ARAŞTIRMA MAKALESİ

Stage II Kolon kanseri dokularında Onkogenik microRNA olan miR-92, miR-21, miR-155'in qRT-PCR'da Ekspresyonu

Expression of miR-92, miR-21, miR-155, Oncogemic miRNAs using qRT-PCR in Colon Cancer stage II Tissues

Çiğdem GÜNGÖRMEZ[1], Hatice GUMUSHAN AKTAS[2], Ersin BORAZAN[3]

[1] *Harran Üniversitesi, Merkezi Laboratuvar Müdürlüğü, Şanlıurfa, Türkiye*

[2]*Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye*

[3]*Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Bölümü Gaziantep, Türkiye*

Sorumlu yazar:

Çiğdem GÜNGÖRMEZ

Harran Üniversitesi, Merkezi Laboratuvar Müdürlüğü, Şanlıurfa, Tel: 551 4383483 e-mail:gover.cigdem@harran.edu.tr

Bu çalışma; 1. Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi'nde (21-23 Eylül 2017) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş tarihi / Received: 30.10.2017 **Kabul tarihi / Accepted:** 22.11.2017

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada Stage II kolorektal kanserli hastalardan alınmış tümörlü ve normal kolon/rektum dokularında Onkogenik mikroRNA (miRNA) olan miR-92, miR-21 ve miR-155'in ekspresyon seviyelerinin qRT-PCR ile tespit edilmesi ve elde edilen verilerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan laboratuar ve patalojik bulgular ile klinik değerlendirme sonucunda kolorektal kanser tanısı konmuş 9 hastanın tümörlü ve normal (kontrol-temiz cerrahi sınırları) kolon/rektum dokular ile çalışılmıştır. qRT-PCR uygulaması için miRNeasy mini kit ile izole edilen miRNA'lar kullanıldı. İzole edilen miRNA'lar miScript RT-PCR ticari kit ile cDNA'ya dönüştürüldü. Doku örneklerindeki miRNA ekspresyon seviyeleri ile cDNA örnekleri RT- SYBR Green qPCR kiti kullanılarak Rotor Gene RT-PCR sistemi ile belirlendi. Bulgular: Kolorektal kanser teşhisi konulmuş 9 hastanın ortalama miRNA-21 ekspresyon seviyesi normal doku ve tümörlü doku karşılaştırıldığında 2.09 kat arttığı, miR-155'in ise 2.22 kat arttığı tespit edilmiştir. Bu artış istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). onkogenik miRNA olmasına rağmen miR-92 ekpresyon miktarı normal ve tümör dokusu fold change değerleri karşılaştırıldığında 1.37 kat azaldığı tespit edilmiştir. Ancak bu azalmanın istatiksel bakımdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).

Sonuç: Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre kolorektal kanserde onkogenik miRNA olan miR-21 ve miR-155'in hastaların tümörlü kolon dokularında ekspresyon seviyeleri artmıştır. Son yıllarda yapılan araştırmaların sonuçları Hücresel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev alan miRNA'ların kanserin tanı ve tedavisi için biyobelirteç olarak kullanılabileceği fikrini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: miRNA, onkogenik miRNA, Kolon kanseri, Biyobelirteç.

ABSTRACT

Background: In this study, we aimed to detect the expression levels of miR-92, miR-21 and miR-155 in tumor and normal colon and rectum tissues with oncogenic microRNA (miRNA) obtained from patients with Stage II colorectal cancer using qRT-PCR and to compare the obtained data.

Material and Method: This study was carried out with the clinical, laboratory and pathological findings of the tissues obtained from patients diagnosed with colorectal cancer at Gaziantep University Medical Faculty Research and Training Hospital -General

Surgery Department. miRNeasy mini kit-isolated miRNAs were used for qRT-PCR implementation. The isolated miRNAs were converted into cDNA via the miScript RT-PCR commercial kit. The cDNA samples with miRNA expression levels in tissue samples were identified via Rotor Gene RT-PCR system using RT-SYBR Green qPCR kit.
Result: The mean level of miRNA-21 expression in 9 patients diagnosed with colorectal cancer appears to have increased 2.09 fold compared to normal tissue and tumor tissue, while miR-155 increased 2.22 fold. This increase was considered as statistically significant ($p < 0.05$). When the fold chance values of normal and tumor tissue are compared, despite being oncogenic miRNA, miR-92 appears to have decreased 1.37 fold and was not considered statistically significant ($p > 0.05$).
Conclusion: According to the findings obtained in our study, the expression levels of oncogenic miRNA miR-21 and miR-155 in tumor colon tissues of patients with colorectal cancer have increased. The results of recent studies have shown that miRNAs involved in the regulation of many cellular functions may be used as biomarkers for diagnosis and treatment of cancer.
Key Words: miRNA, oncogenic miRNA, colorectal cancer, biomarker

