazsız su "UltraPure"	4,2µl
TOTAL	**10µl**

A

BİLEŞEN	HACİM
Çalışma çözeltisi	10µl
Total RNA	10µl
TOTAL	**20µl**

B

SICAKLIK	ZAMAN
25°C	10'
37°C	120'
85°C	5'
4°C	∞

C

3.3.2. *HMGA2* Geninin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için *'TaqMan MicroRNA Assay (20x)"* ve kalıp olarak elde edilen cDNA'lar kullanılmıştır. Anlatım analizi yapılmak üzere seçilen *hmga2* geninin anlatımının belirlenmesinde referans "*housekeeping"* gen olarak *gapdh*

"glyceraldhyde-3-phosphate dehydrogenase" geninin primer ve probları kullanılmıştır. Kullanılan *"TaqMan Gene Expression Assay"*leri spesifik primer ve prob dizileri içerdiğinden, optimum bağlanma koşulları ön denemelerle belirlendikten sonra hedef genin anlatım analizi yapılmıştır. Reaksiyon tüpleri hazırlandıktan sonra, Stratagene Mx3000P cihazı ile qPCR analizi yapılmıştır. Reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4: Gen anlatım analizi için qPCR reaksiyonunun bileşenleri ve reaksiyon koşulları.

BİLEŞEN	HACİM
Universal PCR Master Mix	10µl
Nükleazsız su "UltraPure"	5µl
Primer (20X)	1µl
cDNA	4µl
TOTAL	**20µl**

	SICAKLIK	ZAMAN
	50°C	2'
	95°C	10'
40 DÖNGÜ	95°C	15"
	60°C	1'

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

qPCR analizleri sonucu elde edilen C_t değerleri $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile rölatif olarak değerlendirilerek anlatım katsayıları belirlenmiştir. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz için *"MATLAB R2017b"* ve *"Graphpad Prism version 7.0"* programları kullanılmıştır. MiRNA anlatım düzeyleri gruplar arasında rölatif olarak karşılaştırılmıştır. $\Delta\Delta C_t$ değerleri *"Feature Scaling"* yöntemi ile normalize edilmiştir.

$$Feature\ Scaling = \frac{X - X_{min}}{X_{max} - X_{min}}$$ şeklinde hesaplanır.

X= Normalize edilmek istenen ΔΔCt değeri
X_{min} = Kontrol ya da hasta grubundaki minimum ΔΔCt değeri
X_{max} = Kontrol ya da hasta grubundaki maximum ΔΔCt değeri

Normalize edilmiş veriler parametrik olmayan istatistiksel bir metot olan *"Wilcoxon test"* ile değerlendirilmiştir. Bu testin istatistiksel önemi, iki grubun ortalamaları arasındaki farkın, grupların örneklendiği popülasyondaki gerçek bir farkı yansıtıp yansıtmadığını göstermesidir. Bu çalışmadaki tüm istatistiksel testler iki taraflıdır ve 0.05'ten düşük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca miRNA çok değişkenli *"multivariate"* analizi ile normalize edilmiş ΔΔCt değerleri kullanılarak standart sapma değerleri ve CI (güven aralığı) *"Confidence Interval"* hesaplanmıştır. Standart sapma değerlerinin hesaplanması yürütülen deneylerin kesinliğini ve doğruluğunu gösterir. Ölçümlerin teoriye dayanan bir tahmin ile karşılaştırılıp birbirine uygunluk gösterip göstermediğine karar vermede standart sapma değeri

önemlidir. Güven aralığı, standart sapma ve örnek sayısına bağlıdır ve dar bir aralıkta olması beklenir.

ROC *"Receiver Operating Characteristics"* (Onanma Olasılığı) eğrisi analizleri hasta ve sağlıklı bireyleri ayırt etmede kullanılan, değişkenlere ne ölçüde güvenebileceğimizi gösteren bir istatistik metodudur. Testlerin seçicilik ve duyarlılıklarını ölçmede kullanılır. ROC eğrileri ayrıca duyarlılık ve özgüllüğü belirlemek için ROC eğrisi altında kalan alan (AUC) *"Area Under the Curve"* hesaplanmıştır. AUC en küçük 0.50, en büyük 1 değerini alır. 1 değerine ne kadar yakın olursa sonuçların doğruluğu o kadar yüksek olur.

4. BULGULAR

4.1. MİRNA ANLATIM ANALİZİ

4.1.1. Örneklerin Özellikleri

Araştırma kapsamında uygun örneklerin belirlenmesi ve kan alım işlemleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Örnek grubunu; sağlıklı bireyler ve primer EOK teşhisi koyulmuş hastalar oluşturmaktadır. Her iki araştırma grubu için de 30-65 yaş aralığında 10 farklı kadın bireyden kan örneği alınarak serumları ayrılmış toplamda 20 serum ile çalışılmıştır. Araştırma kapsamında çalışılan EOK hastalarının özellikleri Tablo 4.1'te verilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan EOK hastalarının özellikleri.

YAŞ	ALKOL	SİGARA	OVER KANSER TÜRÜ	AİLE GEÇMİŞİ	CA-125 (U/mL)	FIGO EVRESİ
30	?	Hayır	Seröz Adenokarsinom	Yok	58	IIB
52	?	Hayır	Seröz Papiller	Yok	165	IIIB
46	Hayır	Hayır	Endometroid	?	270	IIA
51	?	Hayır	Seröz Papiller	Yok	583	IIIC
50	?	Evet	Seröz Papiller	Yok	5197	IIIC
50	Hayır	Hayır	Seröz Papiller	Anne, abla bağırsak kanseri	4300	IIIC
48	?	Hayır	Seröz Papiller	Teyze kolon kanseri, anne mide kanseri	1400	IIIC
54	Hayır	Hayır	Seröz	Yok	2700	IIIC
50	Hayır	Hayır	Seröz	Yok	315	IIIB
46	Hayır	Hayır	Seröz	Yok	214	IA

4.1.2. Örneklerin Kalite Kontrolü

EOK hastalarının ve sağlıklı bireylerin serumlarından izole edilen RNA'ların kalite kontrolünü ve konsantrasyonunu ölçmek için "NanoDrop IMPLEN P-Class" spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. *"NanoDrop"* uygulamasında "*mirVana PARIS RNA and Native Protein Purification Kit"*de bulunan elüsyon tamponu kör örnek *"blank"* olarak kullanılmış ve her örnekten 1,5 *µl* alınarak ölçümler yapılmıştır. Elde edilen serbest RNA konsantrasyonu 3-10 *ng/µl* aralığındadır. Tablo 4.2'de 10 sağlıklı ve 10 hastanın *"NanoDrop"* ölçümünden elde

edilen konsantrasyon (*ng/µl*) ve 260/280nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin oranı ($A_{260/280}$) gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Sağlıklı bireylerin ve EOK hasta örneklerinin kalite ve kantitite sonuçları.

	HASTA SERUM ÖRNEKLERİ		SAĞLIKLI SERUM ÖRNEKLERİ	
	ng/µl	**$A_{260/280}$**	**ng/µl**	**$A_{260/280}$**
1	7,6	1,3	6	2,1
2	5,6	1,1	6	1,4
3	4,8	1,2	6,8	1,3
4	7,6	0,9	7,2	1,2
5	7,6	1,3	5,6	2,1
6	6,4	1,2	4,4	1,3
7	10,8	1,2	6	1,2
8	9,6	1,3	4	1,5
9	3,6	1,6	8,4	1,3
10	5,6	1,6	2,8	1,8

4.1.3. Anlatım Analizi Sonuçları

Çalışma grubumuz tarafından *"Over Kanserinde miRNA Analizi ile Moleküler Tanı ve İzleme"* başlıklı ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) destekli öncelikli alan projesi *(Proje No: 51472)* ve aynı başlıklı bir Yüksek Lisans tez projesi *(Proje No: 47803)* tamamlanmıştır. Proje sonucu over kanseri hastalarının serumlarından elde edilen miRNA profilleri, sağlıklı bireylerden elde edilen miRNA profilleriyle mikrodizilim tekniğiyle karşılaştırılmış ve 31 adet anlatımı anlamlı şekilde değişmiş miRNA tespit edilmiştir. 4 miRNA'nın mikrodizilim sonuçları Tablo 4.3'te gösterilmiştir (Gümüşoğlu, 2016, Yüksek Lisans Tezi).

Tablo 4.3: Aday 4 miRNA'nın mikrodizilim sonucu (Gümüşoğlu, 2016, Yüksek Lisans Tezi).

MiRNA	ANLATIM	KAT DEĞİŞİMİ (log)	p DEĞERİ
Hsa-miR-1909-5p	Azalan	-4.88594	2.84E-09
Hsa-miR-548am-5p	Azalan	-3.84752	4.92E-07
Hsa-miR-885-5p	Azalan	-4.06315	5.21E-07
Hsa-let-7d-3p	Azalan	-2.07235	0.007

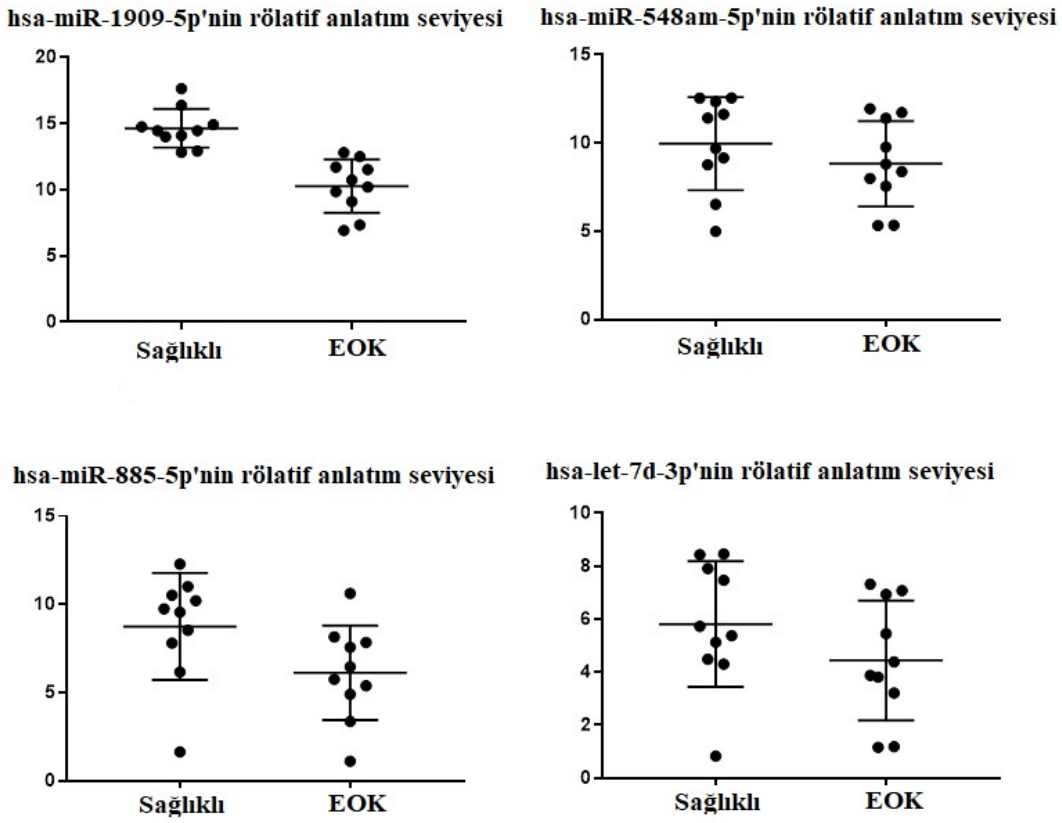
EOK hastalarının ve sağlıklı bireylerin serum örneklerindeki aday 4 miRNA'nın anlatım analizi için her bir miRNA'ya spesifik *"TaqMan prob"* örnekler arası normalizasyonu sağlamak için *"cel-mir-39"* sentetik miRNA kullanılmıştır. Örneklere ait C_t değerleri ve logaritmik kat değişimi Stratagene Mx3000P cihazında otomatik olarak hesaplanmıştır. C_t değerleri $\Delta\Delta C_t$

yöntemi ile rölatif olarak değerlendirilerek anlatım katsayıları belirlenmiştir. Ayrıca, $\Delta\Delta C_t$ değerleri *"Feature Scaling"* yöntemi ile normalize edilmiştir. Normalize edilmiş $\Delta\Delta C_t$ değerleri ile parametrik olmayan istatistiksel bir metot olan *"Wilcoxon test"* ile p değerleri hesaplanmıştır. Tablo 4.4'te normalize edilmiş verilerle hesaplanmış standart sapma değerleri, %95 CI değerleri, p değerleri gösterilmiştir. Hesaplanan %95 CI uygun ve dar bir aralıktadır.

Tablo 4.4: Anlatımı değişen miRNA'ların qPCR sonuçlarının çok değişkenli analizi.

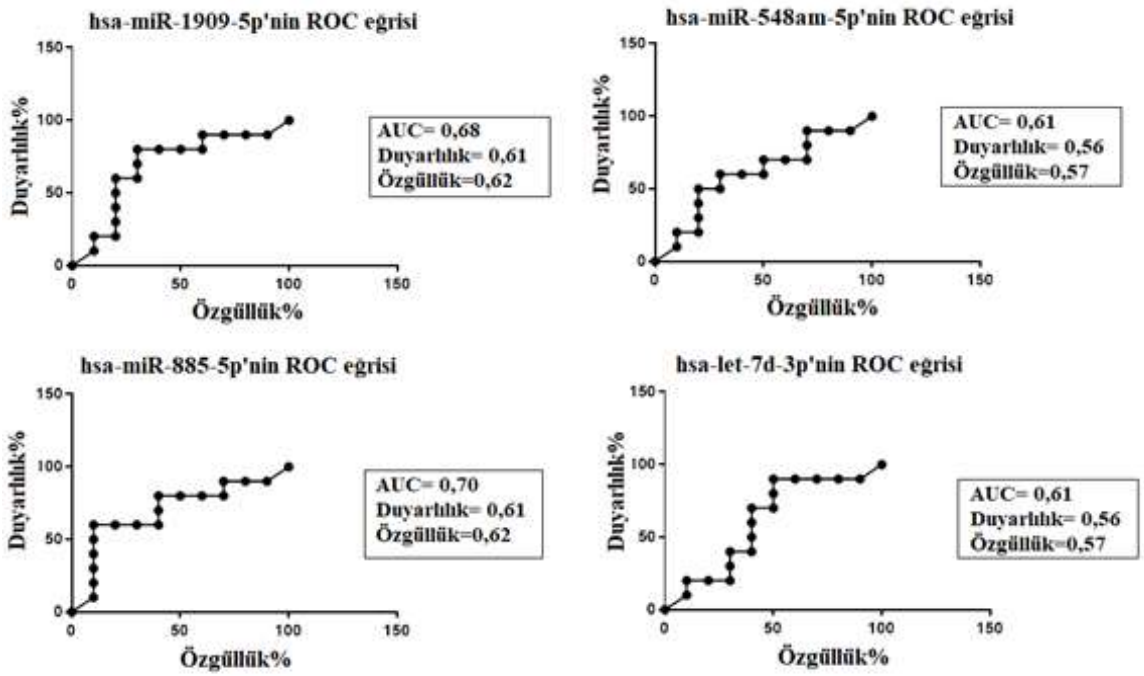
MİRNA	**ANLATIM**	**KAT DEĞİŞİMİ (log)**	**p DEĞERİ**	**STANDART SAPMA**	**%95 CI**
Hsa-miR-1909-5p	Azalan	-1,35	0,002	0,13	0,42 – 0,94
Hsa-miR-548am-5p	Azalan	-2,72	0,084	0,13	0,35 – 0,86
Hsa-miR-885-5p	Azalan	-2,64	0,0195	0,12	0,45 – 0,94
Hsa-let-7d-3p	Azalan	-2,35	0,0488	0,13	0,34 – 0,87

Aday miRNA'lara ait anlatım seviyeleri, EOK hastaları ve sağlıklı kontrol örneklerinde parametrik olmayan *"Wilcoxon test"* ile değerlendirildiğinde, EOK hastalarında anlatım seviyeleri istatistiksel olarak 3 miRNA (hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-885-5p ve hsa-let-7d-3p) anlamlı bulunmuştur. Hsa-miR-548am-5p istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fakat 4 miRNA'nın anlatımı EOK hasta serumlarında rölatif olarak daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.1).



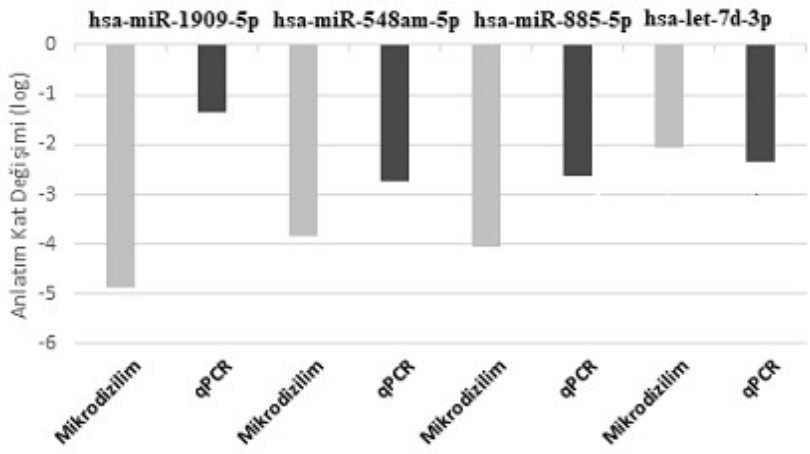
Şekil 4.1: EOK hasta grubu ve kontrol örneklerindeki rölatif miRNA anlatım seviyeleri.

Verilerin doğruluğunu belirlemek amacıyla ROC eğrisi analizi yapılmıştır (Şekil 4.2). Aday miRNA'ların EOK hastaları üzerinde ayırt edici bir etkisi olduğu saptanmıştır. ROC eğrisinin altında kalan alan Şekil 4.2'de görüldüğü gibi aday miRNA'ların EOK hastaları ile sağlıklı bireyleri ayırmadaki doğruluk oranını göstermektedir. Bu çalışmada, AUC>0.50 olması sebebiyle, kullanılan miRNA'ların hasta ve sağlıklı bireyleri ayırmada başarılı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.2: Aday miRNA'ların ROC eğrisi analizi.

Yapılan qPCR analizi ile elde edilen veriler EOK hastalarında aday miRNA'ların anlatım düzeylerinde anlamlı miktarda azalma olduğunu göstermiştir. Mikrodizilim ve qPCR'dan elde edilen sonuçların karşılaştırılması Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3: Mikrodizilim ve qPCR yöntemleri ile miRNA'ların logaritmik kat değişimleri.

4.2. AĞ TABANLI YÖNTEMLER İLE *"IN SILICO"* MİRNA'LARIN HEDEF GEN TESPİTİ

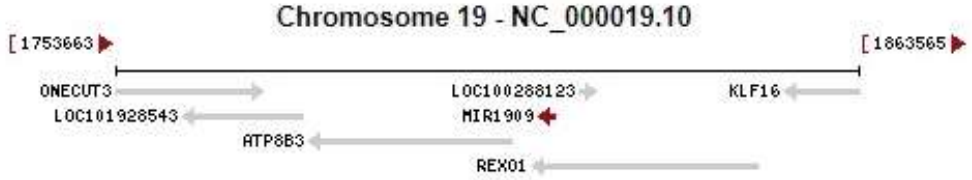
Bu çalışmada aday miRNA'ların hedef mRNA'larını belirlemede veri tabanlarından yararlanılmıştır. Aday 4 miRNA'nın *"miRBase"* erişim ve olgun dizi bilgisi Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5: Aday miRNA'ların miRBase erişim ve olgun dizi bilgisi.[7]

MiRNA	MiRBase ERİŞİMİ	OLGUN DİZİSİ
Hsa-miR-1909-5p	MIMAT0007882	UGAGUGCCGGUGCCUGCCCUG
Hsa-miR-548am-5p	MIMAT0022740	AAAAGUAAUUGCGGUUUUUGCC
Hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU
Hsa-let-7d-3p	MIMAT0004484	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU

Her miRNA'nın *"TargetScan"* veri tabanı ile hedeflediği ilk 10 gen tespit edilmiştir. Bu genler *"TargetScan"*ın bağlam++ skoruna *"context++ score"* göre sıralanmıştır. Ek olarak, *"Ensembl"* veri tabanı ile bu genlerin fonksiyonları da belirtilmiştir. Tablolardaki genler, *"TargetScan"* veri tabanındaki farklı parametrelere göre oluşturulan skorların ortalama değerlerine göre sıralanmıştır.

19. kromozomun kısa kolunda (p kolu) ve 19p13.3 bölgesinde lokalize olan hsa-miR-1909'un genom lokalizasyonu Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4: Hsa-miR-1909'un insan genomundaki lokalizasyonu.[8]

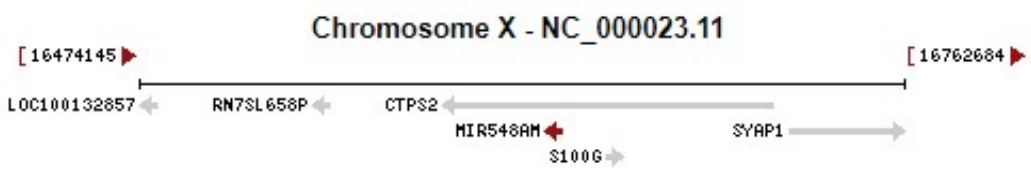
Hsa-miR-1909-5p'nin *"TargetScan"* veri tabanı ile hedeflediği ilk 10 gen ve *"Ensembl"* veri tabanı ile hedeflediği bu genlerin fonksiyonları Tablo 4.6'da verilmiştir.

[7]https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene[Ziyaret tarihi: 4 Temmuz 2017].
[8]https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100302210 [Ziyaret tarihi: 4 Temmuz 2017].

Tablo 4.6: Hsa-miR-1909-5p'nin hedeflediği ilk 10 gen.[9]

HEDEF GEN	GEN İSMİ	BİYOLOJİK FONKSİYONU	BAĞLAM ++ SKORU
tmem218	Transmembranerotein 218	Protein bağlayıcı proteinlerin sentezi	-0.96
zkscan1	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	Transkripsiyonun düzenlenmesi	-0.89
tac4	Tachykinin 4 (Hemokinin)	Hücresel sinyal oluşumu, kan basıncının düzenlenmesi	-0.86
ccdc113	Coiled-coil domain containing 113	Hücre organizasyonu	-1.40
ıl23a	Interleukin 23 subunit alpha	Tümör nekroz faktörü üretiminin pozitif düzenlenmesi, immün cevap	-0.79
s100a2	S100 Calcium binding protein A2	Endotel hücre migrasyonu	-0.79
ptgdr2	Prostaglandin D2 receptor-2	Sinyal iletimi, bağışıklık yanıtı, erkek germ hücresi proliferasyonunun negatif düzenlenmesi	-0.79
kcng1	Potassium voltage-gated channel modifier subfamily G member 1	Iyon taşınması, iyon transmembran taşınımının düzenlenmesi	-0.88
uba7	Ubiquitin like modifier sctivating enzyme 7	DNA hasar uyarısına hücresel tepki,	-0.77
c7orf65	Chromosome 7 open reading frame 65	-	-0.75

X kromozomun kısa kolunda (p kolu) ve Xp22.2 bölgesinde lokalize olan hsa-miR-548am'nin genom lokalizasyonu Şekil 4.5'te verilmiştir. Liang ve diğ. (2012), miR-548 ailesinin MAPK sinyal yolağı, hücre siklusu, TP53 sinyal yolağı, melanogenezis, kolorektal kanser, glioma ve küçük hücreli akciğer kanseri, renal hücreli karsinoma gibi yolaklara katılan genleri hedeflediğini belirtmişlerdir (Liang ve diğ., 2012).



Şekil 4.5: Hsa-miR-548am'nin insan genomundaki lokalizasyonu.[10]

[9]http://www.targetscan.org/cgibin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg=mir-1909-5p [Ziyaret Tarihi: 23 Ağustos 2017].
[10]https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100616428 [Ziyaret tarihi: 4 Temmuz 2017].

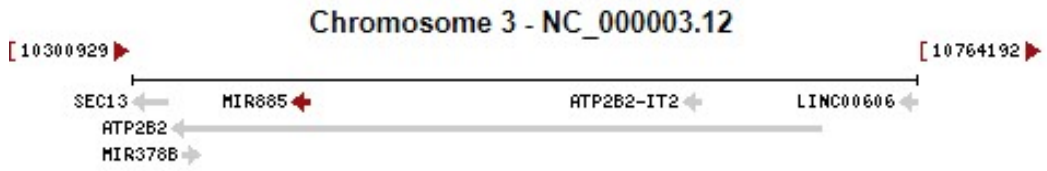
Hsa-miR-548am-5p'in *"TargetScan"* veri tabanı ile hedeflediği ilk 10 gen ve *"Ensembl"* veri tabanı ile hedeflediği bu genlerin fonksiyonları Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7: Hsa-miR-548am-5p'nin hedeflediği ilk 10 gen.[11]

HEDEF GEN	GEN İSMİ	BİYOLOJİK FONKSİYONU	BAĞLAM ++ SKORU
tbca	Tubulin folding cofactor A	Protein katlanması	-0.68
camlg	Calcium modulating ligand	İmmün cevap, sinyal iletimi, epidermal büyüme faktörü reseptör sinyal yolağı	-0.71
ghrl	Ghrelin and obestatin prepropeptide	Endotel hücre proliferasyonunun negatif düzenlenmesi, hormonal cevap, hücre proliferasyonunun düzenlenmesi, östrojene cevap	-0.61
srp9	Signal recognition particle 9	Translasyonel uzamanın negatif düzenlenmesi	-0.76
cbwd6	Cobw domain containing 6	Nükleotid ve ATP bağlayıcı protein sentezi	-0.59
xage2	X Antigen family, member 2	-	-0.57
xage2b	X Antigen family, member 2b	Protein bağlayıcı proteinlerin sentezi	-0.57
lactb2	Lactamase, beta 2	RNA fosfodiester bağın hidrolizi	-0.82
prok2	Prokineticin 2	Apoptozun negatif düzenlenmesi, hücre proliferasyonunun pozitif düzenlenmesi, sirkadiyen ritim	-0.56
spaca1	Sperm acrosome associated 1	Spermatogenezis	-0.56

3. kromozomun kısa kolunda (p kolu) ve 3p25.3 bölgesinde lokalize olan hsa-miR-885'in genom lokalizasyonu Şekil 4.6'da verilmiştir. *"DIANA-microT-CDS"* veri tabanı ile hsa-miR-885-5p'nin hedef genlerinin; RNA degredasyonunda, yağ asidi biyosentezinde, hücre adhezyon moleküllerinin regülasyonunda, pantotenat ve CoA biyosentezinde ve endometriyal kanser yolaklarında yer aldığını belirtmişlerdir (Sandrim ve diğ., 2016).