GİRİŞ

Watson ve Crick tarafından DNA'nın yapısının keşfedilmesinden 50 yılı aşkın bir süre geçmiş olmakla birlikte, geçen bu süreçte moleküler biyoloji alanında çok hızlı gelişmeler kaydedilmiştir. Klinik tıp alanında ilerleme sağlayabilmek için moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerin daha iyi anlaşılabilmesi gerekmektedir (1). Araştırmalar geniş ölçüde DNA dizisinin çözümlenmesine ve DNA dizisi tarafından kodlanan proteinlerin belirlenmesine odaklanmıştır. İnsan genomunda yer alan DNA'nın büyük bir bölümü RNA kodlamasına rağmen bu genomun çok küçük bir miktarı (yaklaşık olarak % 1.5) fonksiyonel proteinlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar genomun geri kalan kısmının çok az öneme sahip olduğu düşünülmekteydi. Fakat bu görüş, küçük RNA moleküllerinin keşfi ile ortadan kalkmış oldu. Bu grup içine giren mikroRNA'lar (miRNA'lar), RNA'ların protein kodlamayan (non-coding) dizileri olarak adlandırılmaktadır. Araştırmacılar, miRNA'ların hücresel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev aldığını, dolayısıyla hücrede miRNA seviyelerinin normal koşulların dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir (2-5).

Kolorektal kanser, bir dizi moleküler olay sonrası ortaya çıkan ve normal mukozadan tek bir kript epitelindeki değişikliklere, küçük iyi huylu tümörlerden (adenomatöz polipler) adenokarsinomlara kadar uzanan bir dizi morfolojik değişimle karakterize bir olgudur (6,7). Kolorektal kanserin görülme sıklığı, dünyanın farklı toplumlarına göre değişmekte olup; gelişmekte olan ülkelere nazaran, Türkiye'nin de aralarında bulunduğu gelişmiş ülkelerde daha yüksektir (8). Kolorektal kanser tüm dünyada 3. sıklıkta görülen kanserdir. Siegel ve ark.'nın (2017) araştırmasına göre 2017 yılında görülen 600.920 kansere bağlı ölümün 157.700'ünün kolorektal kanserlerden olduğu bildirilmektedir (9).

Kolorektal kanser dahil olmak üzere bütün kanser çeşitlerinde erken ve ağrısız tanı ile teşhiste kullanılan belirteçlerin duyarlılıkları zayıf kalmaktadır. Son yıllarda yapılan kanser araştırmalarında, kanserin oluşum mekanizmalarında ve tedavi basamaklarında miRNA'ların büyük bir öneme sahip olduğu tespit edilmiştir.

miRNA'lar ilk kez 1993 yılında Ambros ve ark., tarafından yapılmış olan Caenorhabditis elegans'ta hücrelerin gelişiminin araştırıldığı çalışmalarda keşfedilmiştir. Ambros ve ark. (1993), C. elegans'ta gelişimsel süreçte zamanlamayı kontrol eden heterokronik lin-4 ve lin-14 genlerinden lin-4'ün lin-14'ü baskıladığını göstermişlerdir (10,11). Araştırıcılar lin-4 genini klonlarken bu genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 72,509 53,594 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA molekülü transkribe ettiğini raporlamışlar ve bunun 22 nükleotidlik kodlanmayan bir dizi olduğunu belirlemişlerdir (11). Ökaryotik hücrelerde bulunup yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen ve gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde görev alan yaklaşık 18-24 nükleotid büyüklüğündeki bu moleküller miRNA olarak tanımlanmaktadır (7,8). Protein kodlamayan bu RNA molekülleri iki mekanizma ile etki gösterirler: i. Kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA'lara bağlanıp translasyonel baskılama yaparlar. ii. mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu engellerler.