[11]http://www.targetscan.org/cgibin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg=miR-548am-5p [Ziyaret Tarihi: 23 Ağustos 2017].



Şekil 4.6: Hsa-miR-885'in insan genomundaki lokalizasyonu.[12]

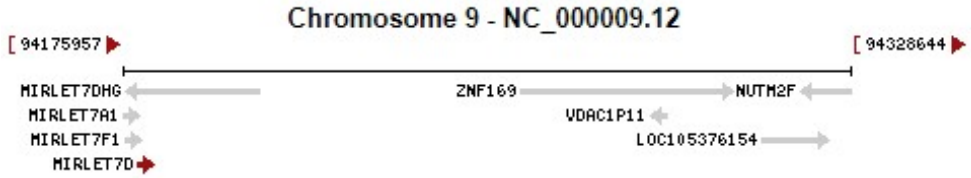
Hsa-miR-885-5p'nin *"TargetScan"* veri tabanı ile hedeflediği ilk 10 gen ve *"Ensembl"* veri tabanı ile hedeflediği bu genlerin fonksiyonları Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8: Hsa-miR-885-5p'nin hedeflediği ilk 10 gen.[13]

HEDEF GEN	GEN İSMİ	BİYOLOJİK FONKSİYONU	BAĞLAM ++ SKORU
rp11-826n14.2	Uncharacterized protein	-	-0.81
pdcd5	Programmed cell death 5	Apoptoz, hücre proliferasyonun negatif düzenlenmesi, gen anlatımının pozitif düzenlenmesi, apoptotik sürecin pozitif düzenlenmesi	-0.78
galnt3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	Karbonhidrat metabolizması, protein glikozilasyonu	-0.75
znf812	Zinc finger protein 812		-0.72
c8orf88	Chromosome 8 open reading frame 88	Translasyonel başlangıcın negatif düzenlenmesi	-0.69
zadh2	Zinc binding alcohol dehydrogenase domain containing 2	Prostaglandin metabolik süreci, yağ hücresi farklılaşmasının negatif düzenlenmesi	-0.66
fam229b	Family with sequence similarity 229, member B	-	-0.61
nudcd2	NudC domain containing 2	Protein katlanması, gelişim süreci	-0.59
tmem230	Transmembrane protein 230	Sinaptik vezikül transportu	-0.58
zar1l	Zygote arrest 1-like	-	-0.57

9. kromozomun uzun kolunda (q kolu) ve 9q22.32 bölgesinde lokalize olan hsa-let-7d'nin genom lokalizasyonu Şekil 4.7'de verilmiştir.

[12]https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=hsa-miR-885-5p [Ziyaret tarihi:4 Temmuz 2017].
[13]http://www.targetscan.org/cgibin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg=hsa-mir-885-3p [Ziyaret Tarihi: 23 Ağustos 2017].



Şekil 4.7: Hsa-let-7d'nin insan genomundaki lokalizasyonu.[14]

Hsa-let-7d-3p'nin *"TargetScan"* veri tabanı ile hedeflediği ilk 10 gen ve *"Ensembl"* veri tabanı ile hedeflediği bu genlerin fonksiyonları Tablo 4.9'da verilmiştir.

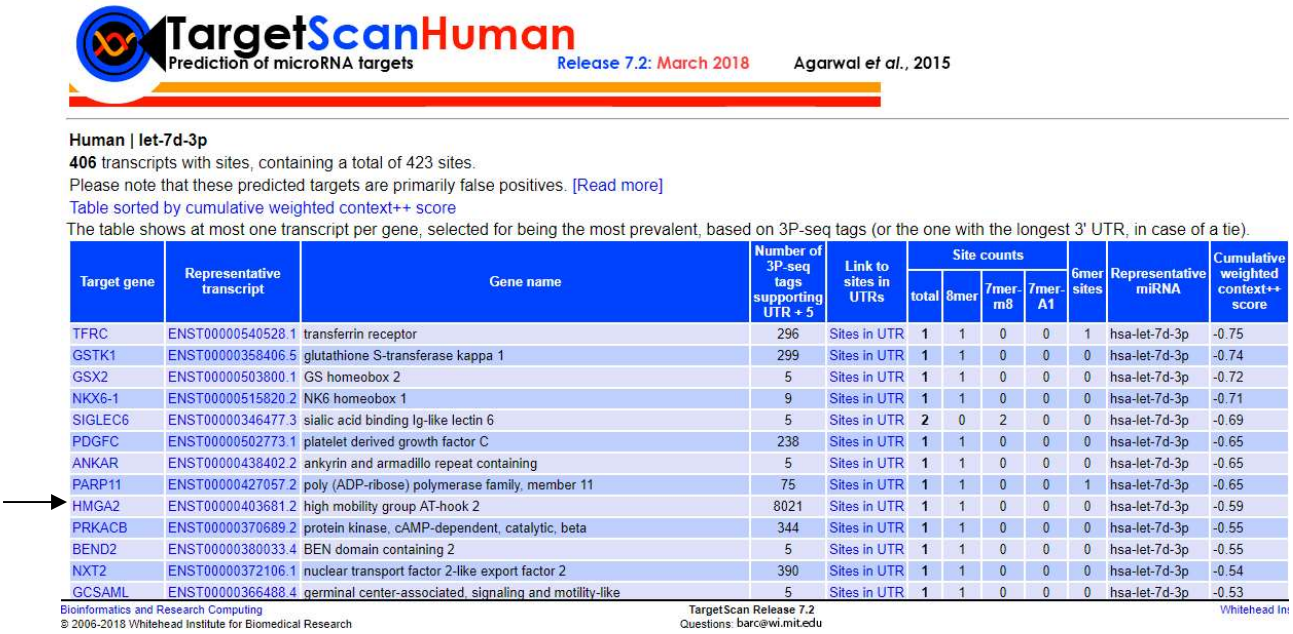
Tablo 4.9: Hsa-let-7d-3p'nin hedeflediği ilk 10 gen.[15]

HEDEF GEN	GEN İSMİ	BİYOLOJİK FONKSİYONU	BAĞLAM++ SKORU
trfc	Transferrin receptor	Transferrin taşımacılığı, T ve B hücre proliferasyonunun pozitif düzenlenmesi	-0.81
gstk1	Glutathione S-transferase kappa 1	Epitel hücre farklılaşması, glutatyon metabolizması	-0.74
gnao1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O	Protein katlanması, sinyal iletimi, yaşlanma, hücresel süreç	-0.73
nkx6-2	Nk6 Homeobox-1	Hücre farklılaşması ve proliferasyonu, transkripsiyon düzenlenmesi, RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyonun düzenlenmesi	-0.71
sıglec6	Sialic acid binding Ig-like lectin 6	Hücre adhezyonu, hücre sinyali	-0.69
pdgfc	Platelet derived growth factor C	Hücre proliferasyonunun pozitif düzenlenmesi, embriyo gelişimi, hücre göçünün pozitif düzenlenmesi, DNA replikasyonunun ve hücre bölünmesinin pozitif düzenlenmesi	-0.65
parp11	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11	MRNA taşınması, çekirdek zarı organizasyonu, protein taşınması, hücre farklılaşması	-0.65
gsx2	GS Homeobox 2	Transkripsiyonun düzenlenmesi, hücre göçünün düzenlenmesi	-0.60
hmga2	High mobility group AT-hook 2	RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyonun negatif regülasyonu, EMT, baz eksizyon onarımı, kromatin organizasyonu, transkripsiyonun düzenlenmesi, mitotik G2 DNA hasar kontrol noktası, gen anlatımının pozitif düzenlenmesi	-0.59
prkacb	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta	Sinyal iletimi, protein fosforilasyonu	-0.55

[14]https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406886 [Ziyaret tarihi:5 Temmuz 2017].
[15]http://www.targetscan.org/cgibin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=let-7d-3p&mirg= [Ziyaret Tarihi: 23 Ağustos 2017].

4.3. GEN ANLATIM ANALİZİ

"Pathway Studio" ve *"TargetScan"* veri tabanından yararlanılarak hsa-let-7d-3p'nin hedeflediği *hmga2* geni belirlenmiştir (Şekil 4.8). Literatürde *hmga2* geninin let-7 ailesi ile düzenlenmesine yönelik çalışmalar mevcuttur. Let-7 aile üyelerinden biri olan hsa-let-7d-3p ile *hmga2* geninin mekanizmasına ait verilere rastlanmamıştır. Sonuç olarak, tez kapsamında gen anlatım analizi için toplanan kan örneklerinde hsa-let-7d-3p anlatım miktarı ile *hmga2* geninin anlatım miktarı karşılaştırılmıştır.


TargetScanHuman
Prediction of microRNA targets
Release 7.2: March 2018
Agarwal *et al.*, 2015

Human | let-7d-3p
406 transcripts with sites, containing a total of 423 sites.
Please note that these predicted targets are primarily false positives. [Read more]
Table sorted by cumulative weighted context++ score
The table shows at most one transcript per gene, selected for being the most prevalent, based on 3P-seq tags (or the one with the longest 3' UTR, in case of a tie).

Target gene	Representative transcript	Gene name	Number of 3P-seq tags supporting UTR + 5	Link to sites in UTRs	Site counts				6mer sites	Representative miRNA	Cumulative weighted context++ score
					total	8mer	7mer-m8	7mer-A1			
TFRC	ENST00000540528.1	transferrin receptor	296	Sites in UTR	1	1	0	0	1	hsa-let-7d-3p	-0.75
GSTK1	ENST00000358406.5	glutathione S-transferase kappa 1	299	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-let-7d-3p	-0.74
GSX2	ENST00000503800.1	GS homeobox 2	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-let-7d-3p	-0.72
NKX6-1	ENST00000515820.2	NK6 homeobox 1	9	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-let-7d-3p	-0.71
SIGLEC6	ENST00000346477.3	sialic acid binding Ig-like lectin 6	5	Sites in UTR	2	0	2	0	0	hsa-let-7d-3p	-0.69
PDGFC	ENST00000502773.1	platelet derived growth factor C	238	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-let-7d-3p	-0.65
ANKAR	ENST00000438402.2	ankyrin and armadillo repeat containing	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-let-7d-3p	-0.65
PARP11	ENST00000427057.2	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11	75	Sites in UTR	1	1	0	0	1	hsa-let-7d-3p	-0.65
HMGA2	ENST00000403681.2	high mobility group AT-hook 2	8021	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-let-7d-3p	-0.59
PRKACB	ENST00000370689.2	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta	344	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-let-7d-3p	-0.55
BEND2	ENST00000380033.4	BEN domain containing 2	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-let-7d-3p	-0.55
NXT2	ENST00000372106.1	nuclear transport factor 2-like export factor 2	390	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-let-7d-3p	-0.54
GCSAML	ENST00000366488.4	germinal center-associated, signaling and motility-like	5	Sites in UTR	1	1	0	0	0	hsa-let-7d-3p	-0.53

Bioinformatics and Research Computing
© 2006-2018 Whitehead Institute for Biomedical Research
TargetScan Release 7.2
Questions: barc@wi.mit.edu
Whitehead In

Şekil 4.8: Hsa-let-7d-3p'nin hedeflediği *hmga2* geninin web görüntüsü (TargetScan).

4.3.1. Örneklerin Kalite Kontrolü

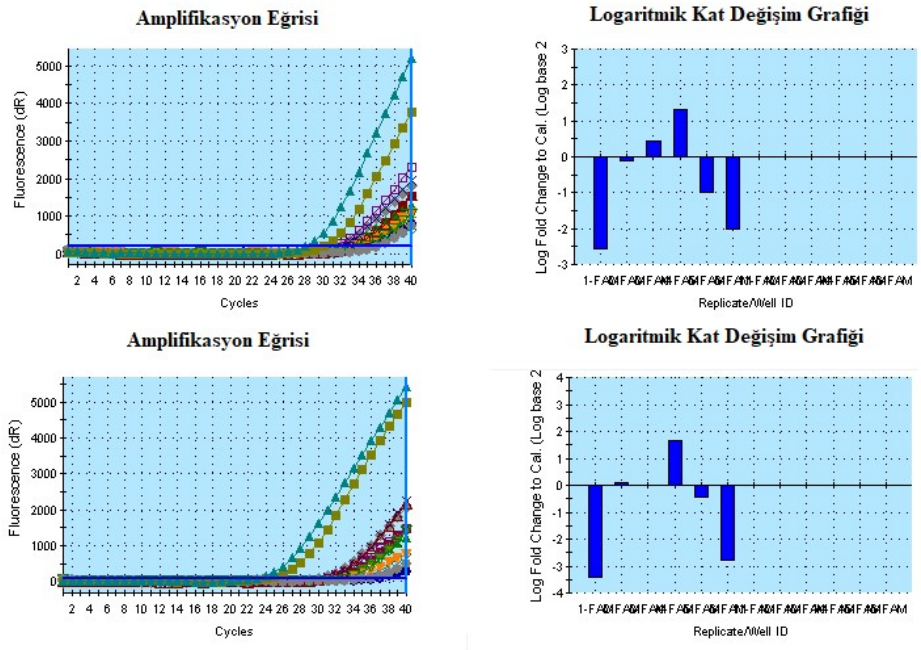
EOK hastalarının ve sağlıklı bireylerin kanlarından izole edilen RNA'ların konsantrasyonunu ölçmek için "Qubit 1.0 Florometer" cihazı kullanılmıştır. *"Qubit"* uygulamasında "*Qubit RNA High Sensivity Assay Kits"*de bulunan "*Qubit RNA HS Buffer"* ile hazırlanan 2 adet standart ile cihaz kalibrasyonu yapılmıştır. Kalibrasyondan sonra her bir örnek için 199 *µl* "*Qubit RNA HS Buffer"* ile 1 *µl* "*Qubit RNA HS Reagent"* karıştırılarak çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiden her bir örnek için 198 *µl* alınarak steril *"Qubit"* tüpüne koyularak üzerine izole edilmiş RNA örneklerinden 2 *µl* alınarak karıştırılır ve ölçümler yapılır. Elde edilen serbest RNA konsantrasyonu 220-870 *ng/ml* aralığındadır. Tablo 4.10'da 10 sağlıklı ve 10 hastanın *"Qubit"* ölçümünden elde edilen konsantrasyon (*ng/ml*) değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.10: Sağlıklı bireylerin ve EOK hasta örneklerinin kantitite sonuçları.

	HASTA ÖRNEKLERİ	SAĞLIKLI ÖRNEKLERİ
1	682 *ng/ml*	640 *ng/ml*
2	720 *ng/ml*	760 *ng/ml*
3	870 *ng/ml*	468 *ng/ml*
4	840 *ng/ml*	600 *ng/ml*
5	770 *ng/ml*	489 *ng/ml*
6	740 *ng/ml*	640 *ng/ml*
7	220 *ng/ml*	520 *ng/ml*
8	690 *ng/ml*	486 *ng/ml*
9	660 *ng/ml*	495 *ng/ml*
10	640 *ng/ml*	710 *ng/ml*

4.3.2. Anlatım Analizi Sonuçları

hmga2 geninin anlatımının belirlenmesine yönelik yapılan qpcr çalışmasında referans *"housekeeping"* gen olarak *gapdh* kullanılmıştır. Hasta ve sağlıklı örneklerde *gapdh* geninin anlatım verileri ile normalizasyon işlemi tamamlandıktan sonra C_t değerleri $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile rölatif olarak değerlendirilerek anlatım katsayıları belirlenmiştir. *hmga2* geninin anlatım miktarı rölatif olarak hesaplanmıştır (p= 0,0007). Yapılan qPCR çalışması iki defa tekrarlanmıştır. Her iki denemedeki *hmga2* geninin qPCR'daki C_t değerlerini gösteren amplifikasyon eğrileri ve logaritmik kat değişimleri grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir. EOK hastalarında anlatımı azalmış olarak bulunan hsa-let-7d-3p'nin hedef genlerinden biri olan *hmga2* geninin anlatımında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir.



Şekil 4.9: *hmga2* geninin amplifikasyon eğrileri ve logaritmik kat değişim grafikleri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Over kanseri jinekolojik kanserler içinde en ölümcül ve en yaygın olan kanser türlerinden biridir (Gasparri ve diğ., 2017). Over kanserinin erken teşhisi klinikte büyük önem taşımaktadır. Erken evrede tanı koyulduğunda ve kanserin yayılımı overle sınırlı olduğu durumda, over kanseri hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı %90'ı geçmektedir (Retamales-Ortega ve diğ., 2017; Nakamura ve diğ., 2016). Spesifik semptomların ve erken tanı için güvenilir bir yöntemin olmamasından dolayı, hastalığın tanısı kanserin overlerin dışına yayıldığı geç evrelerde koyulabilmektedir (Srivastava, 2017).

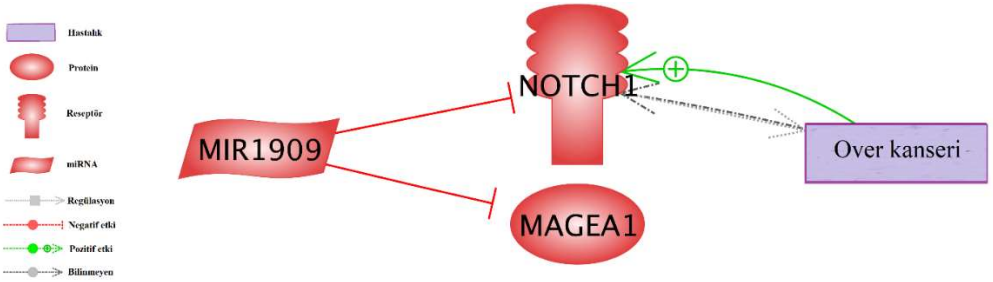
Overin yüzey epitelinden köken alan EOK, over kanseri türlerinin %90'lık kısmını oluşturur (Retamales-Ortega ve diğ., 2017). EOK'un tanısında; serum protein biyomarkırı olan CA-125 *"Cancer antigen 125"* testi ile transvajinal ultrason (TVS), manyetik rezonans görüntüleme (MR) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak tanı için kullanılan bu yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür (Srivastava, 2017). Bu yüzden over kanserinin erken tanısı için kullanılabilecek, yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren biyomarkırların tanımlanması önemlidir. Biyomarkır, normal bir fizyolojik durumun patolojik bir durumdan ayırt edilmesini sağlayan veya terapötik müdahaleye karşı oluşturulan moleküllerdir (Srivastava, 2017). Erken kanser tanısı için tümör tipine özgül olan veya tümör spesifik immun biyomarkırlar kolayca vücut sıvılarında tespit edilebilmektedir. Over kanserinin erken tanısı için protein, metabolit ve gen temelli biyomarkırlar kullanılabilmektedir (Zhang ve diğ., 2011).

MiRNA'lar hücre çoğalmasında, farklılaşmasında ve hücre döngüsünde düzenleyici rol oynayan yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, yüksek derecede korunmuş RNA molekülleridir. İnsan gen anlatımlarının üçte birinden fazlası miRNA molekülleri tarafından düzenlenir ve her miRNA birden fazla genin anlatımının düzenlenmesinde etkili olabilir (Pritchard ve diğ., 2012). Yapılan çalışmalar, bazı miRNA'ların hedef genine göre değişen farklı fonksiyonları olduğunu göstermiştir. Kanser gelişiminde önemli rol oynayan iki farklı fonksiyona sahip miRNA tipi vardır: Tümör baskılayıcı miRNA'lar *"tumor supressor miRs"* ve onkogenik miRNA'lar *"oncomiRs"* (Dong ve diğ., 2013). Her iki tipteki miRNA'nın hedef mRNA'yı regüle etmesindeki hata, tümör hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu, epitelyal mezenkimal geçişini (EMT) ve metastazını etkiler (Yanokura ve diğ., 2015).

Iorio ve diğ. (2007) over kanserinde miRNA'lar ile ilk çalışan araştırmacılardır. Iorio ve ekibi over karsinom dokuları ile normal over dokusunda farklı anlatım analizlerini karşılaştırmıştır. Karsinomalarda anlatımları artan miR-141, miR-200a, miR-200b ve miR-200c; anlatımları azalan miR-125b1, miR-140, miR-145 ve miR-199a'yı tespit etmişlerdir. Over kanseri teşhisi, prognozu ve tedavisindeki potansiyel rolüyle ilgili birçok çalışmada sağlıklı bireyler ile over kanseri hastalarının miRNA profilleri arasındaki farklılıklar belirlenmiştir. Over kanserinde en sık tanımlanan miRNA aileleri; miR-200 ve let-7'dir (Prahm ve diğ., 2016; Iorio ve diğ., 2007; Srivastava, 2017).

EOK hastalarının serumları ve aynı yaş aralığındaki sağlıklı bireylerin serum örnekleri ile yapılan mikrodizilim sonucunda anlatım farklılığı saptanan 4 aday miRNA'nın (hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-548am-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-let-7d-3p) biyomarkır potansiyelleri İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) destekli öncelikli alan projesi *(Proje No: 51472)* ve Yüksek Lisans tez projesi *(Proje No: 47803)* kapsamında araştırılmıştır. Mikrodizilim verileri, 4 miRNA'nın over kanseri hastalarının serumlarında anlatımın önemli derecede azaldığını göstermiştir ($p<0.05$) (Gümüşoğlu, 2016, Yüksek Lisans Tezi). Mikrodizilim sonucunda elde edilen miRNA'ların qPCR yöntemi ile validasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarla sağlıklı bireylere göre EOK hastalarında miRNA'ların anlatım düzeylerinde anlamlı miktarda azalma olduğu doğrulanmıştır.

Tez kapsamında qPCR tekniği ile validasyonu yapılan hsa-miR-1909-5p'nin EOK hasta serumlarında sağlıklı kontrollere göre anlatımının azaldığı tespit edilmiştir (AUC=0,68). *"Pathway Studio"* ile miRNA'ların düzenlediği genlerin ve bu genlerin yer aldığı biyolojik yolakların incelenmesi sonucu hsa-miR-1909-5p'nin; *notch1 "neurogenic locus notch homolog protein 1"* ve *mage-a1 "melanoma antigen family a, 1*" genlerini hedeflediği tespit edilmiştir (Şekil 5.1).

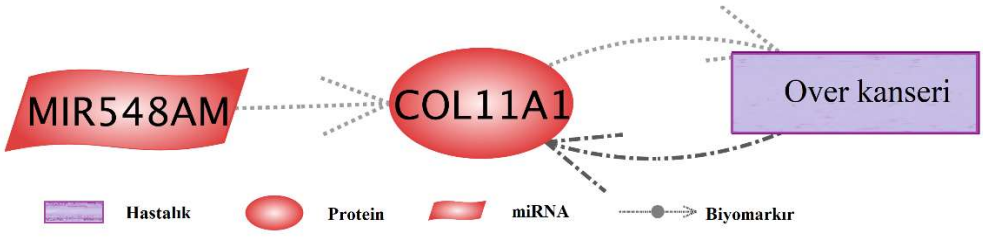


Şekil 5.1: *"Pathway Studio"* ile hsa-miR-1909-5p'nin hedeflediği genler.

Hsa-miR-1909-5p'nin hedef genlerinden biri olan *notch1* geninin pankreas, meme, servikal ve renal kanser türlerinde onkogen olarak rol oynadığı bulunmuştur. Notch sinyal yolağının da epitelyal over tümörü büyümesinde, endotel hücre fonksiyonunda ve seröz over tümörlerinin anjiyogenezinde etkili olduğu belirtilmiştir (Groeneweg ve diğ., 2014). Over tümörleri, yüksek miktardaki NOTCH1 proteini ile de karakterizedir ve genin anlatımı FIGO evresiyle orantılır. (Yağcı ve Güneş, 2017). Tez kapsamında, EOK hasta serumlarında anlatımı azalan hsa-miR-1909-5p ile over kanserinde anlatımı artan *notch1* geni ile arasında negatif regülasyon olabileceği düşünülmektedir. Anlatımı azalan hsa-mir-1909-5p, *notch1* genini baskılayamadığı için kanserleşme sürecinde rol oynadığı ileri sürülebilir.

Hsa-miR-1909-5p'nin diğer hedef genlerinden olan *mage-a1*, kanser-testis antijenleri (CTA) *"Cancer Testis Antigen"* sınıfındadır. *mage* gen ailesinin spermatositlerde (nadiren plasentada) anlatımı normal seviyededir ve vücudun diğer bölgelerindeki anlatımı t lenfositlerin aktivasyonuna sebep olur. *mage-a1* geninin anlatımı sarkom, renal karsinom, rabdomiyosarkom, melanom ve kondrosarkom hücre hatlarında arttığı tespit edilmiştir (Xiao ve diğ., 2005, Galoian ve diğ., 2014). Araştırmamız kapsamında EOK hasta serumlarında hsa-miR-1909-5p'nin anlatımının azalması *mage-a1* geninin anlatımının artmasına neden olarak kanserleşme sürecinde rol oynadığı ileri sürülebilir.