miRNA'lar, mRNA'nın 3' kodlama yapmayan bölgesinde (3' UTR) baz eşleşmesi yaparak bu bölgede bulunan transkriptlerin translasyonunu baskılamaktadırlar (9,10,13,14). miRNA'lar bu yolağı kullanarak hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması veya hücre ölümü gibi homeostatik süreçlerde önemli roller oynarlar (6,7). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda kontrolsüz hücre bölünmesinin gerçekleştiği kanser hücrelerinde değişikliğe uğramış miRNA ekspresyonu araştırılmıştır. Kanserin başlamasında ve ilerlemesinde, miRNA'lar hedefledikleri genin karakterine göre tümör süpresörler veya onkogenler gibi fonksiyon göstermektedirler. Dolayısıyla elde edilecek miRNA profili, kanserin erken teşhisi ve tedavisi için oldukça önemlidir (4,5).

miRNA'ların kanserleşme sürecine katkıda bulunduğu konusunda yapılan ilk çalışma Calin ve ark.'nın (2002) kronik lenfositik lösemi (KLL)'li hastalar ile yaptıkları moleküler bir çalışma ile ortaya konmuştur. Bu çalışma sonucunda birçok hastada miR-15a ve miR-16-1 düzeylerinin azalmış olduğu veya bu miRNA'ların bulunmadığı tespit edilmiştir (15). Calin ve ark. 2004 yılında yaptıkları 245 insan ve fare miRNA probu içeren başka bir miRNA mikroarray çalışmasında ise miR-15a ve miR-16-1'in

ekspresyon düzeylerinin B hücreli KLL hastalarında belirgin şekilde azaldığını rapor etmişlerdir. Araştırıcılar, miRNA ekspresyon profilinin, KLL hastalarının klinik ve biyolojik davranışıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (16). Normal dokularda, bazı miRNA'ların protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu tür miRNA'lar "tümör baskılayıcı miRNA'lar" olarak ifade edilmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olmaktadır. Bunun tersi, "onko-mir" olarak ifade edilen bazı miRNA'ların kanserin gelişimini arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA'ların tümör baskılayıcı proteinlerin oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. miRNA'lar, onkogen ve tümör baskılayıcı mRNA'ların her ikisini de potansiyel hedef olarak görebilir.

miRNA'ların ekspresyon profilleri birçok kolorektal kanser hücre hattında, normal ve tümörlü dokuda incelenmiş olup kolon karsinomunda miRNA ekspresyonunun diagnostik bir belirteç olarak kullanılabileceği çeşitli çalışmalarla belirtilmiştir (17, 18, 19). İlk olarak 2003 yılında Michael ve ark. yaptıkları çalışmada miR-143 ve miR-145 düzeyinin adenomlu ve kolorektal kanserli hastalarda azaldığını tespit etmişlerdir (20). Farklı ekspresyon seviyeleri gösteren miRNA'lar ile tümörün evresi, moleküler alt tipi ve klinik özellikleri arasında ilişki kurulmuş böylece kolorektal tümörlerde ekspresyon değişimleri belirlenen miRNA'ların bu kanserin tanı ve tedavisinde birer biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri belirtilmiştir (21,22). Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar miRNA'ların kanda ve serumda sirküle halde bulunduklarını göstermektedir (22,23). Bununla birlikte miRNA'ların dışkıda da varlıkları tespit edilmiştir. Çalışmalar sonucunda miR-92 ve miR-21 gibi bazı miRNA'ların kan ve dışkıdaki varlıklarına bakılarak kolorektal kanserlerde erken tanı belirteci olarak kullanılabilecekleri rapor edilmiştir (18). Başka bir araştırmada, sporadik gelişen kolorektal kanser hastalarına ait normal ve tümörlü dokuların array çalışması ile miRNA profili çıkartılıp ekspresyon miktarları belirlenmiş ve miRNA'ların diagnostik bir biyobelirteç olacağı öne sürülmüştür (23,24). Ye ve Cao (2014), kolorektal kanserde öne çıkan miRNA'ların hedef genlerinin belirlenip terapide kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (24).

Yapılan birçok çalışma sonucunda miR-92, miR-21ve miR-155'in kolorektal kanserde onkogenik miRNA oldukları ve bunların kolorektal kanserin erken tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri belirtilmiştir. Literatür incelendiğinde, Türkiye'deki kolorektal kanserli hasta dokularındaki miRNA'lar üzerinde yapılmış

birkaç çalışmanın belirli bir differansiyasyon derecesi dikkate alınmadan genel ekspresyon çalışması şeklinde gerçekleştirildiği dikkati çekmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, metastazın henüz başlamadığı Stage II derece dikkate alınarak hasta seçimi yapılmıştır. Böylece metastatik evreye geçmemiş kolorektal kanser dokularında onkogenik miRNA'ların varlığı ve miktarının belirlenmesiyle bu miRNA'ların kanser teşhisinde bir biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyelinin test edildiği çalışmalara katkı sağlanabileceği düşünülmektedir.