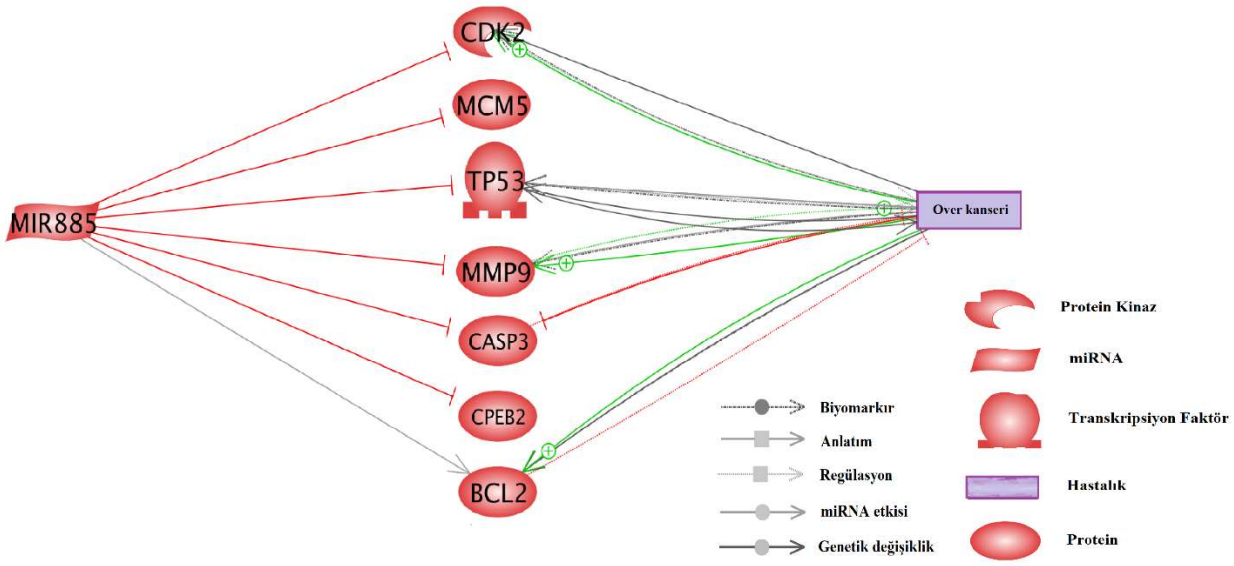
Araştırma kapsamında yapılan validasyonlar sonucu EOK hasta serumlarında hsa-miR-548am-5p'nin anlatımının azaldığı bulunmuştur (AUC=0,61). *"Pathway Studio"* ile miRNA'ların düzenlediği genlerin ve bu genlerin yer aldığı biyolojik yolakların incelenmesi sonucu hsa-miR-548am-5p'nin *col11a1 "collagen type xı alpha 1 chain"* genini hedeflediği tespit edilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2: *"Pathway Studio"* ile hsa-miR-548am-5p'nin hedeflediği genler.

Liu ve diğerleri, miR-548 ailesinin insanda kanser gelişiminde rol oynadığını ve bazı aile üyelerinin tümör hücresi büyümesinin inhibisyonuna katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir. Erken evredeki kolon adenokarsinoma hastalarının doku örneklerinde yaptıkları çalışma sonucu, hsa-miR-548am-5p'nin anlatımının hasta örneklerinde azaldığını tespit etmişlerdir. Çalışmalarında anlatımı azalan hsa-miR-548am-5p, *col11a1* genini anlatımının baskılayamadığını, dolasıyla genin anlatımı arttığını bulmuşlardır (Liu ve diğ., 2017). *col11a1*, ekstraselüller matriksin ana bileşeni olan kollajen ailesine ait olan kollajen tip XI alfa 1'i kodlar. *col11a1* geninin hücre proliferasyonuyla, tümör oluşumunun, ilerlemesinin ve metastazının düzenlenmesinde etkili olduğu belirtilmiştir. Akciğer, over, pankreas ve kolon kanserlerinde bu genin anlatımının arttığını vurgulamışlardır (Simon ve diğ., 2015). Tez kapsamında anlatımı azalmış olarak bulunan hsa-miR-548am-5p'nin, *col11a1* geninin anlatımını baskılayamadığı için anlatımını arttırarak over kanseri gelişiminde rol oynadığı düşünülebilir.

Validasyon sonucu EOK hasta serumlarında hsa-miR-885-5p'nin anlatımının sağlıklı kontrollere göre azaldığı tespit edilmiştir (AUC=0,70). *"Pathway Studio"* ile miRNA'ların düzenlediği genlerin ve bu genlerin yer aldığı biyolojik yolakların incelenmesi sonucu hsa-miR-885-5p'nin; *cdk2 "cyclin-dependent kinase"*, *mcm5 "mini-chromosome maintenance protein"*, *tp53 "tumor protein p53"*, *mmp-9 "matrix metallopeptidase 9"*, *casp-3 "caspase 3"*, *cpeb2 "cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2"* ve *bcl-2 "b-cell lymphoma 2"* genlerini hedeflediği tespit edilmiştir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3: *"Pathway Studio"* ile hsa-miR-885-5p'nin hedeflediği genler.

Sandrim ve diğerleri tarafından preeklampsi hastalarının plazmalarında hsa-miR-885-5p'nin, hedef genlerinden *cdk2* ve *mcm5*'in anlatımlarını azaltarak hücre döngüsünü inhibe ettiği, hücresel yaşlanmayı ve apoptozu arttırdığı belirtilmiştir (Sandrim ve diğ., 2016; Hussein ve diğ., 2017). *mcm5* geninin DNA replikasyonunda etkili olan bir gen olduğu ve anlatımının EOK evresiyle doğru orantılı olarak arttığı bildirilmiştir (Gakiopoulou ve diğ., 2007). *cdk2* geninin ise anlatımının over kanserinde arttığını ve bu anlatım artışının over tümörlerinin gelişiminde etkili olduğu Marone ve diğerleri tarafından belirtilmiştir (Marone ve diğ., 1998). Tez kapsamında, EOK hasta serumlarında anlatımı azalan hsa-miR-885-5p, apoptoz sürecinde etkili olan *cdk2* ve *mcm* genlerini yeterince baskılayamadığı için kanserleşme sürecinde rol oynadığı düşünülebilir.

hsa-mir-885-5p'nin diğer bir hedef geni olan tümör baskılayıcı *tp53* genindeki mutasyonlar over kanserinde tümör başlangıcını tetiklediği vurgulanmıştır. Normal seviyedeki hsa-miR-885-5p'nin anlatımı, *tp53* geninin anlatımını arttırarak tümör oluşumunu engellediği bilinmektedir (Afanasyeva ve diğ., 2011). Hsa-miR-885-5p anlatımının artması, *tp53*'e bağlı hücre döngüsünü inhibe ederek hücre proliferasyonunu ve sağkalımını engellediğini, ayrıca apoptozu indükleyerek bir tümör baskılayıcı fonksiyona sahip olduğu belirtilmiştir (Hussein ve diğ., 2017; Afanasyeva ve diğ., 2011). Çalışmamızda anlatımı azalan hsa-miR-885-5p, *tp53* geninin yeterli miktarda anlatımını gerçekleşmediği ve böylece tümör baskılayıcı fonksiyonunu yerine getiremediği düşünülebilir.

Hsa-miR-885-5p'nin hedeflediği genlerden biri olan *mmp-9* geninin over kanserinin prognozu ve invazyonu ile tekrarlanmasından sorumlu olduğu, Hu ve diğerleri tarafından belirtilmiştir. qPCR ile yapılan validasyon sonucunda *mmp-9* geninin biyomarkır olarak belirlenebileceğini, çalışmamızda anlatımı azalan hsa-miR-885-5p'nin *mmp-9* geninin anlatımının artmasına neden olduğunu ve regüle ettiğini destekleyen çalışmadır (Hu ve diğ., 2012). *mmp* gen ailesi tümör invazyonunda ve metastazında etkili olduğu ve birçok kanser türüyle ilişkisi tespit edilmiştir. *mmp-9* geninin anlatımı, over kanserinde farklılaşma derecesi, FIGO evresi ve metastaz fazı ile korelasyon gösterdiği ve artan *mmp-9* anlatımı over kanserinin kötü prognozu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Zhang ve Chen, 2017). Tez kapsamında anlatımı EOK hastalarında azalmış olarak bulduğumuz hsa-miR-1909-5p ile *mmp-9* geninin anlatımı arasında negatif korelasyon olduğu ileri sürülebilir.

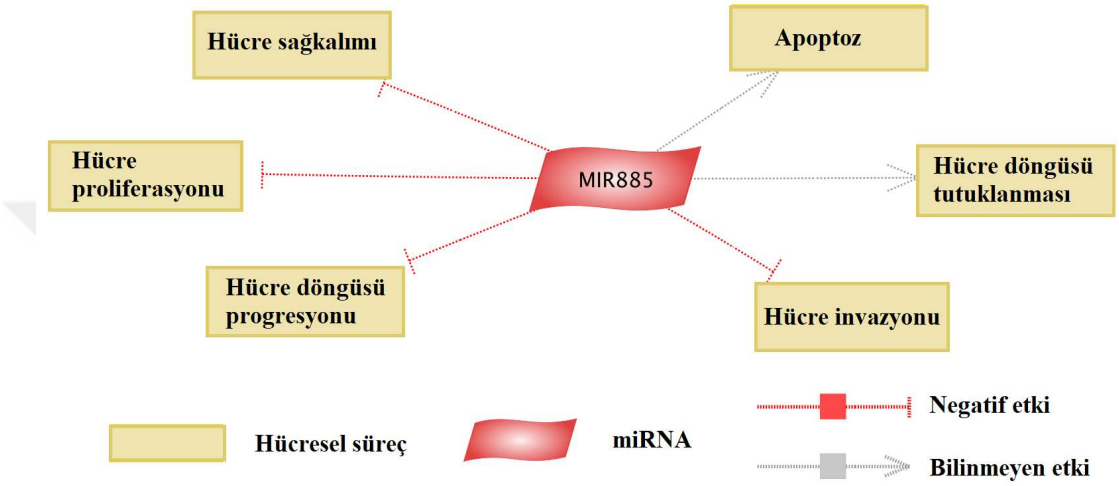
Hsa-miR-885-5p'nin diğer bir hedef geni olan *casp-3* apoptoz sürecinde görev alan bir gendir. Hussein ve diğerleri, hsa-miR-885-5p'nin anlatımının artması, *casp-3* geninin anlatımını azaltarak, hücre invazyonunu inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Pankreas kanserinde hsa-miR-885-5p'nin aşırı anlatımı; tümör büyümesinin, anjiyogenezin ve metastazın inhibisyonuna neden olduğu tespit etmişlerdir. (Hussein ve diğ., 2017). Pankreas kanserinin oluşumunda hsa-miR-885-5p'nin anlatımını arttırarak *casp-3* genini inhibe etmesine rağmen, over kanserinde hsa-mir-885-5p'nin anlatımı azalarak *casp-3* geninin anlatımını azaltığı düşünülmektedir. Bu genin EOK hasta serumlarındaki anlatım analiziyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Hsa-miR-885-5p, *cpeb2* geninin 3'UTR bölgesindeki iki bağlanma bölgesini (CPEB2-1 ve CPEB2-2) hedefleyerek transkripsiyonunu baskılar ve tümör süpresör fonksiyonunu kaybederek kolorektal kanserin metastatik potansiyelini indüklediği Lam ve diğerleri tarafından belirtilmiştir. Karaciğer metastaz hücre hatlarında hsa-miR-885-5p'nin aşırı anlatımı; hücre göçünü, hücre invazyonunu ve karaciğer, akciğer metastazlarının gelişimini önemli ölçüde uyarmıştır. (Lam ve diğ., 2017). Tez kapsamında tespit edilen hsa-miR-885-5p'nin anlatımının azalması, *CPEB2* anlatımını arttırarak metastaz sürecinde etkili olduğu düşünülebilir.

Hsa-miR-885-5p'in hedef genlerinden biri de *bcl-2* genidir. Nöron benzeri hücrelerde hsa-miR-885-5p'nin anlatımının azalması, *bcl-2* geninin anlatımını arttırarak apoptoz aktivitesinin azalmasına yol açtığı gösterilmiş ve over kanserinde *bcl-2* geninin otofajik aktivitesi ile tümör gelişimini baskılayabildiği tanımlanmıştır (Huat ve diğ., 2015, Mizushima ve diğ., 2005). Yapılan çalışmalar sonucu göz önüne alınarak, hsa-miR-885-5p'nin anlatımının azalması *bcl-*

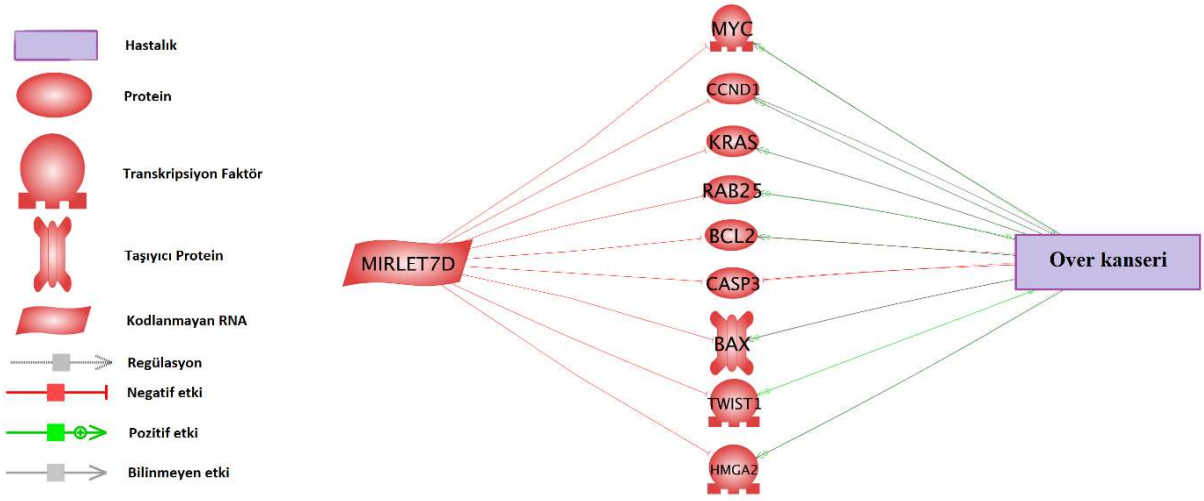
2 geninin anlatımının artmasına neden olduğu ve apoptoz aktivesini azaltarak over kanserinin oluşmasında etkili olduğu düşünülebilir.

"Pathway Studio" aracılığıyla yapılan analizler ile tespit edilen hsa-miR-885-5p'nin etkili olduğu yolaklar; apoptoz, hücre döngüsünün inhibe edilmesi, hücre invazyonu, hücre döngüsü progresyonu, hücre proliferasyonu ve hücre sağkalımıdır (Şekil 5.4).



Şekil 5.4: *"Pathway Studio"* ile hsa-miR-885-5p'nin katıldığı biyolojik yolaklar.

Tez kapsamında qPCR tekniği ile validasyonu yapılan hsa-let-7d-3p'nin EOK hasta serumlarında sağlıklı kontrollere göre anlatımının azaldığı tespit edilmiştir (AUC=0,61). *"Pathway Studio"* ile miRNA'ların düzenlediği genlerin ve bu genlerin yer aldığı biyolojik yolakların incelenmesi sonucu hsa-let-7d-3p'nin hedef genleri *c-myc "myc proto-oncogene", ccdn1 "cyclin d1", kras "kirsten rat sarcoma viral proto-oncogene", rab25" ras-related protein rab-25", bcl-2, casp3, bax "bcl-2 associated x", twıst1* ve *hmga2 "high mobility group at-hook 2"* olarak belirlenmiştir (Şekil 5.5).



Şekil 5.5: *"Pathway Studio"* ile hsa-let-7d-3p'nin hedeflediği genler.

Let-7d'nin hedef genlerinden biri olan *c-myc* geni proto-onkogendir. Ning ve diğerleri, *c-myc* geninin let-7d'nin doğrudan bir hedefi olduğu doğrulamışlardır. *c-myc* proto-onkogeninin, hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenlediğini ve transkripsiyonel aktivasyonu nedeniyle over kanserinde sıklıkla anlatımı arttığı belirtilmiştir (Ning ve diğ., 2017). Araştırma sonucunda anlatımı EOK hastalarında azalmış olarak bulduğumuz hsa-let-7d-3p ile *c-Myc* geninin anlatımı arasında negatif korelasyon olduğu düşünülebilir.

Let-7d'nin diğer bir hedef geni *ccdn1*'dir. Sun ve diğerleri, let-7d'nin, *ccdn1*'in 3'UTR bölgesini doğrudan anlatımını inhibe ettiğini ve böylece siklin D1 / Akt1 / Wnt1 aktivitesini baskıladığını gözlemlemişlerdir (Sun ve diğ., 2016). Hücre siklusunda rol oynayan *ccdn1*'in, over kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde anlatımı artar (Huang ve diğ, 2011). Araştırmamızda anlatımı azalmış let-7d, *ccdn1* geninin anlatımını baskılayamadığı için, anlatımı arttırarak tümör oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülebilir.

Bir proto-onkogen olan *kras*, hsa-let-7d-3p'nin diğer bir hedef genidir. Choi ve diğerleri, over kanserinde hücre proliferasyonunda önemli rolü olan *kras* geninin anlatımının arttığını saptamışlardır. (Choi ve diğ., 2004). Choo ve diğerleri, let-7d'nin *kras* geninin anlatımını negatif olarak etkilediğini sonuç olarak kanser gelişiminde etkili olduğunu göstermişlerdir (Choo ve diğ., 2015). Araştırmamız kapsamında anlatımı azalan hsa-let-7d-3p'nin bir onkogen olan *kras* geninin anlatımını baskılayamadığı için, EOK hastalarında anlatımı arttığı ve bu artışın da kanser gelişiminde önemli bir rol oynadığı ileri sürülebilir.

Hsa-let-7d-3p'nin hedef genlerinden biri de *rab25* genidir. Li ve diğerleri, *rab25* geninin let-7d'nin bir hedef geni olduğunu ve renal hücreli karsinomda let-7d anlatımının azalmasıyla, *rab25*'in anlatımının arttığını ileri sürmüşlerdir (Li ve diğ., 2015). Meme ve over kanserinde sıklıkla anlatımı artan *rab25* tümör oluşumunda proliferasyonu ve apoptotik direnci arttırır (Zhang ve diğ., 2009). Tez kapsamında anlatımı azalan hsa-let-7d-3p, *rab25* geninin anlatımını baskılayamadığından dolayı kanserleşme süresince etkili olduğu düşünülebilir.

Hsa-let-7d-3p'nin hedef genlerinden biri olan *bcl-2* genidir. Jiao ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada, pankreatik duktal adenokarsinomada anlatımını azalmış olarak buldukları let-7d'nin *bcl-2* genini hedeflediği belirtilmiştir (Jiao ve diğ., 2012). *bcl-2* geni over kanseri patogenezinde rol oynar ve anlatımının artması apoptotik inhibisyona ve ilaç direncinin gelişimine neden olur (Yuan ve diğ., 2011). Çalışma sonuçlarımızda anlatımı azalmış olarak bulunan hsa-let-7d-3p'nin *bcl-2* geninin anlatımını arttırarak, over tümörlerinin gelişiminde ve ilerlemesinde rol aldığı düşünülebilir.

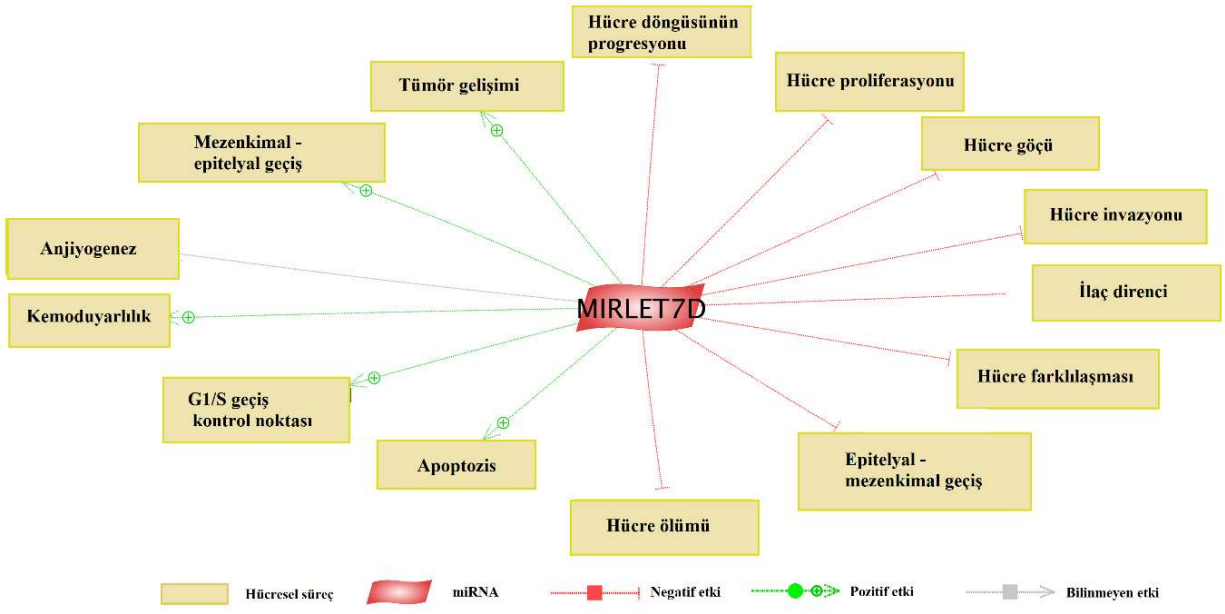
Hsa-let-7d-3p'nin hedef genlerinden olan *casp-3* genidir. Let-7d aile üyelerinin, *casp-3*'ün 3'UTR bölgesini hedef alarak anti-apoptotik aktiviteye neden olduğunu belirtilmiştir (Honegger ve diğ., 2015). Over kanserinde hsa-let-7d-3p'nin anlatımı azalarak, *casp-3* geninin anlatımını arttırdığı, dolasıyla tümör büyümesine ve ilerlemesine neden olabileceği düşünülebilir.

bcl-2 gen ailesine ait *bax* geni hsa-let-7d-3p'nin diğer bir hedef genidir. *bax* geni anti-apoptotik aktiveye neden olmaktadır (Krug ve diğ., 2013). Liang ve diğerleri yaptıkları çalışmada, let-7d'nin akut promiyelositik lösemi hücre hatlarına transfeksiyonu ile *bax* geninin anlatımını azaltmışlardır. Let-7d'nin *bax* geninin regülasyonunu sağladığı ve disregülasyonunda ise anti-apoptotik etkiye neden olduğu belirtilmiştir (Liang ve diğ., 2013). Tez kapsamında anlatımı azalan let-7d'nin *bax* geninin anlatımının arttırarak kanser gelişiminde etkili bir rol oynayabileceği ileri sürülebilir.

Diğer bir hedef gen olan *twıst1* geni, EMT yolağında etkili olarak metastazda rol oynar. Chang ve diğerleri, let-7d'nin over kanserinde anlatımı artan ve kanserin metastaza uğramasında rol oynayan *twıst1* geninin anlatımını negatif olarak regüle ettiğini göstermiştir (Chang ve diğ., 2011). Çalışmamız kapsamında anlatımı azalan hsa-let-7d-3p'nin *twıst1* geninin anlatımını arttırarak metastaz riskini arttırdığı düşünülebilir.

Hsa-let-7d-3p'nin hedef genlerinden biri de *hmga2* genidir. Chang ve diğerleri, let-7 ailesinin over kanserinde onkogenik aktivitesi olan *hmga2* hedefleyerek, bir tümör baskılayıcı görevi olduğunu vurgulamışlardır. Yaptıkları çalışmada, oral skuamöz hücreli karsinomada let-7d'nin anlatımının azaldığını tespit etmişlerdir (Chang ve diğ., 2011). Oral skuamöz hücreli kanser durumunda anlatımı azalmış olan let-7d, bizim sonuçlarımızla paralellik göstermiştir. Çalışma kapsamında belirtilen let-7d'nin hedef genlerinden birinin *hmga2* geninin analizi sonuçlarımızla ve proje amacımızla uyumludur.

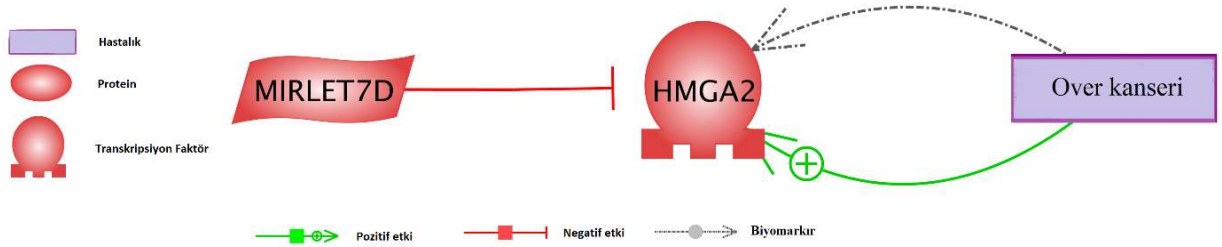
"Pathway Studio" aracılığıyla yapılan analizler ile tespit edilen hsa-let-7d-3p'nin etkili olduğu yolaklar; hücre döngüsünün progresyonu, hücre proliferasyonu, hücre göç, hücre invazyonu, ilaç direnci, hücre farklılaşması, EMT, hücre ölümü, apoptoz, G1/S geçiş kontrol noktası, kemoduyarlılık, anjiyogenez, mezenkimal-epitelyal geçiş ve tümör gelişimidir (Şekil 5.6).



Şekil 5.6: *"Pathway Studio"* ile hsa-let-7d-3p'nin katıldığı biyolojik yolaklar.

Tez kapsamında validasyonu yapılan miRNA hsa-let-7d'3p'nin hedef genlerinden olan *hmga2* geninin anlatım analizi qPCR ile yapılmıştır (Şekil 5.7). *hmga2* histon olmayan DNA bağlanma faktörüdür ve DNA heliksinin A-T'ce zengin bölgelerinden, minör oyuklarına bağlanır. Yapılan çalışmalarda, onkofetal bir protein olan bu genin over kanserinde anlatımının arttığı görülmüştür (Mahajan ve diğ., 2010). Embriyonik dokularda anlatımı yapılan bu gen, hücre büyümesi, farklılaşma, apoptoz ve malignant transformasyonu gibi süreçlerde önemli bir regülatör olduğu belirtilmiştir (Rogalla ve diğ., 1996; Mahajan ve diğ, 2010). Memeli

gelişiminin ilerleyen aşamalarında anlatımı yapılan hsa-let-7d-3p'nin regülasyonunun etkilenmesi sonucu, *hmga2*'nin onkogenik transformasyona yol açabileceği düşünülmektedir (Mayr ve diğ., 2007). Let-7d, *hmga-2* geninin anlatımını azaltarak idiyopatik pulmoner fibrozis (Pandit ve diğ., 2010) ve solunum sistemi hastalıklarında (Booton ve Lindsay, 2014) rol oynadığı saptanmıştır. EOK hastalarında anlatımı azalmış olarak bulunan hsa-let-7d-3p'nin hedef genlerinden biri olan *hmga2* geninin anlatımında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. *hmga2* genindeki anlatım değişikliği EOK oluşumunda bir rol oynayabileceği ileri sürülebilir.