Tablo 1: Dokuz hastanın klinopatolojik bilgileri

Özellikler (n=9, normal ve tümör dokusu)	Cinsiyet		Yaş ortalaması	Tümörün lokasyonu		Patolojik T sınıflandırma		Patolojik N sınıflandırma			Metastatik Sınıflandırma		AJCC Sınıflandırma
	Erkek	Kadın		Kolon	Rektum	T2	T3	N0	N1	N2	M0	M1	Stage II
Sayı	7	2	47	8	1	0	9	6	2	1	9	0	9

MATERYAL VE METOD

Doku Örneklerinin Toplanması: Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda laboratuar ve patolojik bulgular ile klinik değerlendirme sonucunda kolorektal kanser tanısı konmuş 9 hastanın tümörlü ve normal (kontrol-temiz cerrahi sınırları) kolon/rektum dokuları kullanılarak yapılmıştır. Tümör örnekleri için belirli bir differansiyasyon derecesi dikkate alınmış olup Stage II kapsamındaki ilgili kriterlere sahip kolorektal karsinomlar çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalara ait patolojik bulgu raporları ve sınıflandırılması Tablo 1'de verilmiştir. Çalışma için gerekli olan Etik Kurulu onayı, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 74059997.050.01.04/126 sayısı ile alınmıştır. Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan alınan dokular, içerisinde RNA'nın bozulmasını önleyen RNALater (Qiagen) solusyonunun bulunduğu vida kapaklı tüplere alınarak çalışma yapılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

miRNA izolasyonu: qPCR uygulaması için RNALater solüsyonunda saklanan yaklaşık 30 mg doku 1-2 ml Qiazol (Qiagen) içerisinde homojenize edildi (Bertin Precell Homojenizatör). miRNA izolasyonu miRNAeasy mini kit (Qiagen) kullanılarak prosedüre uygun şekilde gerçekleştirilerek miRNA'ların miktarı ve kalitesi kontrol edildi (NanoDrop 2000 Spektrometre

Implen). İzole edilen miRNA'ları cDNA'ya dönüştürmek için miScript RT-PCR ticari kit ile miRNA HiSpec Tampon kullanılarak ters transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Real Time PCR: Sentezlenen cDNA'lara RT-SYBR Green qPCR kiti kullanılarak denatürasyon (94 °C' de 15 saniye), hibridizasyon (55 °C' de 30 saniye) ve polimerizasyon (70 °C' de 30 saniye) basamaklarından oluşan 40 tekrarlık PCR protokolü uygulandı (Rotor-gene Q 5 PLEX HRM Qiagen). Referans gen olarak RNU6 kullanıldı.

Tablo 2: Kullanılan miRNA bilgileri

MicroRNA adı	Ulaşım Numarası	Türü	miRNA'nın Yaygın olarak Kullandığı Yolaklar
Hs-miR-21-2	MS00009079	Onkogen	PDCD4, PTEN, RECK, NFIB,TPM1, SPRY2, RHOB, TIMP3, maspin, CDC25a, TIAM1, MSH2
Hs-miR-92-1	MS00006594	Onkogen	E2F1, HBP1, CDKN1A, NCOA3, ERa, PTEN, MECP2, HOXA5, VPS4B, MYCN, RAB14, DPYSL2, TGFBR2, TSG101, ARHGAP12, BACE1
Hs-miR-155-2	MS00031486	Onkogen	MLH1, MSH2, MSH6
Hs-RNU6-2-11	MS00033740	Referans	

İstatiksel Analiz: Normal ve tümörlü kolorektal dokulardaki onkogenik miRNA'ların ekspresyon farkının belirlenmesi için normal ve tümörlü dokulara ait ΔCt ve fold change değerleri hesaplandı. Sayısal değişkenlerin ortalamalarının karşılaştırılmasında Student-t testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Kolorektal kanserli 9 hastanın normal ve tümörlü dokularında ölçülen ΔCt değerleri kullanılarak fold change hesaplanmış ve Tablo 3'te gösterilmiştir.

miR-21 için ortalama ΔCt değeri normal dokuda 3.03 iken tümörlü dokuda 5.07 olarak tespit

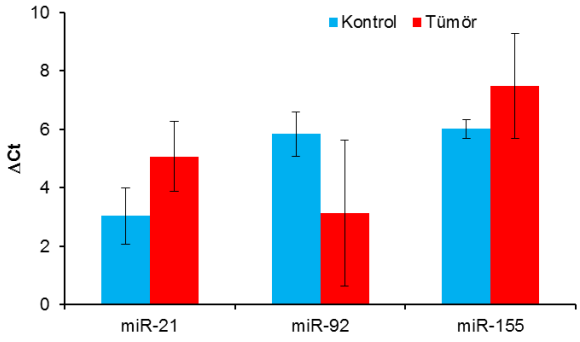
edilmiştir (Şekil 1). miR-21'in normal dokuya göre tümörlü dokuda yaklaşık 2 kat fazla eksprese edildiği görülmüştür. Benzer şekilde miR-155'in ortalama ΔCt'si normal dokuda 6.01 iken tümörlü dokuda ise 7.48 olarak saptanmıştır (Şekil 1). Bu artış istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). miR-155'in tümörlü dokuda ekspresyon seviyesinin normal dokudakinden 2.22 fazla olduğu belirlenmiştir. Veriler istatiksel olarak değerlendirilmiş ve hem miR-21 hem de miR-155 için normal ve tümörlü dokular arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p \leq 0.05$) tespit edilmiştir.

Onkogenik miRNA olmasına rağmen miR-92'nin normal dokuda 5.48 olan ortalama ekspresyon miktarının tümörlü dokuda azaldığı ve 3.13 olduğu (Şekil 1) görülmekle birlikte yapılan istatiksel değerlendirmede aradaki farkın (Fold change -1.37) anlamlı olmadığı ($p>0.05$) bulunmuştur.

Tablo 3: miRNA ekspresyon sonucu kat değişim (fold chance) değerleri

miRNA	Fold Change	SH(±)	p-değeri
miR-92-1	-1,370	1,420	0,820
miR-21-2	2,091*	0,045	0,039
miR-155-2	2,221*	0,630	0,047

** $p \leq 0.05$*



Şekil 1: Kontrol ve tümör grupları için ΔCt ortalamalarının göre grafiksel gösterimi.

TARTIŞMA

MikroRNA'ların keşfinden sonra, fonksiyonları hakkında yapılan birçok çalışma, miRNA'ların kanser gelişiminde anahtar rol oynadıklarını ortaya çıkarmıştır. MiRNA'lar hedefledikleri mRNA'lara bağlı olarak kanser gelişiminde tümör süpresör veya onkogen olarak fonksiyon göstermektedirler.

Kolorektal kanserlerde düzeyleri artan veya azalan çeşitli miRNA'lar tanımlanmış olup bir çok çalışmada miRNA ekspresyonunun diagnostik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (6,7,13,25).

Slaby ve ark. (2008) yaptığı çalışmada kolorektal kanserli hastalarda plazmada miR-92 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ve miR-92'nin kolorektal kanser tanısında non-invaziv

biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (26). Huang ve ark. (2004) ise yaptıkları çalışmada miR-29a ve 92a düzeylerini anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (27). Başka bir araştırmada miR-21'in yüksek düzeydeki ekspresyonunun kolorektal kanserli hastalarda lenf nodu metastazı, uzak metastazlar ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (28,29). Kolorektal kanserli 9 hastanın kolon/rektum dokuları ile yaptığımız çalışmada da miR-21 ve miR-155'in normal ve tümörlü dokulardaki ekspresyon seviyesi artmış olup sonuçlar istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Kolon kanserinde onkogenik miRNA olmasına rağmen miR-92'nin tümörlü dokulardaki ekspresyon miktarının normal dokuya göre azalmakla birlikte aradaki farkın istatiksel bakımdan anlamlı olmadığı görülmüştür. Çalışma sonucumuzdaki ekspresyon farkındaki azalmanın ameliyat sırasında normal doku ile tümörlü doku ayrımının tam yapılamama ihtimalinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

miRNA tedavi yönteminin uygulanabilmesi için bazı sorular cevaplanmayı beklemektedir. Biyobelirteç olarak kullanılmak istenen miRNA'lar tek bir gen ürününü etkilemekten ziyade bütün gen düzenleyici sistemine etki edebilmektedir. miRNA'ların her biri, çok sayıda hedef genin ekspresyonunu düzenler ve bir miRNA'nın ekspresyonunun değiştirilmesi umulmadık birçok geni hedef alabilir. Bu durumun tersi olarak, tek bir gen birçok miRNA tarafından düzenlenebilir, belirli bir miRNA'nın ekspresyonunun değiştirilmesi spesifik bir gen hedefini verimli şekilde etkileyebilir. miRNA tedavi yönteminin başarılı şekilde uygulanabilmesi için bu türlü problemlerin üstesinden gelmeye yönelik yeni araştırma bulgularına ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1) Wijnhoven B.P, Michael M.Z and Watson D.I. MicroRNAs and cancer. BR. Journel Surgery 2007;94:23-30.
2) Iorio M.V, Ferracin M, Liu C.G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res 2005; 65:7065–7070.
3) Calin G.A, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. The New England journal of medicine 2005; 353(17):1793-801.
4) Lehmann U, Hasemeier B, Römermann D, Müler K, Langer F. and Kreipe H., Epigenetic inactivation of microRNA genes in mammary carcinoma, Verh Dtsch Ges Pathol 200;7 91, 214-220 p.
5) Saydam F, Değirmenci İ, Güneş V. MikroRNA'lar ve kanser Dicle Tıp Dergisi, 2011; 38(1), 113-120.
6) Michor F, Iwasa Y, et al. Dynamics of colorectal cancer. Semin Cancer Biol. 2005; 15(6), 484-93.
7) Hermsen M, Postma C and Baak J. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. Gastroenterolgy 2002; 123, 1109-1119.
8) Corte H, Manceau G, Blons H, Laurent-Puig P. MicroRNA and colorectal cancer. Dig Liver Dis. 2012; 195-200.
9) Sigel R.L, Miller K.B, Jemal A. Cncer Statistic, 2017. Cancer Journal for Clinicions 2017; 67: 7-30
10) Ambros V. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in C. elegans. Cell 1989; 57(1):49-57.
11) Lee R.C, Feinbaum R.L, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993; 75(5):843 54.

12) Aiello M, Vella N, Cannavo C, Scalisi A, Spandidos D.A, Toffoli C, Buonadonna A, Libra M, and Stivala F. Role of genetic polymorphisms and mutations in colorectal cancer therapy. Molecular Medicine Reports 2011; 4, 203-208.
13) Bedeir A and Krasinskas A.M. Molecular Diagnostics of Colorectal Cancer. Arch Pathol Lab Med 2011; 135, 204-215.
14) Pillai R.S, Bhattacharyya S.N, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: How many mechanisms? Trends in Cell Biology 2007; 17, 118-126.
15) Calin G. A et al. Frequent deletions and downregülation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002; 99:15524-15529.
16) Calin G.A, Sevignani C, Dumitru C.D, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:2999–3004.
17) Hayes J, Peruzzi P.P and Lawler S. microRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. Trends in Molecular Medicine 2014; 20(8).
18) Mazeh H, Mizrahi I, Ilyayev N, Halle D, Brücher B, et al. The Diagnostic and Prognostic Role of microRNA in Colorectal Cancer-a Comprehensive review. J Cancer 2013; 4: 281-295.
19) Shen J, Stass S.A, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. Cancer Lett 2013; 329: 125-136.
20) Michael M.Z, Connor S.M, and et al. "Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia", Mol Cancer Res 2003; 1, 882-891
21) Baraniskin A, Birkenkap K, and Maghnoui A. "MiR-30a- 5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL", Carcinogenesis 2012; 33, 732-739.
22) Schetter A.J, Okayama H, Harris C. The Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer. Cancer J 2012; 18, 244-252.
23) Callari M, Dugo M, Musella V, Marchesi E, Chiorini G, et al. Comparison of Microarray Platforms for Measuring Differential MicroRNA Expression in Paired Normal/Cancer Colon Tissues. PLoS ONE 2012; 7(9), e45105.
24) Ye J.J, Cao J. MicroRNAs in colorectal cancer as markers and targets: Recent advances. World J Gastroenterol 2014 20(15), 4288-4299
25) Manne U, Shanmugam C, Bovell L, et al.: miRNAs as biomarkers for management ofpatients with colorectal cancer. Biomark Med 2010; 4:761–770.
26) Slaby O, Svoboda M, Fabian P, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. Oncology. 2008; 72(5-6):397–402.
27) Huang J, Zheng S, Jin SH, Zhang SZ. Somatic mutations of APC gene in carcinomas from hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. World J Gastroenterol 2004; 10: 834-836.
28) Wang J.C, Zhou Z.G, Wang L, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. Disease Markers. 2009; 26(1):27–34