Şekil 5.7: *"Pathway Studio"* aracılığıyla hsa-let-7d-3p ile *hmga2* geninin regülasyonu.

Araştırma kapsamında anlatım profilleri incelenen miRNA'lar (hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-548am-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-let-7d-3p) EOK hastalarında kullanılabilecek prognostik ve tanı için potansiyel yeni bir biyomarkır özelliği taşımaktadır. Tez kapsamında anlatımı azalmış olarak bulunan miRNA'ların EOK ile ilişkisi gösterilmiştir. Biyoinformatik analizlerle ve ilgili yolak analizleriyle bulgularımızın doğruluğu belirlenmiştir. Bu aday biyomarkırların olası rollerinin gösterilmesi hastalığın aydınlatılmasında önemli olacaktır. Jinekolojik kanserlerde ölüm oranı en fazla olan EOK tanısında biyomarkır olarak saptamaya çalıştığımız miRNA'lar literatüre katkı sağlayacaktır. İleri çalışmalarla validasyonu yapılan miRNA'ların, gen hedefleri, bu genlerin protein ürünleri ve yolaklardaki görevleri incelenerek erken tanı panellerine dahil edilmesi sağlanacaktır.

KAYNAKLAR

Afanasyeva, E. A., Mestdagh, P., Kumps, C., Vandesompele, J., Ehemann, V., Theissen, J., Fischer, M., Zapatka, M., Brors, B., Savelyeva, L., Sagulenko, V., Speleman, F., Schwab, M. & Westermann, F. 2011. MicroRNA miR-885-5p targets CDK2 and MCM5, activates p53 and inhibits proliferation and survival. *Cell Death Differ*, 18, 974-84.

Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W. & Bartel, D. P. 2015. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife,* 4.

Agostini, A., Brunetti, M., Davidson, B., Trope, C. G., Heim, S., Panagopoulos, I. & Micci, F. 2017. Genomic imbalances are involved in miR-30c and let-7a deregulation in ovarian tumors: implications for HMGA2 expression. *Oncotarget,* 8**,** 21554-21560.

American Cancer Society, I. 2016. Cancer Facts & Figures 2016.

American Cancer Society, I. 2017. Tests for Ovarian Cancer [Online]. The American Cancer Society Available: https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html#written_by [Accessed 2017].

Bast, R. C., Hennessy, B. & Mills, G. B. 2009. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer,* 9(6): 415.

Booton, R. & Lindsay, M. A. 2014. Emerging role of MicroRNAs and long noncoding RNAs in respiratory disease. *Chest,* 146**,** 193-204.

Braoudaki, M., Lambrou, G. I., Papadodima, S. A., Stefanaki, K., Prodromou, N. & Kanavakis, E. 2016. MicroRNA expression profiles in pediatric dysembryoplastic neuroepithelial tumors. *Med Oncol,* 33**,** 5.

Boussios, S., Zarkavelis, G., Seraj, E., Zerdes, I., Tatsi, K. & Pentheroudakis, G. 2016. Non-epithelial Ovarian Cancer: Elucidating Uncommon Gynaecological Malignancies. *Anticancer Res,* 36**,** 5031-5042.

Boyerinas, B., Park, S. M., Murmann, A. E., Gwin, K., Montag, A. G., Zillhardt, M., Hua, Y. J., Lengyel, E. & Peter, M. E. 2012. Let-7 modulates acquired resistance of ovarian cancer to Taxanes via IMP-1-mediated stabilization of multidrug resistance 1. *Int J Cancer,* 130**,** 1787-97.

Cancer Research U.K. 2016. *Ovarian Cancer* [Online]. Cancer Research UK. Available: http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/ovarian-cancer?_ga=2.101923779.359707808.1494336305-793493008.1493717010 [Accessed].

Chang, C. J., Hsu, C. C., Chang, C. H., Tsai, L. L., Chang, Y. C., Lu, S. W., Yu, C. H., Huang, H. S., Wang, J. J., Tsai, C. H., Chou, M. Y., Yu, C. C. & Hu, F. W. 2011. Let-7d functions as novel regulator of epithelial-mesenchymal transition and chemoresistant property in oral cancer. *Oncol Rep,* 26**,** 1003-10.

Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J. & Guegler, K. J. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res,* 33**,** e179.

Cho, S., Mutlu, L., Grechukhina, O. & Taylor, H. S. 2015. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. *Fertil Steril,* 103**,** 1252-60 e1.

Choi, J. H., Choi, K. C., Auersperg, N. & Leung, P. C. 2004. Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor activates oncogenic pathways in preneoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab,* 89**,** 5508-16.

Choo, K. B., Soon, Y. L., Nguyen, P. N., Hiew, M. S. & Huang, C. J. 2014. MicroRNA-5p and -3p co-expression and cross-targeting in colon cancer cells. *J Biomed Sci,* 21**,** 95.

De Vasconcellos, J. F., Byrnes, C., Lee, Y. T., Allwardt, J. M., Kaushal, M., Rabel, A. & Miller, J. L. 2017. Tough decoy targeting of predominant let-7 miRNA species in adult human hematopoietic cells. *J Transl Med,* 15**,** 169.

Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H. & Zhang, X. 2013. MicroRNA: function, detection, and bioanalysis. *Chem Rev,* 113**,** 6207-33.

Dweep, H., Sticht, C. & Gretz, N. 2013. In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. *Curr Genomics,* 14**,** 127-36.

El Bairi, K., Kandhro, A. H., Gouri, A., Mahfoud, W., Louanjli, N., Saadani, B., Afqir, S. & Amrani, M. 2017. Emerging diagnostic, prognostic and therapeutic biomarkers for ovarian cancer. *Cell Oncol (Dordr),* 40**,** 105-118.

Elzek, M. A. & Rodland, K. D. 2015. Proteomics of ovarian cancer: functional insights and clinical applications. *Cancer Metastasis Rev,* 34**,** 83-96.

Fan, J. B. 2012. *Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology*, Humana Press.

Fan, L., Zhang, W., Yin, M., Zhang, T., Wu, X., Zhang, H., Sun, M., Li, Z., Hou, Y., Zhou, X., Lou, G. & Li, K. 2012. Identification of metabolic biomarkers to diagnose epithelial ovarian cancer using a UPLC/QTOF/MS platform. *Acta Oncol,* 51**,** 473-9.

Fischerova, D. & Cibula, D. 2015. Ultrasound in gynecological cancer: is it time for re-evaluation of its uses? *Curr Oncol Rep,* 17**,** 28.

Gajjar, K., Ogden, G., Mujahid, M. I. & Razvi, K. 2012. Symptoms and risk factors of ovarian cancer: a survey in primary care. *ISRN Obstet Gynecol,* 2012**,** 754197.

Galoian, K., Guettouche, T., Issac, B., Navarro, L. & Temple, H. T. 2014. Lost miRNA surveillance of Notch, IGFR pathway--road to sarcomagenesis. *Tumour Biol,* 35**,** 483-92.

Gasparri, M. L., Casorelli, A., Bardhi, E., Besharat, A. R., Savone, D., Ruscito, I., Farooqi, A. A., Papadia, A., Mueller, M. D., Ferretti, E. & Panici, P. B. 2017. Beyond circulating

microRNA biomarkers: Urinary microRNAs in ovarian and breast cancer. *Tumor Biology*.

Git, A., Dvinge, H., Salmon-Divon, M., Osborne, M., Kutter, C., Hadfield, J., Bertone, P. & Caldas, C. 2010. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA,* 16**,** 991-1006.

Gong, L., Wang, C., Gao, Y. & Wang, J. 2016. Decreased expression of microRNA-148a predicts poor prognosis in ovarian cancer and associates with tumor growth and metastasis. *Biomed Pharmacother,* 83**,** 58-63.

Groeneweg, J. W., Foster, R., Growdon, W. B., Verheijen, R. H. & Rueda, B. R. 2014. Notch signaling in serous ovarian cancer. *J Ovarian Res,* 7**,** 95.

Gunel, T. 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR". *Turkiye Klinikleri J Med Sci*.

Gunel, T., Hosseini, M. K., Gumusoglu, E., Dolekcap, I. & Aydinli, K. 2014. Future Perspective of Preeclampsia by miRNA *Global Journal of Human Genetics & Gene Therapy,* 2.

Günel, T., H, E. & Aydinli, K. 2012. Real-Time Quantitative PCR for Detection Cell Free Fetal DNA. *InTech,* 9.

Honegger, A., Schilling, D., Bastian, S., Sponagel, J., Kuryshev, V., Sultmann, H., Scheffner, M., Hoppe-Seyler, K. & Hoppe-Seyler, F. 2015. Dependence of intracellular and exosomal microRNAs on viral E6/E7 oncogene expression in HPV-positive tumor cells. *PLoS Pathog,* 11**,** e1004712.

Hu, X., Li, D., Zhang, W., Zhou, J., Tang, B. & Li, L. 2012. Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion. *Arch Gynecol Obstet,* 286**,** 1537-43.

Huang, Y. C., Hung, W. C., Chen, W. T., Jiang, W. H., Yu, H. S. & Chai, C. Y. 2011. Effects of MEK and DNMT inhibitors on arsenic-treated human uroepithelial cells in relation to Cyclin-D1 and p16. *Toxicol Lett,* 200**,** 59-66.

Huat, T. J., Khan, A. A., Abdullah, J. M., Idris, F. M. & Jaafar, H. 2015. MicroRNA Expression Profile of Neural Progenitor-Like Cells Derived from Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells under the Influence of IGF-1, bFGF and EGF. *Int J Mol Sci,* 16**,** 9693-718.

Hunn, J. & Rodriguez, G. C. 2012. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clinical obstetrics and gynecology,* 55**,** 3-23.

Hussein, N. A., Kholy, Z. A., Anwar, M. M., Ahmad, M. A. & Ahmad, S. M. 2017. Plasma miR-22-3p, miR-642b-3p and miR-885-5p as diagnostic biomarkers for pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol,* 143**,** 83-93.

Iorio, M.V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C.G., Alder, H., Calin, G.A., Me´nard, S., Croce, C.M., 2007, MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer, Cancer Res, 67(18), 8699-8707.

Jiao, L. R., Frampton, A. E., Jacob, J., Pellegrino, L., Krell, J., Giamas, G., Tsim, N., Vlavianos, P., Cohen, P., Ahmad, R., Keller, A., Habib, N. A., Stebbing, J. & Castellano, L. 2012. MicroRNAs targeting oncogenes are down-regulated in pancreatic malignant transformation from benign tumors. *PLoS One,* 7**,** e32068.

Karlan, B. Y., Alvarez, R. D. & Strauss, J. F. (eds.) 2016. *Ovarian Cancers: Evolving Paradigms in Research and Care,* Washington (DC).

Kolenda, T., Przybyla, W., Teresiak, A., Mackiewicz, A. & Lamperska, K. M. 2014. The mystery of let-7d - a small RNA with great power. *Contemp Oncol (Pozn),* 18**,** 293-301.

Krug, L. M., Miller, V. A., Filippa, D. A., Venkatraman, E., Ng, K. K. & Kris, M. G. 2003. Bcl-2 and bax expression in advanced non-small cell lung cancer: lack of correlation with chemotherapy response or survival in patients treated with docetaxel plus vinorelbine. *Lung Cancer,* 39**,** 139-43.

Lam, C. S., Ng, L., Chow, A. K., Wan, T. M., Yau, S., Cheng, N. S., Wong, S. K., Man, J. H., Lo, O. S., Foo, D. C., Poon, J. T., Pang, R. W. & Law, W. L. 2017. Identification of microRNA 885-5p as a novel regulator of tumor metastasis by targeting CPEB2 in colorectal cancer. *Oncotarget,* 8**,** 26858-26870.

Lee, J. Y., Kim, H. S., Suh, D. H., Kim, M. K., Chung, H. H. & Song, Y. S. 2013. Ovarian cancer biomarker discovery based on genomic approaches. *J Cancer Prev,* 18**,** 298-312.

Li, Y., Jia, Q., Zhang, Q. & Wan, Y. 2015. Rab25 upregulation correlates with the proliferation, migration, and invasion of renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun,* 458**,** 745-50.

Li, Z. & Rana, T. M. 2014. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov,* 13**,** 622-38.

Liang, T., Guo, L. & Liu, C. 2012. Genome-wide analysis of mir-548 gene family reveals evolutionary and functional implications. *J Biomed Biotechnol,* 2012**,** 679563.

Liu, J., Liu, F., Li, X., Song, X., Zhou, L. & Jie, J. 2017. Screening key genes and miRNAs in early-stage colon adenocarcinoma by RNA-sequencing. *Tumour Biol,* 39**,** 1010428317714899.

Mahajan, A., Liu, Z., Gellert, L., Zou, X., Yang, G., Lee, P., Yang, X. & Wei, J. J. 2010. HMGA2: a biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma. *Mod Pathol,* 23**,** 673-81.

Marone, M., Scambia, G., Giannitelli, C., Ferrandina, G., Masciullo, V., Bellacosa, A., Benedetti-Panici, P. & Mancuso, S. 1998. Analysis of cyclin E and CDK2 in ovarian cancer: gene amplification and RNA overexpression. *Int J Cancer,* 75**,** 34-9.

Mayr, C., Hemann, M. T. & Bartel, D. P. 2007. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science,* 315**,** 1576-9.

Meinhold-Heerlein, I., Fotopoulou, C., Harter, P., Kurzeder, C., Mustea, A., Wimberger, P., Hauptmann, S. & Sehouli, J. 2016. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet,* 293**,** 695-700.

Miranda, A. M. & Schnatz, R. H. 2017. Ovary Anatomy [Online]. Medscape. Available: https://emedicine.medscape.com/article/1949171-overview#a1 [Accessed 22.10.2017 2017].

Mizushima, N. 2005. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ,* 12 Suppl 2**,** 1535-41

Nagpal, M., Singh, S., Singh, P., Chauhan, P. & Zaidi, M. A. 2016. Tumor markers: A diagnostic tool. *Natl J Maxillofac Surg,* 7**,** 17-20.

Nakamura, K., Sawada, K., Yoshimura, A., Kinose, Y., Nakatsuka, E. & Kimura, T. 2016. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in ovarian cancer. *Mol Cancer,* 15**,** 48.

Ning, Y. X., Luo, X., Xu, M., Feng, X. & Wang, J. 2017. Let-7d increases ovarian cancer cell sensitivity to a genistein analog by targeting c-Myc. *Oncotarget,* 8**,** 74836-74845.

Nguyen, L., Cardenas-Goicoechea, S. J., Gordon, P., Curtin, C., Momeni, M., Chuang, L. & Fishman, D. 2013. Biomarkers for early detection of ovarian cancer. *Womens Health (Lond),* 9**,** 171-85; quiz 186-7.

Okumura, T., Kojima, H., Miwa, T., Sekine, S., Hashimoto, I., Hojo, S., Nagata, T. & Shimada, Y. 2016. The expression of microRNA 574-3p as a predictor of postoperative outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol,* 14**,** 228.

Ozturk, N., Singh, I., Mehta, A., Braun, T. & Barreto, G. 2014. HMGA proteins as modulators of chromatin structure during transcriptional activation. *Front Cell Dev Biol,* 2**,** 5.

Pal, M. K., Jaiswar, S. P., Dwivedi, V. N., Tripathi, A. K., Dwivedi, A. & Sankhwar, P. 2015. MicroRNA: a new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Biol Med,* 12**,** 328-41.

Pandit, K. V., Corcoran, D., Yousef, H., Yarlagadda, M., Tzouvelekis, A., Gibson, K. F., Konishi, K., Yousem, S. A., Singh, M., Handley, D., Richards, T., Selman, M., Watkins, S. C., Pardo, A., Ben-Yehudah, A., Bouros, D., Eickelberg, O., Ray, P., Benos, P. V. & Kaminski, N. 2010. Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med,* 182**,** 220-9.

Pfaff, J. & Meister, G. 2013. Argonaute and GW182 proteins: an effective alliance in gene silencing. *Biochem Soc Trans,* 41**,** 855-60.

Ping, H., Guo, L., Xi, J. & Wang, D. 2017. Angiotensin II type 2 receptor-interacting protein 3a inhibits ovarian carcinoma metastasis via the extracellular HMGA2-mediated ERK/EMT pathway. *Tumour Biol,* 39**,** 1010428317713389.

Prahm, K. P., Novotny, G. W., Hogdall, C. & Hogdall, E. 2016. Current status on microRNAs as biomarkers for ovarian cancer. *APMIS,* 124**,** 337-55.

Pritchard, C. C., Cheng, H. H. & Tewari, M. 2012. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet,* 13**,** 358-69.

Ramberg, H., Alshbib, A., Berge, V., Svindland, A. & Tasken, K. A. 2011. Regulation of PBX3 expression by androgen and Let-7d in prostate cancer. *Mol Cancer,* 10**,** 50.

Rapisuwon, S., Vietsch, E. E. & Wellstein, A. 2016. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Comput Struct Biotechnol J,* 14**,** 211-22.

Rauh-Hain, J. A., Krivak, T. C., Del Carmen, M. G. & Olawaiye, A. B. 2011. Ovarian cancer screening and early detection in the general population. *Rev Obstet Gynecol,* 4**,** 15-21.

Retamales-Ortega, R., Oróstica, L., Vera, C., Cuevas, P., Hernández, A., Hurtado, I., Vega M. & Romero, C. 2017. Role of Nerve Growth Factor (NGF) and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences,* 18, 507.

Riffo-Campos, A. L., Riquelme, I. & Brebi-Mieville, P. 2016. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *Int J Mol Sci,* 17.

Rogalla, P., Drechsler, K., Frey, G., Hennig, Y., Helmke, B., Bonk, U. & Bullerdiek, J. 1996. HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am J Pathol,* 149**,** 775-9.

Romero-Cordoba, S. L., Salido-Guadarrama, I., Rodriguez-Dorantes, M. & Hidalgo-Miranda, A. 2014. miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther,* 15**,** 1444-55.

Romero, I. & Bast, R. C., Jr. 2012. Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology,* 153**,** 1593-602.

Sakurai, M., Miki, Y., Masuda, M., Hata, S., Shibahara, Y., Hirakawa, H., Suzuki, T. & Sasano, H. 2012. LIN28: a regulator of tumor-suppressing activity of let-7 microRNA in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol,* 131**,** 101-6.

Sandrim, V. C., Luizon, M. R., Palei, A. C., Tanus-Santos, J. E. & Cavalli, R. C. 2016. Circulating microRNA expression profiles in pre-eclampsia: evidence of increased miR-885-5p levels. *BJOG,* 123**,** 2120-2128.

Sato, T., Shiba-Ishii, A., Kim, Y., Dai, T., Husni, R. E., Hong, J., Kano, J., Sakashita, S., Iijima, T. & Noguchi, M. 2017. miR-3941: A novel microRNA that controls IGBP1 expression and is associated with malignant progression of lung adenocarcinoma. *Cancer Sci,* 108**,** 536-542.

Schorge, J., Schaffer, J., Halvorson, L., Hoffman, B., Bradshaw, K. & Cunningham, F. 2008. *Williams GYNECOLOGY*, The McGraw-Hill Companies.

Sgarra, R., Rustighi, A., Tessari, M. A., Di Bernardo, J., Altamura, S., Fusco, A., Manfioletti, G. & Giancotti, V. 2004. Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. *FEBS Lett,* 574**,** 1-8.

Shao, L., Shen, Z., Qian, H., Zhou, S. & Chen, Y. 2017. Knockdown of miR-629 Inhibits Ovarian Cancer Malignant Behaviors by Targeting Testis-Specific Y-Like Protein 5. *DNA Cell Biol,* 36**,** 1108-1116.

Simon, E. P., Freije, C. A., Farber, B. A., Lalazar, G., Darcy, D. G., Honeyman, J. N., Chiaroni-Clarke, R., Dill, B. D., Molina, H., Bhanot, U. K., La Quaglia, M. P., Rosenberg, B. R. & Simon, S. M. 2015. Transcriptomic characterization of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 112**,** E5916-25.

Srivastava, S. 2017. *Biomarkers in Cancer Screening and Early Detection*, Wiley-Blackwell.

Srivastava, S. K., Ahmad, A., Zubair, H., Miree, O., Singh, S., Rocconi, R. P., Scalici, J. & Singh, A. P. 2017. MicroRNAs in gynecological cancers: Small molecules with big implications. *Cancer Lett*.

Su, B., Zhao, W., Shi, B., Zhang, Z., Yu, X., Xie, F., Guo, Z., Zhang, X., Liu, J., Shen, Q., Wang, J., Li, X., Zhang, Z. & Zhou, L. 2014. Let-7d suppresses growth, metastasis, and tumor macrophage infiltration in renal cell carcinoma by targeting COL3A1 and CCL7. *Mol Cancer,* 13**,** 206.

Sun, H., Ding, C., Zhang, H. & Gao, J. 2016. Let7 miRNAs sensitize breast cancer stem cells to radiationinduced repression through inhibition of the cyclin D1/Akt1/Wnt1 signaling pathway. *Mol Med Rep,* 14**,** 3285-92.

Tam, S., De Borja, R., Tsao, M. S. & Mcpherson, J. D. 2014. Robust global microRNA expression profiling using next-generation sequencing technologies. *Lab Invest,* 94**,** 350-8.

Toss, A., Tomasello, C., Razzaboni, E., Contu, G., Grandi, G., Cagnacci, A., Schilder, R. J. & Cortesi, L. 2015. Hereditary Ovarian Cancer: Not Only BRCA 1 and 2 Genes. *BioMed Research International*.

Ueland, F. R. 2017. A Perspective on Ovarian Cancer Biomarkers: Past, Present and Yet-To-Come. *Diagnostics (Basel),* 7.

Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science,* 318**,** 1931-4.

Velpula, N., Yathavakilla, C. N. & Ramesh, A. 2017. Tumor Markers- A Review. *International Journal of Oral Health Dentistry,* 3.

Vidigal, J. A. & Ventura, A. 2015. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol,* 25**,** 137-47.

Wagner, S., Ngezahayo, A., Murua Escobar, H. & Nolte, I. 2014. Role of miRNA let-7 and its major targets in prostate cancer. *Biomed Res Int,* 2014**,** 376326.

Wu, J. & Wei, J. J. 2013. HMGA2 and high-grade serous ovarian carcinoma. *J Mol Med (Berl),* 91**,** 1155-65.

Wu, L. H., Peng, M., Yu, M., Zhao, Q. L., Li, C., Jin, Y. T., Jiang, Y., Chen, Z. Y., Deng, N. H., Sun, H. & Wu, X. Z. 2015. Circulating MicroRNA Let-7d in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Neuromolecular Med,* 17**,** 137-46.

Xiao, J., Chen, H. S., Fei, R., Cong, X., Wang, L. P., Wang, Y., Jiang, D., Wei, L. & Wang, Y. 2005. Expression of MAGE-A1 mRNA is associated with gene hypomethylation in hepatocarcinoma cell lines. *J Gastroenterol,* 40**,** 716-21.

Yağcı E, Güneş Hasan Veysi. 2017, Notch Sinyal Yolağı ve Karsinogenez, Osmangazi Tıp Dergisi 2017, 39(109-116): Doi: 10.20515/otd. 287890.

Yanokura, M., Banno, K., Iida, M., Irie, H., Umene, K., Masuda, K., Kobayashi, Y., Tominaga, E. & Aoki, D. 2015. MicroRNAS in endometrial cancer: recent advances and potential clinical applications. *EXCLI J,* 14**,** 190-8.

Young, K. A., Wise, J. A., Desaix, P., Kruse, D. H., Poe, B., Johnson, E., Johnson, J. E., Korol, O., Betts, J. G. & Womble, M. 2013. Anatomy & Physiology [Online]. OpenStax. Available: https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/27-2-anatomy-and-physiology-of-the-female-reproductive-system/#fig-ch28_02_01 [Accessed].

Yuan, Z., Wang, F., Zhao, Z., Zhao, X., Qiu, J., Nie, C. & Wei, Y. 2011. BIM-mediated AKT phosphorylation is a key modulator of arsenic trioxide-induced apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant ovarian cancer cells. *PLoS One,* 6**,** e20586.

Zhang, J., Liu, X., Datta, A., Govindarajan, K., Tam, W. L., Han, J., George, J., Wong, C., Ramnarayanan, K., Phua, T. Y., Leong, W. Y., Chan, Y. S., Palanisamy, N., Liu, E. T., Karuturi, K. M., Lim, B. & Miller, L. D. 2009. RCP is a human breast cancer-promoting gene with Ras-activating function. *J Clin Invest,* 119**,** 2171-83.

Zhang, Y. & Chen, Q. 2017. Relationship between matrix metalloproteinases and the occurrence and development of ovarian cancer. *Braz J Med Biol Res,* 50**,** e6104.

Zhang, B., Cai, F. F. & Zhong, X. Y. 2011. An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,* 158**,** 119-23.

Zheng, H., Zhang, L., Zhao, Y., Yang, D., Song, F., Wen, Y., Hao, Q., Hu, Z., Zhang, W. & Chen, K. 2013. Plasma miRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Ovarian Cancer. *Public Library of Science,* 8.

Zhu, J., Wen, H., Ju, X., Bi, R., Zuo, W. & Wu, X. 2017. Clinical Significance of Programmed Death Ligand1 and Intra-Tumoral CD8+ T Lymphocytes in Ovarian Carcinosarcoma. *PLoS One,* 12**,** e0170879.

EKLER

EK 1. Etik kurul belgesi

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 1488 Tarih : 15.12.2016
Konu : Doç. Dr. Tuba GÜNEL hk.

Sayın Doç. Dr. Tuba GÜNEL
Fen Fakültesi

İlgi: İ.Ü.Fen Fakültesinin 29/11/2016 gün ve 431115 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Berkcan DOĞAN' ın yürüteceği 2016/1427 dosya numaralı "Over Kanserinin Erken Tanısı için Aday miRNA'lardan Biyomarkır Seçimi" başlıklı çalışma kurulumuzun 09/12/2016 gün ve 21 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Berkcan DOĞAN
Doğum Yeri	Bursa
Doğum Tarihi	18.11.1992
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
Telefon	+905555720523
E-Posta Adresi	berkcan.doan@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Hacettepe Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	19.01.2015

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı