T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOLON KANSERİNDE MİKRORNA'LARIN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Dilek ACAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2017

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOLON KANSERİNDE MİKRORNA'LARIN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Dilek ACAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2017

Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ danışmanlığında, Dilek ACAR'ın hazırladığı "**Kolon Kanserinde MikroRNA'ların Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi"** konulu bu çalışma 01/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ ……

Üye : Prof. Dr. Şakir Ümit ZEYBEK …….

Üye : Yrd. Doç. Dr. Arif PARMAKSIZ …….

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Halil Murat ALĞIN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 15158

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET..... i
ABSTRACT..... ii
TEŞEKKÜR..... iii
ŞEKİLLER DİZİNİ..... iv
ÇİZELGELER DİZİNİ..... v
SİMGELER DİZİNİ..... vi
1. GİRİŞ..... 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR..... 5
2.1. Kolon Kanseri..... 5
2.2. miRNA..... 8
2.3. Kolon Kanseri ve miRNA..... 15
2.4. miRNA Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Yöntemler..... 20
3. MATERYAL ve YÖNTEM..... 32
3.1. Materyal..... 32
3.2. Yöntem..... 32
3.2.1. RNA izolasyonu..... 32
3.2.2. Ölçüm..... 33
3.2.3. cDNA oluşturma..... 33
3.2.4. Real Time PCR kullanımı..... 35
3.2.5. İstatiksel analiz..... 37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA..... 38
4.1. miRNA-145' in Ekspresyon Profili..... 41
4.2. miRNA-192'nin Ekspresyon Profili..... 42
4.3. miRNA-21'in Ekspresyon Profili..... 44
4.4. miRNA-92'nin Ekspresyon Profili..... 46
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER..... 49
KAYNAKLAR..... 52
ÖZGEÇMİŞ..... 61

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOLON KANSERİNDE MİKRORNA'LARIN EKSPRESYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Dilek ACAR

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ
Yıl: 2017, Sayfa: 61

Kolon kanserinde de diğer kanser türlerinde olduğu gibi erken teşhis büyük önem arzetmektedir. Son zamanlardaki bilimsel gelişmelere paralel olarak, kanserlerde teşhiş ve tedavinin yönderilmesi amacıyla biyobelirteçlerin yararlanılmaktadır. Çalışmamızda, kolon kanseri olgularında sağlıklı dokularda ve tümörlü dokularda miRNA ekspresyonları ve bunların erken teşhis amacıyla kullanılabilme kapasiteleri araştırılmıştır. Çalışmamızda, cerrahi parça alma işlemine girmiş olan 6 kolorektal kanserli hastanın, kolonundan alınan sağlam ve tümörlü doku kısımları kullanılmıştır. Hastalardan alınan normal ve tümör doku örneklerinde miRNA-145, miRNA-192, miRNA-21, miRNA-92' nin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. miRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için, Real Time PCR kullanılarak eşik döngü (Ct) değerleri analiz edildi ve elde edilen Ct değerlerinden kat değişiklikleri hesaplandı. miRNA analizleri sonucunda, miRNA-21 ve miRNA-92' nin ise tümör dokusunda normal dokuya kıyasla daha yüksek düzeyde eksprese olduğu, miRNA-145 ve miRNA-192' nin ise normal dokuda tümör dokusuna kıyasla daha fazla eksprese edildiği belirlenmiştir. Onkogenik karakterli olarak bilinen miRNA-21 ve miRNA-92 ile metastaz regulasyonunda rol oynayan miRNA-145 ve miRNA-192' nin değişken ekspresyonları bize kolorektal kanserin erken teshisinde kullanılabilme kapasiteleri hakkında bilgiler verebilecektir.

ANAHTAR KELİMELER: Kolon Kanseri, MikroRNA Ekspresyonu, Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINING EXPRESSION LEVELS OF MICRORNAS IN COLON CANCER

Dilek ACAR

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ
Year: 2017, Page: 61

Early diagnosis is very important in colon cancer as it is in other types of cancer. Along with recent scientific developments, biomarkers are being used for the diagnosis and treatment of cancers. In our study, miRNA expressions in healthy tissues and tumor tissues in colon cancer cases and their ability to be used for early diagnosis were investigated. Normal and tumor tissue sections from the colon of 6 patients with colorectal cancer who had undergone surgical procedure were used. miRNA-145, miRNA-192, miRNA-21 and miRNA-92 expression levels were determined in normal and tumor tissue specimens taken from patients. To determine miRNA expression levels, threshold cycle (Ct) values were analysed using Real Time PCR and fold changes were calculated from the obtained Ct values. As a result of miRNA analysis, miRNA-21 and miRNA-92 expressions were higher levels in tumor tissue than normal tissue where as miRNA-145 and miRNA-192 expressions were higer levels in normal tissue compared to tumor tissue. Variable expressions of miRNA-21 and miRNA-92 known as the oncogenic character, and miRNA-145 and miRNA-192, which plays a role in metastasis regulation, can give us information about the capacities that can be used in the early detection of colorectal cancer.

KEY WORDS: Colon Cancer, MicroRNA Expression, Real Time PCR (RT-PCR)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yönlendiren ve tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ'e ve bu çalışmamızda maddi olarak destekte bulunan HÜBAK'a, ayrıca tez çalışmamda bana yardımcı olan Hakan ÖZMEN'e teşekkür ederim. Son olarak, yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen eşim Mehmet ACAR'a ve manevi desteğini her an hissettiğim kızıma sonsuz teşekkürler.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1 miRNA'nın biyogenezi..... 10
Şekil 2.2 PCR basamakları..... 24
Şekil 2.3 PCR döngüleri..... 25
Şekil 2.4 SYBR Green..... 26
Şekil 2.5 Çalışmanın elektroforez görüntüsü..... 26
Şekil 2.6 Tümörlü doku ve normal dokuda temsili floresans-döngü grafiği..... 29
Şekil 2.7 RT-PCR' da florasan-döngü sayısı grafiğinin yorumlanması..... 29
Şekil 2.8 Örnek Ct değerleri..... 30
Şekil 2.9 PCR fazları..... 31
Şekil 3.1 Rotor-Gene Q Real Time PCR..... 35
Şekil 3.2 RT-PCR aşamaları..... 36
Şekil 4.1 miRNA-145'in tümörlü ve normal dokudaki Ct değerlerinin istatiksel analiz grafiği..... 42
Şekil 4.2 miRNA-192'nin tümörlü ve normal dokudaki Ct değerlerinin istatiksel analiz grafiği... 43
Şekil 4.3 miRNA-145'in Ct değerleri ile miRNA-192'nin Ct değerlerinin korelasyon grafiği..... 43
Şekil 4.4 miRNA-21'in tümörlü ve normal dokudaki Ct değerlerinin istatiksel analiz grafiği..... 44
Şekil 4.5 miRNA-21'in Ct değerleri ile miRNA-145'in Ct değerlerinin korelasyon grafiği..... 45
Şekil 4.6 miRNA-21'in Ct değerleri ile miRNA-192'nin Ct değerlerinin korelasyon grafiği..... 45
Şekil 4.7 miRNA-92'nin tümörlü ve normal dokudaki Ct değerlerinin istatiksel analiz grafiği..... 46
Şekil 4.8 miRNA-92'nin Ct değerleri ile miRNA-21'in Ct değerlerinin korelasyon grafiği..... 47
Şekil 4.9 miRNA-92'nin Ct değerleri ile miRNA-145'in Ct değerlerinin korelasyon grafiği..... 47
Şekil 4.10 miRNA-92'nin Ct değerleri ile miRNA-192'nin Ct değerlerinin korelasyon grafiği.... 48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1 Tümörlü ve normal dokuda 23, 24 ve 25. döngüdeki miRNA miktar kıyaslaması…...28
Çizelge 3.1 cDNA oluşturmak için kullanılan miRNA'lara özgü primerler……34
Çizelge 3.2 MiScript II RT kiti içeriği…… 34
Çizelge 3.3 Reverz transkripsiyon reaksiyonu bileşenleri……34
Çizelge 3.4 MiScript SYBR Green PCR kit içeriği……..36
Çizelge 4.1 Tümörlü doku ve normal dokuda miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması ile farklılık belirlenen miRNA'ların Ct değerleri……..40
Çizelge 4.2 Tümörlü doku ve normal dokuda miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması…….41

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
CRC	Kolon Kanseri (Kolorektal Kanser)
Ct	Eşik Döngü
DNA	Deoksiribonükleik asit
EtBr	Etidyum Bromid
miRNA	MikroRNA
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı RNA
nm	Nanometre
RNA	Ribonükleik Asit
*	İstatiksel Olarak Anlamlı

1. GİRİŞ

Son yıllarda kanserin ve kanserden dolayı ölümlerin görülme sıklığının artması bilim insanlarının kanserle ilgili çalışmalara ağırlık vermesine sebep olmuştur. Kanser, hücrelerin anormal bir şekilde büyümesi ve bu hücrelerin metastazı ile kendini belli eden ciddi bir hastalıktır (Ren ve ark., 2015). Kolon kanseri (kolorektal kanser, CRC) ise kalın bağırsağın iç kısmında bulunan mukoza tabakasında görülen bir kanser türüdür. CRC dünya çapındaki kanser insidansının %10'unu oluşturduğu için önemli bir sağlık sorunu haline gelmektedir (Schetter ve ark., 2012). Dünyada CRC % 0.02'lerde iken, Avrupa ortalaması % 0.037, Türkiye' de % 0.017 düzeylerindedir (TUİK, 2013). Bu sonuçlara bakarak, bu hastalığın erken tespit edilmesine izin verecek yeni ve daha etkin stratejiler oluşturması ve bu hastalık ile ilişkili küresel ölüm hızının azaltılmasına yardımcı olabilecek daha güvenli ve etkili tedaviler geliştirilmesi gerektiği açıktır. Tüm bu durumlar göz önüne alındığında CRC üzerindeki çalışmalarda artış gözlenmektedir.

CRC görülme sıklığı yüksek olan ciddi bir kanser türü olması nedeniyle birçok bilim insanını CRC'nin teşhisi ve tedavisi için yeni bulgular elde etmek amacıyla bu alana yönelmektedir. Küçük RNA molekülleri olan mikroRNA'ların keşfi de CRC teşhisinde ve tedavisinde farklı boyutlar oluşmasını sağlamıştır.

Son yıllarda, CRC'nin teşhisi amacıyla farklı biyolojik örneklerde DNA, RNA ve protein belirteçlerinin kullanımı yaygınlaşmaktadır. İlerleyen zamanlarda gelişen teknoloji ile birlikte kandan DNA, RNA ya da proteinin analizini yaparak bu tür kanserlerin taramasını yapabilecek teknikler geliştirmek araştırmacıların hedefindedir. Bu tarama yöntemlerinin düşük fiyatlı ve daha hassas olması sebebiyle kısa zamanda yaygınlaşabileceği tahmin edilmektedir (Binefa ve ark., 2014).

CRC, normal kolonoskopi veya sigmoidoskopi ile erken evrede saptanırsa tedaviye en iyi cevap veren kanserlerden biridir. CRC'de, kanser öncesi lezyonların yavaş gelişmesi nedeniyle erken teşhis hem hastalığın insidansını hem de mortaliteyi

azaltabilecektir. Dışkıda gizli kan testi, CRC için yaygın olarak kullanılan invazif olmayan bir tarama testi olarak kullanılmaktadır. Dışkıda gizli kan testi basit ve maliyeti düşük bir tarama testi olmasına karşın, testten her zaman sonuç alınamamaktadır. Bu nedenle daha kesin sonuç veren testlere gereksinim duyulmaktadır. Diğer taraftan genetik disregülasyonların CRC'nin gelişiminde önemli bir rol oynadığı gözlenmiştir. CRC'nin moleküler temellerinin daha detaylı anlaşılmasıyla, duyarlı ve spesifik moleküler belirteçlere dayalı tanı testlerinin geliştirilmesi mümkün görülmektedir. CRC için mevcut tarama testleri için sınırlamalarının moleküler tanı yöntemleriyle çalışmalarla aşılması mümkün görülmektedir (Tsang ve ark., 2014).

Araştırmalar CRC'nin bir dizi genetik mutasyona bağlı olduğunu göstermektedir. Fearon ve arkadaşları CRC'nin karsinogenezi için tipik model olarak adenoma-karsinoma dizisini tanımlamışlardır. Bu adenom-karsinoma dizisi, normal epitel mukozasından iyi huylu tümörün (adenom) kademeli ilerlemesini ve daha sonra mutasyon ve gen amplifikasyonu gibi bir dizi genetik değişikliğin bir sonucu olarak, adenomun habis tümöre (karsinomaya) dönüşmesini tarif etmektedir. CRC'nin tekrarlanması ve ölüm riski, ilk teşhis anında hastalığın hangi evrede olduğu ile yakından ilişkilidir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, CRC sebebiyle ortaya çıkan ölüm riskinin, kitlesel tarama ve müdahale yoluyla hastalığın erken safhaya kaydırılarak azaltılabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, CRC'nin erken teşhisi için moleküler düzeyde biyolojik belirteçlerin keşfedilmesi büyük önem taşımaktadır (Tsang ve ark., 2014).

MikroRNA'lar (miRNA'lar), transkripsiyon sonrası, esas olarak hedef mRNA'ların 3' UTR bölgesine bağlanarak gen ekspresyonunu regule eden, küçük (yaklaşık 20-23 nükleotid uzunluğunda), kodlamayan, tek iplikçikli RNA'ların bir sınıfıdır (Pang ve ark., 2012).

Memeli genomlarında, miRNA'ların gen ekspresyonu üzerindeki geniş etkilerini gösteren tüm kodlayıcı genlerin yaklaşık % 60'ını düzenleyeceği tahmin edilmektedir (Bajan ve Hutvagner, 2014). miRNA'lar gen ekspresyonunu

düzenleyebilmek amacıyla hedef mRNA'lara bağlanarak mRNA'ları yıkabilmekte veya mRNA'ların translasyonunu baskılayabilmektedir. Günümüzde, kanserler üzerine yapılan miRNA ile ilgili çalışmaların tamamı, normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerindeki miRNA'ların farklı ekspresyon seviyelerinin belirlenmesine dayanmaktadır. (Zhang ve ark., 2006). Bir miRNA'nın gen ekspresyon seviyesi normal ve kanserli dokularda değişiklik gösterebilmektedir. 2003 yılında Michael ve arkadaşları bu farklılığı ilk kez CRC' de tespit etmiştir (Michael ve ark., 2003). Daha sonraki yapılan araştırmalardaki bulgular Michael ve ekibini destekler niteliktedir. Ayrıca, miRNA'lar kanserde tümör baskılayıcı veya onkogenik roller üstlenmektedirler. Onkogenleri baskılayan miRNA'lar tümör baskılayıcı olarak nitelendirilmektedir. Bunun aksine tümör baskılayıcı genler üzerinde baskılayıcı etki gösteren miRNA' lar da onkogenik miRNA olarak tanımlanmaktadır (Xing ve ark., 2014; Zhu and Xu, 2014; Rothschild, 2014).

Yapılan son çalışmalara göre, CRC'de belirlenen miRNA'ların daha çok onkogenik oldukları ortaya konmuştur (Esquela Kerscher ve Slack ., 2006; Schetter ve ark., 2012). Bununla birlikte, bir miRNA' yı onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak adlandırırken dikkatli olunması gerekmektedir. Çünkü miRNA'ların ekspresyonları hücre tipine ve hücresel farklılaşma durumuna göre değişmektedir (Kent ve Mendell, 2006). Daha açık ifade ile, belirli bir miRNA bir kanser türünde onkogenik olarak rol alırken, başka bir kanser türünde ise tümör baskılayıcı etki gösterebilmektedir. Bu durum tümör tipleri arasında da farklılık gösterebilmektedir (Schee ve ark., 2010; Schetter ve ark., 2012). Bu farklılıkların ortaya çıkarılmasında sekanslama, mikroarray ve gerçek zamanlı PCR (Real Time PCR, RT-PCR) gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Çalışmada RT-PCR yöntemi kullanılarak ışıma özelliğine sahip moleküller ile polimeraz zincir reaksiyonunu oluşurken, izleme ve miktar belirleme analizlerinin gerçekleştirilmesi planlanmıştır. RT-PCR' ın en büyük avantajı, DNA amplifikasyonunun gerçek zamanlı olarak izlenebilmesine olanak sağlamasıdır (Valasek ve Repa, 2005).

Çalışmada normal kolorektal doku ve kanserli kolorektal doku arasındaki miRNA-145, miRNA-192, miRNA-21 ve miRNA-92'nin ekspresyon farklılıklarını RT-PCR kullanarak belirlenmesi amaçlanmaktadır. miRNA ekspresyonlarındaki düzensizliklerin kanserin başlaması, gelişmesi ve yayılmasında önemli etkileri olabilmektedir (Çelik ve ark., 2013). Çalışmada bilimsel literatüre katkı sağlamak ve CRC tedavisinde miRNA'ların rollerini ortaya koyabilmek için miRNA'lara ışık tutmak bu araştırmanın beklentileri arasındadır. Çünkü tümör dokuları ve normal dokularda farklı seviyelerde eksprese edilen miRNA'ların tanınması, bu miRNA'ların CRC'deki görevlerinin belirlenmesi çeşitli kanserlerdeki rolünün aydınlatılabilmesi için yararlı olabilir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kolon Kanseri

Kolon kanseri kalın bağırsağın iç kısmında bulunan mukoza tabakasında görülen bir kanser türüdür. Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2013 yılına ait verilerine göre kötü huylu tümör nedeniyle gerçekleşen ölümlerin % 31,3'ü gırtlak ve soluk borusu/bronş/akciğerin kötü huylu tümörü, % 8,9'u midenin kötü huylu tümörü, % 8,2'si lenfoid ve hematopoetik kötü huylu tümöründen kaynaklanmaktadır. % 6,9'u ise kolonun kötü huylu tümörü ve % 5,9'u pankreasın kötü huylu tümöründen kaynaklanmaktadır. Bu istatistikler de gösteriyor ki CRC Türkiye'de ölümlere sebep olan dördüncü kanser türüdür. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu'nun verilerine göre Dünya çapında CRC istatistiklerine bakarsak eğer, 2000 yılı için 10 milyon yeni kanser vakası, 6 milyon kanserden ölüm ve 22 milyon kanserli hasta hesaplanmıştır. En sık görülen kanserler akciğer (1.2 milyon), meme (1.05 milyon), kolorektal (945.000), mide (876.000) ve karaciğerdir (564.000).

Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan 2012 verilerine göre CRC'nin Türkiye'deki erkeklerde görülme sıklığı ilk beş kanser türünde dördüncü sıradadır. Dünya'daki erkeklerde görülme sıklığı ise ilk beş kanser türünde üçüncü sıradadır (IARC, 2012).

Türkiye'deki kadınlarda görülme sıklığına bakarsak ilk beş kanser türünde CRC üçüncü sıradayken, Dünya'da CRC'nin kadınlar da görülme sıklığı ikinci sıradadır (TUİK, 2009).

Amerika Birleşik Devletleri'nde durum daha ciddidir ve CRC en sık görülen 4., en sık ölüme neden olan 2. kanserdir. İnsanın hayatı boyunca CRC'ye yakalanma ihtimali % 6'dır. Ayrıca bu kanser türü büyük oranda 50 yaş üstü kişilerde görülmektedir.

CRC'nin ortaya çıkma nedenleri araştırılırsa eğer coğrafi bölge, yaş, kalıtımsal faktörler, beslenme, radyasyon, inflamatuar barsak hastalığı, sigara ve alkol tüketimi gibi nedenlerin ortaya çıktığı gözlemlenebilir.

CRC Dünya'nın farklı bölgelerinde farklı oranlarda görülmektedir. Bu durum da coğrafi bölgelerin hastalığın görülme sıklığında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin; Kuzey Amerika ve Yeni Zelanda'da bu rahatsızlığa sıklıkla rastlanabilinirken, Afrika ve Orta Amerika' da seyrek rastlanmaktadır (Dobrucalı, 2003).

Yaş unsurunun etkisine bakarsak CRC 50 yaş üstü insanlarda daha sıklıkla görülmektedir. Bu durum da yaş arttıkça CRC'nin görülme sıklığının arttığını gözler önüne sermektedir (Dobrucalı, 2003).

CRC'nin ortaya çıkmasında kalıtımsal faktörler büyük rol oynamaktadır. Diğer kanser tiplerinde olduğu gibi ailede kolon kanserli bireylerin bulunması CRC görülme riskini arttırmaktadır. Dobrucalı'ya göre (2003) bir insanın ailesinde kolon kanserli birey yoksa CRC'nin görülme riski % 5-6 civarındadır. En az bir tane birinci derece yakın akrabalarda CRC varsa, CRC görülme riski bu yüzdelik dilimin 2-3 kat daha fazlası olmaktadır. Daha fazla sayıda birinci derece yakın akrabada CRC görülüyorsa bu risk 4 kata kadar çıkmaktadır. İkinci veya üçüncü derece akrabalarda CRC varsa, CRC'ye yakalanma riski 1.5 kat artmaktadır (Dobrucalı, 2003).

Beslenme tarzının sindirim sistemiyle bağlantılı olan kolonu etkilediği düşünülmektedir. Yağlı yiyecekleri bol tüketen toplumlarda yapılan çalışmalar gösteriyor ki yağı az kalorisi düşük ve posalı yiyecekleri bol tüketenlerde CRC görülme riski % 50 daha azdır. Bu durumdan anlaşılacağı üzere bol yağlı besinleri tüketmek CRC riskini arttırmaktadır. Özellikle hayvansal yağları ve kırmızı eti bol tüketen toplumlarda risk fazlasıyla artmaktadır. Türkiye' de yapılan araştırmalara göre CRC görülme sıklığı İstanbul gibi nüfusu fazla olan bir şehirde % 2.4 iken, Karabük'te % 6, Şanlıurfa gibi nüfusu İstanbul'dan az ve hayvansal yağ ve kırmızı

etin çok tüketildiği toplumda % 2 olarak saptanmıştır (Dobrucalı, 2003; Uyanıkoğlu ve ark., 2005; Yücel ve ark., 2015).

CRC'de pelvik radyasyonu kolorektal kansere yakalanma riskini arttırmaktadır (Dobrucalı, 2003). Özellikle radyoterapi (ışın tedavisi) gören hastalarda ortalama 15 yıl sonra rektum kanseri görülebilmektedir (Dobrucalı, 2003).

İnflamatuar bağırsak hastalıkları (Ülseratif Kolitve Crohn gibi) bulunan bireylerde CRC'nin görülme riski fazladır. Bu hastalıklarda, kolon uzun bir zaman hastalıklı kalır. Chron hastalığını ele alırsak bu hastalığa sahip olan bireyler de CRC'ye yakalanma riski Chron hastalığı olmayan bireylere göre en az 4 en fazla 20 kat daha yüksek ihtimaldir. Chron hastalığına genç yaşta yakalanan bireylerde CRC'ye yakalanma ihtimali çok daha fazladır. Ayrıca yapılan araştırmalara göre Chron hastalığından dolayı CRC olan bireylerin yaklaşık % 50' lik bir kısmında chron hastalığı görülmeyen bölgelerde CRC'nin başladığı ve bu bölgelerden yayıldığı tespit edilmiştir (Dobrucalı, 2003).

Sigara tüketiminin daha çok akciğer kanserini tetiklediği düşünülse de yapılan araştırmalara göre uzun yıllar sigara kullanımı kolorektal kanser riskini arttırmaktadır. Aynı durum alkol tüketimi için de geçerlidir. Aşırı alkol tüketimi direkt karsinojen etki göstermese de tümörün büyümesine destekleyici nitelikte olabilir. Ayrıca DNA'nın mutasyona uğramasına sebep olup kanser oluşumuna davetiye çıkarabilir (Giovannucci, 2001; Zisman, 2006).

CRC taraması için mevcut stratejilerin yanı sıra teknolojinin gelişmesiyle farklı tarama programları da ortaya çıkmaktadır. Bu tür stratejilerin sayısı artsa da hepsi popülasyon programlarındaki testlerin taranması için gerekli kriterleri karşılamayabilir. CRC taramasında şuan en çok kabul gören üç test, dışkıda gizli kan testi (FOBT), kolonoskopi ve sigmoidoskopidir. Dışkıda gizli kan testi, dünya genelinde kolorektal kanserin taraması için en çok kullanılan yöntemdir. Dışkıya dökülen kolorektal kanser hücrelerinin DNA tetkiki yapılır. 3 genetik hedef (TP53, BAT26, ve K-ras) kullanılır (Traverso ve ark., 2002). İnvaziv olmaması ve düşük

maliyeti nedeniyle, nüfusun en çok kabul ettiği tekniklerden biridir (Binefa ve ark., 2014). Fakat bu tarama yönteminin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu test genelde kanama yapmayan poliplerin taranmasında iyi bir seçenek değildir. Testin yüksek dereceli poliplerden çok kansere karşı duyarlılığı daha fazladır. Kolonoskopi ise en iyi erken tanı yöntemlerinden biridir. Kolonoskopinin diğer tarama yöntemlerine göre birtakım avantajları bulunmaktadır. Bunlar: Kolonik mukozanın direk görülmesi, biyopsi olanağı, polip ve lokal tümörlerin çıkarılmasına olanak sağlamasıdır. Amerikan Gastroenteroloji Koleji kolonoskopinin en çok tercih edilen yöntem olduğunu belirtmiştir (Ex ve ark., 2009). Fakat kolonoskopi pahalı bir tetkiktir. Sigmoidoskopi ise kolonoskopiye göre fazla tercih edilmeyen bir yöntemdir çünkü küçük adenomlar sigmoidoskopide alınabilirken, 1 cm'den büyük adenomlar sigmoidoskopi sonrası yapılan kolonoskopide alınırlar (Doubeni, 2017).

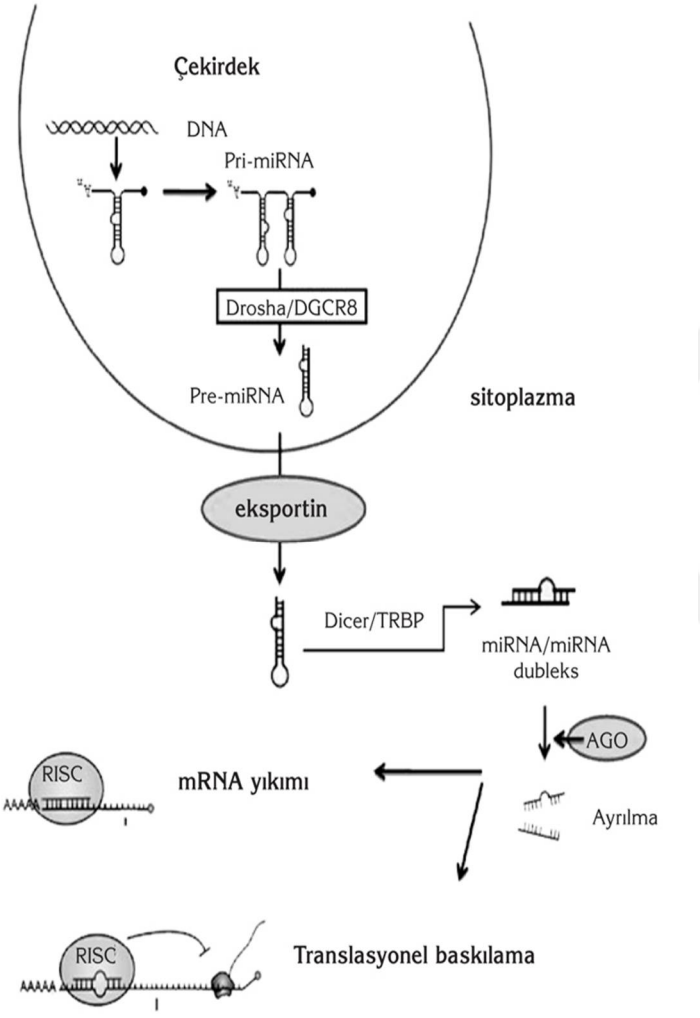
2.2. miRNA

miRNA'lar, ökaryotik genomik DNA ile kodlanmış, evrimsel olarak korunmuş, kodlamayan yaklaşık 20-23 nükleotid uzunluğunda RNA moleküleridir. miRNA'lar hakkında daha önce yapılmış bir takım çalışmalar olsa dahi, bu konu günümüzde güncelliğini kaybetmeyen ve hala araştırılmaya açık bir konudur. Günümüzde miRNA'ların hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve apoptoz da dâhil olmak üzere önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynadığı yapılan çalışmalarla belgelenmiştir (Bajan ve Hutvanger, 2014). Bu düzenleme genelde şöyle olmaktadır: miRNA, herhangi bir proteini sentezleyecek mRNA'ya bağlanarak onun translasyonu bloke eder, bu da mRNA'nın kısa bir süre sonra parçalanmasına sebep olur (Mazeh ve ark., 2013; Kisseljov., 2014). Şimdiye kadar 700'den fazla miRNA dizisi insan genomunda tespit edilmiştir. Daha fazla miRNA ise doğrulanmayı beklemektedir (Slaby ve ark., 2009). Bir miRNA'nın anormal ekspresyonu farklı kanser türlerini de içeren çeşitli hastalıklara neden olabilir (Bajan ve Hutvanger, 2014). CRC bu hastalıkların başında gelmektedir. Bazı miRNA'ların kanserli dokuda aşırı ekspresyonu görülürken bazılarının aynı dokuda düşük seviyede ekspresyonu görülebilmektedir. Bir mikro RNA bir kanser türünde aşırı eksprese edilirken bir başka kanser türünde düşük eksprese edilebilir. Bu durum da miRNA'ların bir

belirteç görevi üstlenmesine sebep olmuştur ve bu küçük RNA'lar dikkatleri üzerlerine çekmeyi başarmıştır.

Lee ve ark. (1993), Caenorhabditid adı verilen yuvarlak bir solucan türüyle yaptığı çalışmalar sonucunda lin-4 adı verilen genin küçük, kodlamaya girmeyen bir RNA'nın transkripsiyonunu gerçekleştirdiğini belirttiler. Fakat henüz bu tarihte bu küçük kodlamaya girmeyen RNA molekülünün ismi konulmamıştır. Daha sonra 2000 yılında Reinhart ve arkadaşlarının C. elegans' da yaptığı çalışmalar sonucunda farklı bir mikro RNA olan let-7'nin keşfi gerçekleşmiştir (Reinhart ve ark., 2010). Keşfedilen miRNA türleri let-4 ve let-7 ile sınırlı kalmamış ve neredeyse tüm çok hücreli canlılarda bu küçük RNA'lara rastlanmıştır; fakat miRNA ismi ilk defa 2001 yılında verilmiştir (Lagos-Quintana ve ark., 2001; Saydam ve ark., 2011). MikroRNA'ların bir dokunun kanserleşmesine etkisi ise ilk olarak Calin ve arkadaşları tarafından 2001 yılında tespit edilmiştir. Calin ve arkadaşları Lösemi hastalarında yaptıkları çalışmalar sonucu bazı mikro RNA'ların (miRNA-15a ve miRNA-16-1) ekspresyonun çok düşük olduğunu tespit etmiştir (Calin ve ark., 2002). Dr. Calin'in grubu, sıklıkla CLL'de (kronik lenfosittik lösemi) silinen kromozom 13q14'deki kritik bölgenin protein kodlayan bir tümör baskılayıcı gen içermediğini ancak miRNA-15a ve miRNA-16-1 adlı iki miRNA geninin aynı mikro-polisistronik RNA'da ifade edildiğini belirtti (Calin ve ark., 2002; Carol ve Croce, 2009). Birkaç yıl sonra bilinen tüm miRNA genlerini eşlediler ve birçoğunun birçok farklı insan tümöründe silme veya amplifikasyon gibi kromozomal değişikliklerle ilgili genom bölgelerinde bulunduklarını keşfettiler (Lorio ve Croce, 2012). Bu keşif, kodlayıcı olmayan genlerin kanser gelişimine katkıda bulunduğunu ve tümörlerde miRNA kaybı veya amplifikasyonunun daha yakından araştırılmasının gerekliliğini gösterdi (Lujambio ve Lowe, 2012). Daha sonra Michael ve ark. (2003), miRNA'ların kanser hücrelerinde farklı şekilde eksprese edildiğini gösterdi. Michael ve arkadaşları, kanserde mikro RNA araştırmalarına farklı bir boyut kazandıracak gözlemlerini rapor etmişlerdir. Raporlarına göre, insanlardaki katı kanser dokularında normal dokulara göre farklı seviyelerde miRNA'nın eksprese edildiği tespit edilmiştir (Michael ve ark., 2003). Lu ve ark. (2005), embriyonik soy ve farklılaşma durumlarını baz alarak miRNA'ların ekspresyon profillerinin kanser

türlerini doğru bir şekilde sınıflandırabildiklerini göstermiştir. Toplamda, bu bulgular insan kanserinde miRNA biyolojisinin önemi ile ilgili ilk anahtar bilgileri sağlamıştır.



DGCR8: DiGeorge sendromu kritik bölge 8, TRBP: Transaktive edici yanıt oluşturan RNA bağlanma proteini, AGO: Argonaute, RISC: İndüklenmiş RNA-susturma kompleksi.

Şekil 2.1. miRNA'nın biyogenezi (Zamani ve Zamani, 2013)

miRNA'ların oluşum sürecini incelersek, bir miRNA'nın 2 aşamada oluştuğunu gözlemleyebiliriz. Nükleer ve ardından gelen sitoplazmik bölünme olayları, iki ribonükleaz III endonükleaz, Drosha ve Dicer tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2.1) (Lee ve ark., 2002; Denli ve ark., 2004). Daha detaylı incelenecek olunursa ilk olarak miRNA'lar çekirdekte RNA polimeraz 2'nin yardımıyla genomik

DNA'dan primer transkript (pri-miRNA) olarak sentezlenir. Daha sonra RNA polimeraz 3 ailesine ait olan DGCR8 ve Drosha'dan oluşan mikro işlemci kompleksi tarafından primer miRNA, prekürsör miRNA (pre-miRNA) haline getirilir. Pre-miRNA'lar, Exportin 5 ve Ran-GTP'yi içeren bir nükleositoplazmik taşıyıcı ile sitoplazmaya gönderilir (MacFarlane and Murphy, 2010). Sitoplamazda DİCER adlı RNAaz III enzim ailesine ait olan enzim, RISC adı verilen ve RNA ile tetiklenen susturma kompleksinin oluşumunu başlatırken bir yandan pre-miRNA'ları keserek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA dubleksine çevirir (Zhang ve ark., 2002; Lund ve ark., 2004; Saydam ve ark., 2011). Daha sonra, RNA dubleksinin en zayıf baz çifti 5' ucunda bulunan iplikçiği olarak tanımlanan kılavuz iplikçiği (guidestrand) seçilip Argonaute (Ago) proteine dahil edilir. Diğer iplikçik ise degrede olur. Ago proteinine dahil edilen miRNAi plikçiği olgunlaşır ve mRNA'yı yıkarak veya mRNA'nın protein translasyonunu baskılayarak genlerin regülasyonunu sağlar. Argonaute proteinleri, miRNA'ların gen düzenlemesinde gerekli olan etkili proteinlerdir ve sadece bir miRNA yüklü olan bir argonaute proteini en küçük RISC kompleksini oluşturabilir (Lund ve ark., 2004; Gregory ve ark., 2005; Saydam ve ark., 2011). miRNA biyogenez yolağının her adımı oldukça kontrollüdür ve tümör baskılayıcı ve kanserojen proteinlerini de içeren, hastalıkta rol alan birkaç proteinin bu işlemi düzenleyen işlevleri vardır. Bu proteinler tüm miRNA'ların işlenmesine müdahale eder veya bir takım miRNA'ların üretimini kolaylaştırır ve / veya inhibe eder. Ayrı ayrı miRNA'ların işlenmesini özellikle düzenleyen yardımcı protein faktörleri de vardır.

Gen ekspresyonunun miRNA'lar tarafından kontrolü artık neredeyse kanser hücreleri de dahil tüm hücrelerde görülen bir olaydır. Farklı kanser hücrelerinin miRNA ekspresyon seviyeleri de farklıdır ve bu veriler kanserin sınıflandırılmasında, iyileştirilmesinde ve davranışlarının öngörülmesinde kullanılabilir. Ayrıca çalışmalar miRNA'ların kanserin yayılmasına ve ilerlemesine de ciddi şekilde sebep olan kanser sürücüleri (Canser Drivers) gibi davrandıkları tespit edilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi, miRNA'lar onlarca ila yüzlerce hedef geni düzenleyebilme kapasitesine sahiptir ve bu sebeple kanseri kontrol etmede çok önemli faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır (Lujambio ve Lowe, 2012).

Kanserin, onkogenlerde ve tümör baskılayıcılarda genetik değişiklikler sonucu oluştuğu bilinmektedir(Esquela-Kerscher ve Slack., 2006; Zhang ve ark., 2007). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların tümör oluşumuna ve gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir, bu da miRNA'ların onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir (Chen, 2005; Esquela-Kerscher ve Slack., 2006; Zhang ve ark., 2007; Spizzo ve ark., 2009; Ventura ve Jacks, 2009).

miRNA'lar, mesajcıRNA'lara bağlanarak onların translasyonunu olumsuz şekilde etkiler. Birçok çalışma, miRNA'ların hücrenin büyümesinde ve apoptoziste rol aldığını göstermektedir (Zhang ve ark., 2006). miRNA'lar tümörlerin baskılanmasını sağlayabilir veya tümörlerin baskılanmasının engellemesine sebep olabilir. Tüm bunlar göz önüne alınırsa miRNA'lar mRNA'ların hedefledikleri özelliğe göre onkogenik veya tümör baskılayıcı ismini kazanırlar. Tümör baskılayıcı ve onkogen olarak çalışan gen sınıfları, yakın zamanda, miRNA ailesini içerecek şekilde genişletilmiştir. miRNA'lar sağlıklı dokularda onkogenlerin translasyonunu inhibe ederken, kanserli dokularda kanserin metastazını artırıp, apoptozun engellenmesini sağlar, tümörün yayılmasını tetikler ve kanserin gelişmesine katkıda bulunur (Murakami ve ark., 2006; Cowland ve ark.,2007; Saydam ve ark., 2011). Tümöre özgü miRNA ekspresyon seviyelerinin incelenmesi, bu moleküllerin çeşitli kanserlerde yaygın şekilde düzenlenmesini ortaya çıkarmıştır. miRNA'ların tümörigenezde önemli rolleri olduğu yapılan çalışmalara göre açıktır. Mevcut kanıtlar, bu moleküllerin klasik onkogenlerle ve MYC, RAS ve p53 gibi tümör baskılayıcılarla düzenlenen hücresel yolaklarla iç içe geçmiş olduğunu açıkça göstermektedir. Artık kanser hastalığında miRNA'ların da incelenmesi bu hastalık grubunun tam olarak anlaşılabilmesi için gereklidir (Kent ve Mendell, 2006).

Kısacası, bir miRNA'yı onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak sınıflandırabilmemiz için şu kanıtlar yeterlidir:

1. Çeşitli kanser türlerinde yaygın düzensizlik gösteren verilerin olması,
2. Delesyon, amplifikasyon veya mutasyona bağlı olarak tümörlerde miRNA fonksiyonunun kazancı veya kaybı,

3. Hayvan denekleri kullanılarak tümör baskılayıcı veya tümörü teşvik edici davranışların doğrudan kaydedilmesi,
4. miRNA'nın onkogeneze katılma mekanizmalarını aydınlatan kanserle ilgili hedeflerin tanımlanması ve doğrulanması (Kent ve Mendell, 2006).

Onkogenik ve tümör baskılayıcı olarak miRNA'ların ortaya çıkışı büyük ilgi görmesine rağmen, miRNA'lar hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu nedenle, miRNA'lar ve kanserle olan ilişkileri konusundaki bilgi birikiminin artması için, onkogenik ve tümör baskılayıcı miRNA'ları büyük ölçekte araştırmak önemli hale gelmektedir (Wang ve ark., 2010). Çünkü, gelecekte miRNA'ların tümör tanısı ve prognozu için biyolojik belirteç (Spizzo ve ark., 2009) veya terapötik hedefler olarak görev yapabileceği düşünülmektedir (Esquela-Kerscher ve Slack., 2006; Zhang ve ark., 2007; Wang ve ark., 2010).

Tümörlerde ekspresyonu yüksek olan miRNA'lara onkogenik miRNA adı verilir ve onkomiR olarak da adlandırılır. Tahmin edileceği gibi tümörle ilişkili olan miRNA'lar tümörle ilgili olan protein kodlama genlerini düzenlemektedir (Papadopoulos ve ark., 2009). OnkomiR'ler tümör baskılayıcı genleri veya apoptozisi kontrol eden genleri baskılayarak tümörlerin yayılması ve gelişmesine destek olur. Araştırmalara göre kanser hücrelerinde ekspresyonu yüksek olan birden fazla onkogenik miRNA tespit edilmiştir. Örneğin, miRNA-155 protein kodlamayan BIC geni ile birlikte ifade edilen, henüz hangi mRNA'yı hedeflediği belli olmayan ve onkogenik miRNA olduğu ilk keşfedilen bir miRNA'dır. Yapılan çalışmalar, bu miRNA'nın ekspresyonunun tavukta lösemi ve lenfoma oluşumunu artırdığını göstermiştir. Yakın tarihte yapılan çalışmalarda özellikle meme ve pankreas kanserinde bu miRNA'nın ekspresyon seviyesinin arttığını ve daha çok onkogenik miRNA gibi davrandığını kanıtlar niteliktedir (Tam ve ark., 1997; Lorio ve ark., 2005; Gironella, 2007; Lin ve ark., 2010; Saydam ve ark., 2011).

miRNA-155'in dışında miRNA-21 ve miRNA-17-92 gen kümesi de onkogenik miRNA sınıfındadırlar. Yapılan çalışmalara göre miRNA-21'in pankreas, prostat, mide, kolon, akciğer, meme ve karaciğer kanseri gibi faklı kanser türlerinde yüksek

seviyede ekspresyonu gözlenmiştir. (Calin ve ark., 2005; Ciafrè ve ark., 2005 Volinia ve ark., 2006 Meng ve ark., 2007; Garzon ve ark., 2008). Ayrıca, miRNA-21'in invazyon ve metastaz olaylarında aktif olarak görev aldığı belirlenmiştir. MiRNA-21 bu olayı PTEN adlı proteinin translasyonuna vesile olan mRNA'ya müdahale ederek gerçekleştirmektedir. Çünkü PTEN, insan malignitelerinde sıklıkla mutasyona uğrayan veya silinen iyi tanımlanmış bir tümör baskılayıcı proteindir (Sulis ve Parsons., 2003).

Bu tezin yazılmasına vesile olan çalışmada da bahsedildiği gibi miRNA-21 CRC'de de onkomiR olarak görev alır ve PDCD4 genini baskılar. Sonuç olarak bu durum kanserin yayılmasına ve ilerlemesine sebep olur (Kent ve Mendell, 2006; Löffler ve ark., 2007; Meng ve ark., 2007).

Daha önce bahsedildiği gibi miRNA-17-92 adlı gen kümesinin de onkogenik miRNA olarak meme, kolon, akciğer, pankreas, prostat, mide ve lenfoma kanserlerinde görev aldığı görülmektedir. MiRNA-17-92 gen kümesi kanserin yayılması ve ilerlemesini iki adet mekanizmayla gerçekleştirilmektedir. Bu mekanizmalardan ilki ve en göze çarpanı miRNA-17-92 gen kümesinden kodlanan pri-miRNA'nin transkripsiyonel aktivasyonudur. İkincisi ise miRNA-17–5p, miRNA-18a, miRNA-19a, miRNA-20a, miRNA-19b-1 and miRNA-92 adlı potansiyel onkogenik miRNA'ları kodlayan 13q31 genomik lokusunun amplifikasyonunu arttırmaktır (He ve ark., 2005; Kent ve Mendell, 2006; Mendell, 2008). Ayrıca miRNA-92, CRC'de miRNA-17-92 kümesinin kilit onkojenik bir bileşenidir (Tsuchida ve ark., 2011).

miRNA'lar, onkogenik aktiviteye sahip farklı proteinlerin aşağı (down) regule olmasına sebep olabilir (Shenouda ve Alahari, 2009). Yapılan çalışmalar, normal dokularda miRNA'lardan bazılarının potansiyel onkogen olma özelliği gösteren genlerin translasyonunu engellediğini göstermiştir. Görevleri bir onkogenin ekspresyonunu azaltmak olan bu miRNA'lar "tümör baskılayıcı miRNA'lar" (TSmiR) olarak adlandırılır (Murakami ve ark., 2006; Cowland ve ark., 2007; Saydam ve ark., 2011).

miRNA'ların tümör baskılayıcı etkisi ilk olarak Cimmino ve arkadaşları tarafından kronik lenfositik lösemi rahatsızlığına sahip bireylerde yapılan çalışmalar sonucunda miRNA-15a ve miRNA-16-1'in düşük seviyelerinin kontrolsüz bir şekilde hücre gelişimine etkilerinin olduğunu, normal seviyelerinin ise tümörlerin apoptoza uğramasını sağladığını tespit etmeleriyle ortaya çıkmıştır. miRNA-15a ve miRNA-16-1'in yokluğu BCL2 adlı anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteinin işlevini olumsuz şekilde etkilemektedir. Bu durum da bu iki miRNA'nın tümör baskılayıcı olarak görev alabildiğini gözler önüne sermiştir (Cimmino ve ark., 2005; Kent ve Mendell, 2009; Saydam ve ark., 2011).

Slack ve ark. (2005), tümörlü akciğer dokularında yaptığı çalışmalar neticesinde, let-7 ailesinin üyelerinin RAS onkogeninin ekspresyonunu olumsuz bir şekilde düzenlediğini keşfetmişlerdir. Yapılan çalışmalar let-7 ailesinin üyelerinin yokluğunun, bir onkogen olan RAS'ın aşırı ekspresyonu ile sonlandığını gözler önüne sermiştir. Kısacası, bu miRNA'ların kaybedilmesi, RAS ve BCL2'nin malin transformasyonuna katkı sağlayabilir. Daha yakın zamanlarda, bu miRNA'ların diğer hedefleri keşfedilmiştir ve kanser patogenezindeki rollerine ek kanıtlar sağlanmıştır. Örneğin, let-7'nin, çeşitli insan tümörlerinde disregüle edilmiş bir gen olan HMGA2'yi hedef aldığı bulunmuştur (Pasquinelli ve ark., 2000; Croce, 2009).

Geçmişte yapılan çalışmalar miRNA-29 ve miRNA-143 gibi farklı miRNA'ların da tümör baskılayıcı gibi davranabileceğini gözler önüne sermiştir (Karagün ve ark, 2013). Ayrıca bu çalışmada da incelenen miRNA-145'in ve miRNA-192'nin kolon kanserli hücrede normal hücreye göre daha az eksprese edildiği gözlenmiştir (Chiang ve ark., 2012; Ye ve Cao, 2014).

2.3. Kolon Kanseri ve miRNA

CRC ile miRNA'ların ilişkisine bakılırsa Michael ve ark. (2003), miRNA ekspresyon seviyelerinin CRC'de değiştiğini bulan ilk araştırma grubu oldu. Bu takım miRNA-143 ve miRNA-145'in CRC'de ekspresyonlarının azaldığını ve bu miRNA'ların tümör baskılayıcı olarak görev aldığını öne sürdü. Yapılan çalışmalar,

bazı miRNA'ların kolon kanserli hücrelerde ekspresyonunun bastırıldığını göstermektedir. Bununla birlikte, miRNA'ların bir kısmının ekspresyonun CRC'de arttığı tespit edilmiştir. CRC'de miRNA'ların ekspresyon seviyeleri üzerinde son zamanlarda yapılan incelemeler, 164 değişik miRNA'nın yarısından fazlasının tümörlerde ekspresyonlarının arttığını özetlemektedir. Bir dizi çalışma, miRNA-21'in CRC'de oldukça önemli olduğunu, bu miRNA'nın kanserin ilerlemesi ve metastazında önemli rollere sahip olduğunu bildirmektedir. CRC'de ekspresyonu değişen diğer miRNA'lar ise miRNA-29a, miRNA-17-92 kümesi, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-181b, miRNA-31, miRNA-183, miRNA-135, miRNA-200a / b / c ailesidir. (K.Hur ve ark., 2013).

Araştırmacılar gen ekspresyonuna miRNA seri analizi (miRAGE) adı verilen deneysel bir yaklaşım geliştirdi ve bu yaklaşımı insan miRNA'larının en büyük deneysel analizlerinden birini gerçekleştirmek için kullandı. İnsan kolorektal hücrelerinden alınan 273.966 küçük RNA etiketinin dizilim analizi, 200 bilinen olgun miRNA, 133 yeni miRNA adayı ve 112 önceden tanımlanmamış miRNA formlarını tanımlamalarını sağladı. Araştırmacılar, aday miRNA'ların değerlendirilmesine yardımcı olmak için üç insan CRC hücre dizisinde Dicer loküsünü bozdu ve bu hücrelerdeki önceden bilinen ve yeni keşfedilmiş miRNA'ları incelediler. Bu çalışma, insan genomunun hâlihazırda tanımlananlardan çok daha fazla miRNA içerdiğini göstermektedir (Griffiths-Jones, 2004).

Bandres ve ark. (2006)' da RT-PCR kullanarak CRC dokularında 156 miRNA'nın ekspresyonunu incelemişlerdir. Bu çalışma ile ekspresyonları CRC tümöründe değişen 13 adet miRNA tipinin tanımlanmasını sağlanmıştır. Deregülasyonu en belirgin olan miRNA'lar; miRNA-31, miRNA-96, miRNA-135b, miRNA-183 (kolon kanserli hücrelerde normal hücrelere göre fazla ekspresyonu olan miRNA'lar) ve miRNA-133b, miRNA-145 (kolon kanserli hücrelerde normal hücrelere göre daha az ekspresyonu olan miRNA'lar)' dır. Ayrıca miRNA-31'in ekspresyon seviyesi CRC tümörünün evresi ile pozitif korelasyon göstermiştir. RT-PCR yöntemi ile elde edilen bu sonuçlar, miRNA ekspresyon seviyelerinin

kolorektal neoplazinin biyolojik ve klinik davranışı ile ilgisi olduğunu ortaya koymaktadır.

Araştırmacılar CRC de dâhil olmak üzere katı kanserlerden 540 örnek üzerinde miRNA ekspresyon seviyelerinin geniş ölçekli bir analizini yapmışlardır. Bu analiz sonucunda ekspresyonu yüksek olan miRNA'ların büyük bir bölümünden oluşan katı bir kanser miRNA işareti tespit etmişlerdir. Bu miRNA'lar arasında miRNA-17-5p, miRNA-20a, miRNA-21, miRNA-92, miRNA-106a ve miRNA-155 çok iyi karakterize edilmiş kanser ilişkileri olan miRNA 'lardır (Cummins ve ark., 2006).

Monzo ve ark. (2008), insan embriyonik kolon dokusundaki olgun miRNA'ların ekspresyonunu kolorektal kanserli dokuda ve normal kolon dokusunda değerlendirdi. Embriyonik kolon mukoza ve CRC arasında birbiriyle örtüşen miRNA ekspresyonları tespit edildi. Örneğin; miRNA-17-92 kümesi ve onun hedefi olan E2F1, insan kolon gelişiminde ve CRC oluşumunda hücre çoğalmasını düzenleyen benzer bir ekspresyon modeli sergilemektedir. Sonuç olarak miRNA yolaklarının hem embriyonik gelişimde hem de kolonik epitelin neoplastik transformasyonunda önemli bir rol oynadığına karar verilmiştir (Monzo ve ark., 2008).

Önceki çalışmalar incelendiğinde sadece CRC'de değil, çeşitli kanser türlerinde de miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi ile ilgili ülkemizde ve Dünya'da birçok çalışma mevcuttur. Bu konuda çalışılmış olan kanser türleri kolorektal, prostat, meme, mesane, lösemi, over kanseri, safra kesesi kanseri vb. olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu konu hakkında daha önce üzerinde çalışılmış olan bir kanser türü meme kanseridir. Erkeklerde en sık görülen kanser türü prostat kanseriyken, kadınlarda bu kanser türünün yerini meme kanseri almaktadır. Mevcut kanser tedavi yöntemlerinin yetersizliğinden dolayı miRNA ile ilgili çalışmalar meme kanserinin tanı ve tedavisi açısından umut verici olmaktadır (Demir, 2008). Meme kanseri ile ilgili çalışmalarda miRNA-21 ve miRNA-29b2'nin tümörlü dokuda normal dokuya göre ekspresyon seviyelerinin artmış olduğu görülmektedir. miRNA-125b, miRNA-145, miRNA-10b,

miRNA-155, miRNA-17-5p ve miRNA-27b gibi miRNA türlerinin ise tümörlü dokuda normal dokuya göre ekspresyon seviyelerinin düştüğü gözlemlenmektedir (Küçükhüseyin ve Öztürk, 2013). Başka bir çalışmada, miRNA-125a'nın meme kanseri için araştırılması gereken önemli bir miRNA türü olduğunu belirtmiş ve miRNA-125a'nın fonksiyonunun tam olarak tespiti için analiz yapılması gerektiğini belirtmiştir (Demir, 2008).

Mesane kanseri gelişmiş ülkelerde en sık görülen ikinci kanser türlerinden biridir. 2010 yılında, Cantürk tarafından 17 tümörlü ürotelyal doku örneği ve 6 normal mesane dokusu örneği üzerinde yapılan çalışmalara göre miRNA-143, miRNA-145, miRNA-125b, miRNA-99a, miRNA-133b, miRNA-100, miRNA-497, miRNA-139-5p'nin tümörlü dokuda normal dokuya göre ekspresyonunun daha düşük olduğu tespit edilmiştir. miRNA-18a'nın ekspresyon seviyesinin ise tümörlü dokuda normal dokuya göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Schee ve arkadaşlarına göre CRC'de cerrahi işlem, kemoterapi, radyoterapi gibi gelişmiş tedavi yöntemlerine rağmen hala erken tanı ve kişisel tedavi oldukça önem arz etmektedir. İşte tam da bu nokta da yeni biyolojik belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. miRNA bu konuda bilim insanlarına yeni bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmıştır (Schee ve ark., 2010; Yaroğlu ve ark., 2011). Yapılan çalışmalara göre miRNA-143 ve miRNA-145'in CRC' ye sahip tümörlü dokuda normal dokuya göre ekspresyonu seviyesinin düşük olduğu gözlemlenmiştir (Schee ve ark., 2010).

Prostat kanserinde de diğer kanser türlerinde olduğu gibi benzer çalışmalar yürütülmüştür. Prostat kanseri sıklıkla erkeklerde görülen yaygın kanser türlerinden biridir. Prostat kanseri ciddiye alınması gereken bir kanser türüdür çünkü kanserin hasta da tekrar görülme olasılığı vardır ve güncel tedavi yöntemleri bu kanserin etkisinin azaltılmasında yetersiz kalmaktadır. Bu sebeple bu kanserin düzenlenmesinde etkisi olan miRNA seviyelerinin belirlenmesi kanserin tedavisinde yeni yöntemlerin ortaya çıkmasına vesile olacaktır. Prostat kanserinde miRNA gen ekspresyon seviyelerine bakılırsa miRNA-145'in ekspresyonunun prostat kanserinde normal dokuya göre ciddi düşüş yaşadığı gözlenmiştir (Sevli ve ark., 2010).

Lösemi yani kan kanserinde de miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Öztunç'un 2012 yılında yaptığı çalışmaya göre, T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) sahibi hastaların timositlerinde eksprese edilen miRNA-223 miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha yüksektir. Bu da miRNA-223'ün T hücreli lösemi serilerinde onkogenik miRNA gibi davrandığını göstermektedir. Ayrıca yapılan çalışmalara göre T hücreli lösemi serilerinde B hücreli lösemi serilerine göre miRNA-223'ün ekspresyon seviyesi daha yüksektir ve T hücreli lösemi serisinin aksine B hücreli lösemi serisinde miRNA-223 ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre daha azdır. Bu durumda miRNA-223'ün T hücresine özel olduğu ve T hücrelerinde kanser yapıcı etkisinin olabileceğini gözler önüne sermektedir (Öztunç, 2012).

CRC ile ilgili 2013 yılında yapılan bir çalışmada, "Türkiye' de yaşayan ve ailesinde daha önce bu rahatsızlığa yakalanmamış, 50 yaş altında kolorektal kanser tanısı almış bireylerin tümör dokularında, kolorektal kanser sürecinde rol alabileceği düşünülen 38 farklı miRNA' nın ekspresyon profilleri incelendi. Değerlendirilen hasta grubunun tümör dokuları ile normal dokuları kıyaslansığında, miRNA-143' ün ekspresyon seviyesinde anlamlı düşüş gözlendi. Normal doku ile kıyaslandığında, 4. Evredeki tümör dokularında, miRNA-106a ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu gözlemlendi" (Ak, 2013).

Safra kesesi kanseri ile ilgili de Leteiler ve arkadaşları benzer çalışmalar yürütülmüştür. Yapılan çalışmalara göre miRNA-1 ve miRNA-145 safra kesesi tümörlü dokularda normal dokuya göre ekspresyon seviyesinin düşük olduğu tespit edilmiştir (Leteiler ve ark., 2014).

CRC ile ilgili yapılan başka çalışmalara göz atılırsa Cekaite ve ark. (2015)' na ait derleme bizi aydınlatır niteliktedir. Cekaite ve arkadaşlarının yazdığı bu derleme, kolorektal kanserdeki CRC mevcut miRNA bilgisini özetler niteliktedir. Bu bilgiler, büyüme regülatörleri olarak rolleri, miRNA'ların kendi kendilerini düzenlediği mekanizmalar ve miRNA'ların biyolojik belirteç olma potansiyeli gibi. Gen

ekspresyonun, kısmen, miRNA'lar tarafından düzenlendiğini biliyoruz. CRC hastalarından alınan binlerce doku örneği ve vücut sıvısı miRNA'ların biyolojik belirteç potansiyeline sahip olup olmadığı konusunda araştırılmış olsa da bu hastalık için tek bir miRNA veya miRNA ifade işaretleri klinikte kullanılmamaktadır. CRC'de 500'den fazla miRNA hedef çiftleri tanımlanmıştır ve Cekaite ve arkadaşlarının yazdığı derlemede düzenleyici nodların CRC'nin ilerlemesindeki sinyal yollarını nasıl birbirine bağladığı ve etkilediği tartışılmıştır.

Sonuç olarak kanserli dokularda miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve hedefledikleri mRNA'ların değerlendirilmesi ile miRNA'ların kanserin erken tanısında ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli faydalar sağlayacağı düşünülmektedir.

2.4. miRNA Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Yöntemler

Northernblot, mikroarray ve PCR miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan yöntemlerdir. 1977 yılında James Alwine, David Kemp ve George Stark'ın Northern Blot teknolojisini geliştirmesi, 1981 yılında ilk bilgisayarlı görüntü temelli orijinal nükleik asit array analizinin yayınlanması (Taub ve ark., 1983) ve 1985 yılında PCR teknolojisinin keşfedilmesi ile moleküler mikrobiyolojik çalışmalar dikkate değer bir değişim göstermektedir (Saiki ve ark., 1985).

Northern Blot yöntemi, bir örnekte RNA'nın (veya izole edilmiş mRNA'nın) tespit edilmesiyle gen ekspresyonunu incelemek için moleküler biyoloji araştırmasında kullanılan bir tekniktir (Kevil ve ark., 1997; Alberts ve ark, 2008). Bu yöntem ayrıca MiRNA'ların, pre-miRNA'ların, siRNA'ların son derece yüksek çözünürlüklü tespiti için kullanılmaktadır (Koscianka ve ark., 2011).

Bu teknik 1977 yılında James Alwine, David Kemp ve Stanford Üniversitesi'nden George Stark tarafından geliştirilmiştir (Alwine ve ark., 1977). Northern blot yöntemine bu isim, ilk bulunan blotting tekniği olan Southern blot

tekniği ile analoji olması amacıyla verilmiştir. (Albert ve ark., 2008) Southern Blot tekniği ve Northern Blot tekniği arasındaki temel fark Sourthern Blot'ta analiz için DNA kullanılırken Northern Blot'ta RNA kullanılmaktadır (Bor, 2006).

Northern Blot yöntemiyle, hem morfogenez sırasında hem de hastalık durumlarında gen ekspresyon oranlarını belirleyerek hücresel yapıyı ve fonksiyonu gözlemlemek mümkündür (Schlamp ve ark., 2008). Northern blot yönteminde RNA numuneleri boyutlarına göre elektroforez yöntemi ile ayrılır ve bu numuneler hibridizasyon probu yardımıyla tespit edilir (Kevil ve ark., 1997).

Gen ekspresyon analizi northern blot yönteminin yanı sıra RT-PCR, mikroarray, RNA-Seq, gibi birkaç farklı yöntemle yapılabilir (Schlamp ve ark., 2008). Bu yöntemlerden biri olan mikroarray yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve genellikle northern blot yöntemi ile elde edilen verilerle tutarlıdır. Ancak bazen northern blot, mikroarray yönteminin yanı sıra gen ekspresyonundaki küçük farklılıkları da tespit edebilmektedir (Taniguchi ve ark., 2001). Northern blot yönteminin bir dezavantajı ise genellikle aynı anda bir veya az sayıda gene bakabilmesidir. Mikroarray yöntemi ise northern blot yönteminin aksine aynı anda binlerce genin görselleştirilebilmesini sağlar (Kreft ve ark., 2000).

Gen ekspresyonu çalışmaları için eskiden mevcut olan teknikler yapılan çalışmaları çok fazla sınırlamaktaydı. Çünkü bu teknikler araştırmacıların tek seferde yalnızca bir veya birkaç geni çalışmasına izin veriyordu. Bununla birlikte, yakın zamanda geliştirilen DNA mikroarray tekniği, araştırmacılara on binlerce genin ekspresyon profillerini kısa sürede analiz etme olanağı sağlayan güçlü bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Schena ve ark., 1995). DNA mikroarrayi (DNA çipi veya biyoçip), katı bir yüzeye tutturulmuş mikroskobik DNA spotlarının bir toplamıdır. Bir mikroarray'de bu spotlardan on binlerce bulunabilir. Her DNA spotu prob adı verilen genellikle 20-100 nükleotid uzunluğunda belirli bir DNA sekansına sahiptir (Taub ve ark., 1983). Array üzerinde bulunan bu DNA dizileri üzerine laboratuarda hazırlanmış cDNA'lar uygulanır. cDNA komplementerini bulduğu

noktada hibridize olur ve floresans sayesinde bu noktayı görünür kılar. Array üzerindeki her bir nokta ayrı bir deney olarak yorumlanır (Yoltaş ve Karaboz, 2010).

Mikroarray teknolojisinin ortaya çıkışı Southern Blot tekniğinin geliştirilmesinden sonra olmuştur. Southern blot tekniğinde, elektroforez ile ayrılmış DNA fragmanları bir filtre zarına aktarılır ve ardından bilinen bir gen ya da fragman ile hazırlanmış problarla olan hibridizasyon olayı sonucunda yeni fragmanlar algılanır. Mikroarray tekniğinde membran yerine camın kullanılması , radyoaktivitenin yerini floresans işaretlerin alması ve bağlanmayı sağlayacak yöntemlerin hassaslaşmasıyla çalışmaların verimi ve elde edilen bilgilerin miktarı Sourthern Blot yöntemine göre artmıştır (Lipshutz ve ark., 1995).

Mikroarray teknolojisi son zamanlarda hızlı bir teknik olması ve tek seferde birden fazla verinin analizinin yapılması açısından avantajlıdır (Lucchini ve ark., 2001). Bu sebeplerden araştırmacıların gözde tekniklerinden biri olsa da birtakım dezavantajları da mevcuttur. Öncelikle mikroarray pahalı bir yöntemdir ve tek seferde birden fazla verinin analizi yapıldığı için hataların ortaya çıkmasına müsait bir tekniktir. Ayrıca çip üretimi esnasında birtakım hataların yapılabileceği ve bu hataların sonuçları olumsuz etkileyeceği açıktır. Mikroarray tekniği gelişmekte olana ve hata çıkma ihtimalinin yüksek olduğu bir tekniktir. Bu sebeple bu tekniği uyguladıktan sonra PCR, Northern Blot analizi ve RNAz koruma analizleri yapılmalıdır (Lucchini ve ark., 2001). Fakat ne yazık ki, mikroarray sonuçlarının validasyonunun yapıldığı çalışma sayısının az miktarda olduğu görülmektedir. Ne yazık ki, birçok araştırmacı, PCR, Northern blot analizi ve RNAz koruma analizi gibi diğer geleneksel gen ifade teknikleriyle sonuçlarını doğrulamadan mikroarray verilerini bildirmektedir (Kothapalli ve ark., 2002). Bu da güvenirliliği düşük olan sonuçların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.

PCR, ilk kez resmi olarak 1985 yılında American Society of Human Genetics Konferansı'nda sunulmuştur ve aynı yıl bu teknikle orka hücre anemisinin tespiti yapılarak ilk klinik uygulama yayınlanmıştır (Saiki ve ark., 1985). İlk zamanlar PCR, kullanması zor ve emek isteyen bir teknikti. Fakat, termostabil DNA

polimerazların izolasyonu ve saflaştırılmasının ortaya çıkışı ile birlikte PCR tekniği otomatik hale gelebildi (Lawyer, Stoffel ve ark., 1989). O zamandan beri PCR, dünyanın her köşesine ve biyoloji ve kimyanın akla gelebilecek her yönüne yayılabilmiştir. Ayrıca bu yöntem Kary Mullis'e 1993 yılında Nobel ödülünü de getirmiştir (Nobel Media, 2014).

PCR, belirli bir DNA'nın amplifikasyonu ve analizinin yapılması için bulunmuş önemli bir tekniktir. DNA polimerazın sunulan template zincirini tamamlayıcı yeni DNA zinciri sentezlemesi temelinde düşünülebilir. (NCBI) PCR sayesinde çok kısa sürede binlerce baza sahip seçilmiş genlerin milyonlarca kopyası sentezlenebilmektedir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu hedeflenen DNA'nın çoğaltılması, DNA'daki mutasyonların tespiti, DNA'nın analizi gibi durumlarda kullanılmaktadır.

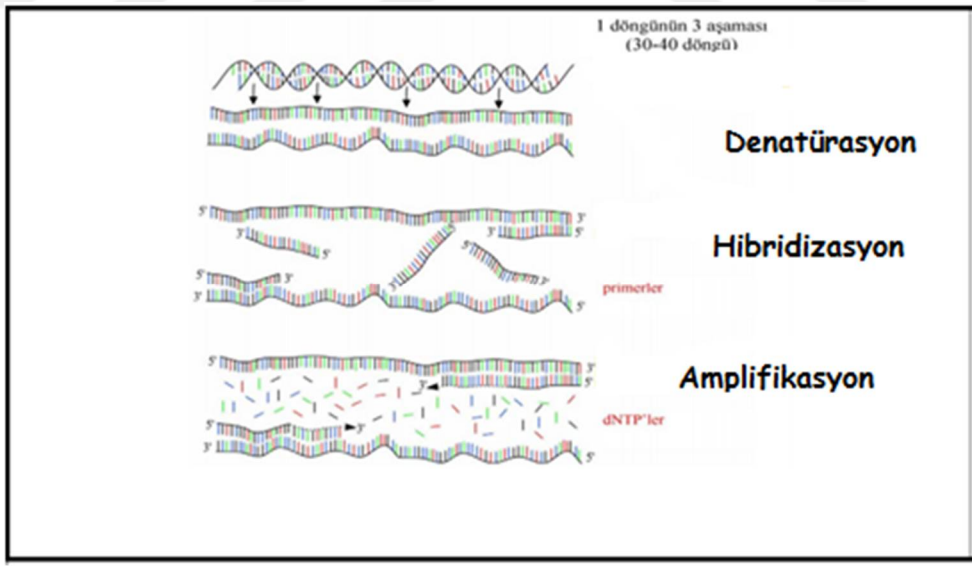
Polimeraz Zincir Reaksiyonunda üç temel aşama vardır ve çoğaltılmış ürün miktarı, bu üç adımın tekrarına bağlıdır (Şekil 2.2). Bu üç adım bir PCR döngüsünü oluşturur (Şekil 2.3). Bu aşamalar denatürasyon, hibridizasyon ve amlifikasyondur.

Denatürasyon aşaması Polimeraz Zincir Reaksiyonunun ilk aşamasıdır. Bu aşamada çift iplikçikli DNA zinciri, 90-95 °C'lik sıcaklıklarda yaklaşık 3 dakika bekletilerek (Joshi ve ark., 2011) ve bu sayede kuvvetli hidrojen bağları koparılarak tekli zincirlerine ayrılır.

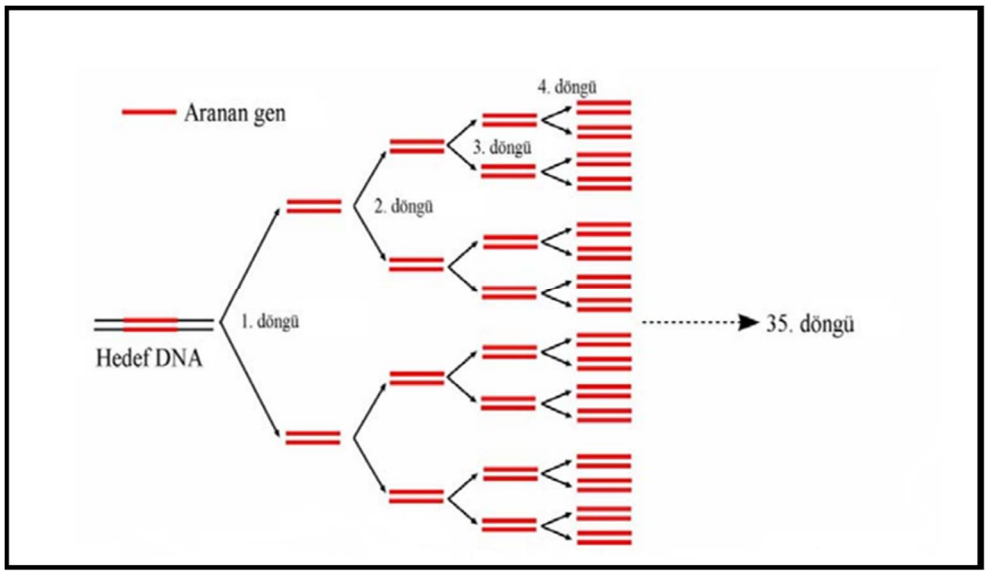
Hibridizasyon aşaması iki sentetik oligodeoksiribonükleotidin (primerler), çoğaltılacak DNA bölgesinin 3' uçlarına bağlanabilmesi için sıcaklığın 50-70 °C' ye kadar düşürülmesi aşamasıdır. Primerler, hedef DNA'nın renatürasyonundan ziyade primer hedef kompleksinin oluşumunu desteklemek için reaksiyona fazla miktarda eklenirler. Primerler, DNA'nın 3' uçları birbirine bakacak şekilde karşılıklı zincirlerine bağlanırlar (Hill ve ark., 1992). Denatürasyon aşamasında ayrılmış DNA zincirlerinin yeni oluşacak zincire bağlanabilmesinin temelinde yatan asıl sebep sıcaklığın çok yüksekken düşürülmesidir. Bu sayede tek zincirli DNA ile primerler

arasında çok daha sağlam ve dayanıklı hidrojen bağları oluşur (Somma ve Querci, 2006).

Amplifikasyon aşaması, sıcaklık katalizör olan taq DNA polimerazın çalışması için uygun seviye olan 72°C' ye gelince başlar ve primerlere nükleotitlerin eklenerek kalıp olarak kullanılan hedef DNA zinciri boyunca uzatılmasıyla devam eder (Hill ve Stewart, 1992). Bu reaksiyon kalıp olarak kullanılan hedef DNA ile tamamen benzer DNA zinciri yapılıp hedef DNA'nın sayısı iki katına çıkınca sona erer. Primerler, DNA zincirine 3' kısmından bağlanır ve nükleotitleri primere 5'-3' ucundan ekleyerek oluşan yeni zinciri uzatır. Primerler, eğer DNA ile uyumluysa hedef DNA zinciri boyunca uzatılmaya başlandığında çok daha yüksek bir iyonik çekimle hedef DNA'ya bağlanırlar. Eğer tam olarak uyuşmayan bir primer hedef DNA zincirine bağlanmaya çalışırsa DNA ile primer arasındaki çekim çok zayıf olacağından bağlanmış olan primer yüksek sıcaklık sebebiyle gevşer ve reaksiyon başlamaz (Somma ve Querci, 2006). Bu durum kalıp DNA zincirinin kopyası oluşturulurken oluşabilecek hataların önüne geçilmesi açısından önemlidir.



Şekil 1.2. PCR basamakları (Vierstraete, 1999)

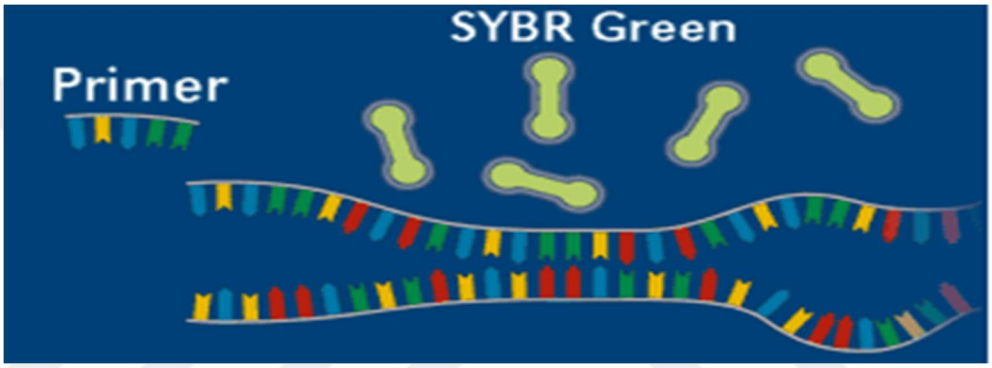


Şekil 2.3. PCR döngüleri (Vierstraete, 1999)

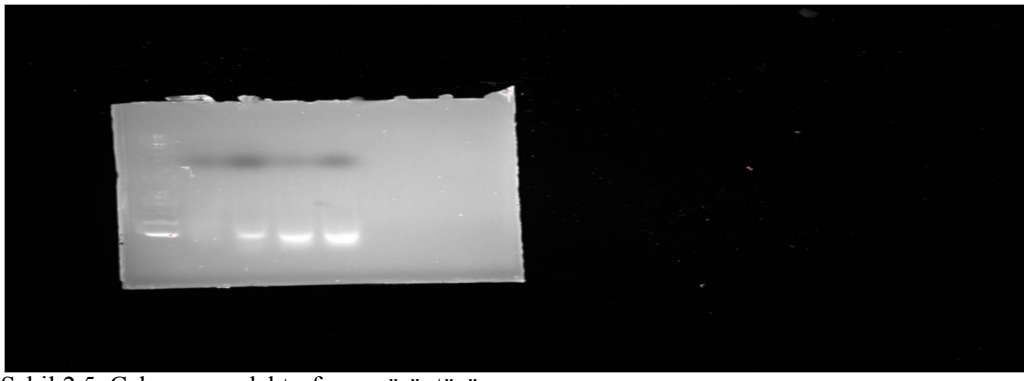
PCR teknolojisinde kalıp olarak yalnızca DNA kullanılabilmektedir. Bu sebeple RNA işlemlerinde kalıp olarak direkt RNA kullanılamaz. Bu sebeple RNA'yı DNA'ya çevirmemiz ve o şekilde çoğaltmamız gerekmektedir (Valasek and Repa, 2005). Bu olaya reverz transkripsiyon denmektedir Reverz transkripsiyon işleminde öncelikle RNA kalıbı reverz transkriptaz kullanılarak komplement DNA'ya (cDNA) dönüştürülür (Schmittgen ve ark., 2000). Reverz transkriptaz ilk olarak Howard Temin tarafından keşfedildi (Temin ve ark., 1970) ve 1970 yılında David Campbell tarafından iki RNA tümör virüsü: R-MLV ve tekrar RSV'den bağımsız olarak izole edildi (Baltimore, 1970). Bu başarı sebebiyle her iki bilim insanı da 1975 yılında Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülünü kazandı. Reverz transkripsiyon aşamasında kalıp olarak kullanılan hedef RNA'nın sahip olduğu genetik bilgilerin olduğu gibi cDNA' ya aktırılması sağlanmış olur. Daha sonra, oluşturulan cDNA, PCR kullanılarak çoğaltma işleminin yapılabilmesi için kalıp olarak kullanılmaktadır (Schmittgen ve ark., 2000).

PCR'da çoğaltılan DNA veya cDNA' yı görüntüleyebilmek için agaroz jel elektroforezi kullanılılır. Agaroz jel elektroforezi, agarın iki ana bileşeninden biri olan agaroz matrisinde DNA veya protein gibi makromoleküllerin karışık bir popülasyonunu ayırmak için biyokimya, moleküler biyoloji, genetik ve klinik kimyada kullanılan jel elektroforez yöntemidir. Bu yöntemde agaroz jele enjekte

edilmiş DNA ve RNA molekülleri elektrik alan uygulanarak yüzdürülür ve uzunluklarına göre ayrılırlar (Kryndushkin, 2003). Kısa moleküller uzun moleküllere göre daha hızlı hareket edeceği için daha uzağa göç eder ve bu sayede moleküllerin ayrılması sağlanmış olur. DNA parçaları elektroforezde yüzdürüldükten sonra incelenebilmesi için etidyum bromid veya sybeer green (Şekil 2.4) gibi floresans özelliğine sahip boya maddeleri ile boyanır ve ultraviyole ışık altında incelenir. DNA bantları bu boya maddeleri sayesinde beyaz bantlar halinde net bir şekilde görünür. Görünen bantların fotoğrafı polaroid bir kamera ile alınır (Şekil 2.5) (Sambrook ve Russel, 2001).



Şekil 2.4. SYBR Green (URL-1, 2017)


Şekil 2.5. Çalışmanın elektroforez görüntüsü

Higuchi ve ark. (1993), PCR ürünlerini biriktikçe tespit eden bir sistem oluşturarak PCR kinetiğinin analizine öncülük etmişlerdir. Bu RT-PCR (Real Time PCR) için atılmış bir adım olmuştur. Journal of Biotechnology'de Higuchi RT-PCR'ı şu sözleri ile anlatmıştır: "Herhangi amplifiye edilebilir bir DNA sekansının termal döngü boyunca aynı anda birden fazla polimeraz zincir reaksiyonunu (PCR) izlemek

için video kamera kullanan basit, niceliksel bir analiz tekniği tarif ediyoruz. Video kamera, etidyum bromidin (EtBr) çift zincirli DNA'nın hidrojen bağlarına bağlanmasından dolayı oluşan floresans ışığındaki artışı kullanarak her bir PCR'da çift sarmallı DNA'nın (dsDNA) birikimini tespit eder. Termal döngü sırasında floresans birikiminin kinetiği doğrudan DNA kopyalarının başlangıç sayısıyla ilişkilidir. Saptanabilir bir floresans üretmek için gerekli olan daha az döngü sayısı ve hedef sekansların sayısının artmasıdır. Bu yaklaşımla elde edilen sonuçlar, PCR analizine kinetik bir yaklaşımın DNA'yı duyarlı bir şekilde, seçici olarak ve geniş bir dinamik aralıkta nicelleştirdiğini göstermektedir. Bu yaklaşım ayrıca, farklı reaksiyon koşullarının amplifikasyonun etkinliği üzerindeki etkisini belirlemek için aracı olmaktadır" (Higuchi ve ark., 1993).

RT-PCR, ışıma özelliğine sahip etidyum bromür gibi moleküller kullanarak PCR'ı oluşurken takip etme ve miktar tayini yöntemidir (Valasek ve Repa, 2005). Bu "gerçek zamanlı" sistem her amplifikasyon reaksiyonunda yer alan etidyum bromürü, numunelere ultraviyole ışık yaymak için uyarlanmış bir termal siklörü ve elde edilen floresansı tespit eden bilgisayar kontrollü soğutmalı bir CCD kamerayı içermektedir. Kısacası termal döngü cihazı ve florimetre aynı cihaz üzerinde bulunur. Bu sistemle, amplifikasyon olayı sonucunda etidyum bromürün bağlandığı artan miktarda çift sarmallı DNA üretilir ve bu da floresans ışığında bir artışa neden olur. RT-PCR, floresans ışığındaki artışa karşı döngü sayısındaki artışı planlayarak, belirli bir döngü sayısından sonra ürün birikimini test etmekten çok PCR sürecinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlayan amplifikasyon grafikleri üretir (Higuchi ve ark., 1993).

RT-PCR, gen ekspresyon analizi (kanser araştırmaları ilaç araştırmaları), hastalık tanı ve tedavisi viral miktarı hesaplama), gıda testi (gıda örneklerinde gdo analizi), hayvan ve bitki ıslahı (gen kopya sayısı) gibi alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Somma ve Querci, 2006).

RT-PCR' da geleneksel PCR' da olduğu gibi bir döngü üç temel aşamanın tamamlanması ile gerçekleşmektedir. Bunlar bahsettiğimiz üzere denatürasyon,

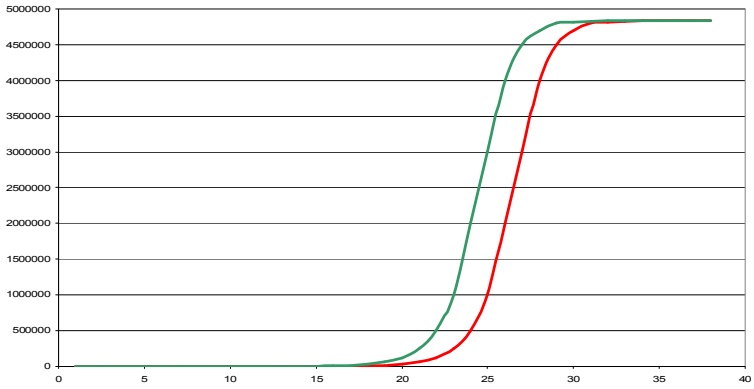
hibridizasyon ve amplifikasyondur. RT-PCR' ın çalışma mekanizmasını geleneksel PCR' dan ayıran en önemli fark amplifikasyon esnasında etidyum bromid ve sybeer green gibi özel boya maddelerinin çift iplikçikli DNA'nın hidrojen bağlarına bağlanması ve bu andan itibaren ultraviyole ışığı altında floresans ışığı yaymaya başlamasıdır. Oluşan floresans ışığı DNA ile doğru orantılı olarak arttıkça reaksiyon sırasında sonuçlar görülebilmekte, tüm bunlar tek bir tüpte ve tek bir işlemle belirlenebilmektedir (Kahya ve ark., 2014).

RT-PCR sisteminin nasıl yorumlandığına bakılırsa anlayabilmek için bir örnek üzerinden gidilebilir. Örneğin; bir araştırmacı kolorektal normal doku ve kanserli doku arasındaki miRNA ekspresyon farklılıklarının tespiti üzerinde çalışıyor olsun. Bunun için araştırmacının elinde bir tümörlü doku bir de normal doku olmalı ve en başta tümörlü dokuda araştırmak istenilen miRNA'nın normal dokuya göre 4 kat daha fazla olduğunu varsayılsın (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Tümörlü ve normal dokuda 23, 24 ve 25. döngüdeki miRNA miktar kıyaslaması

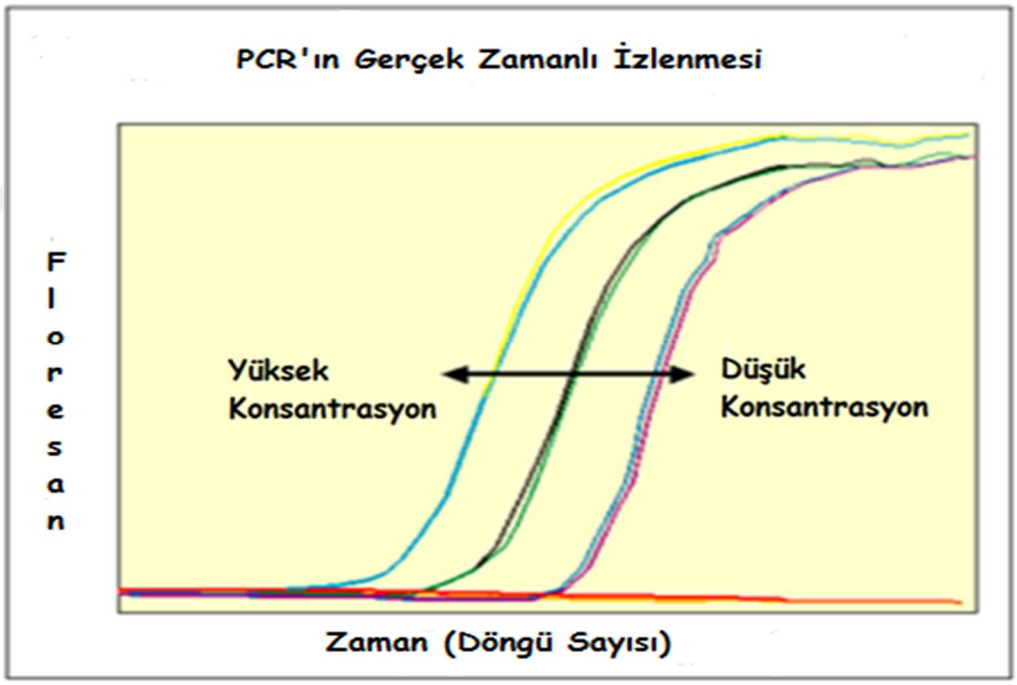
Cycle (Döngü)	Normal	Tümör
23	250,000	1,000,000
24	500,000	2,000,000
25	1,000,000	4,000,000

Bu durumda reaksiyon boyunca şekil 2.6' da da görüldüğü gibi bir grafik ortaya çıkacaktır. Bu grafikte de görüldüğü gibi tümörlü dokuda daha fazla eksprese edilen miRNA iki döngü önce bir milyon kopyaya ulaşmış, kısacası erken ortaya çıkmış ve pik yapmıştır.



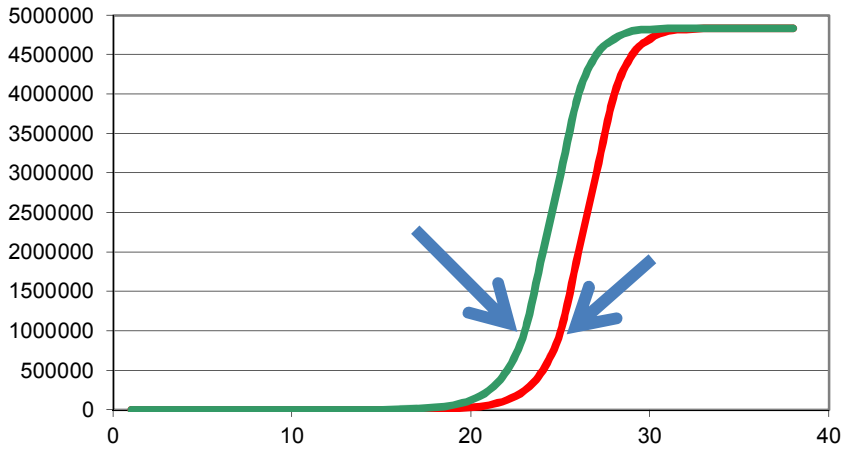
Şekil 2.6.Tümörlü doku ve normal dokuda temsili floresans-döngü grafiği

Bu durumda şöyle bir yorum yapılabilir: DNA miktarı ne kadar yüksek olursa PCR sürecinde biriken ürün o kadar erken pik yapar ve bu sayede hızlı tespit edilir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. RT-PCR' da florasan-döngü sayısı grafiğinin yorumlanması (URL-2, 2017)

Floresans-döngü grafiklerinde Ct değerleri önemli bir unsur olarak göze çarpmaktadır. Ct (eşik döngü) değeri, bir amplifikasyon eğrisinin yapay bir eşik çizgisi ile kesiştiği yerdir (Şekil 2.8). Ct aynı zamanda PCR reaksiyonundaki hedef konsantrasyonunun göreli bir ölçüsüdür.



Şekil 2.8. Örnek Ct değerleri

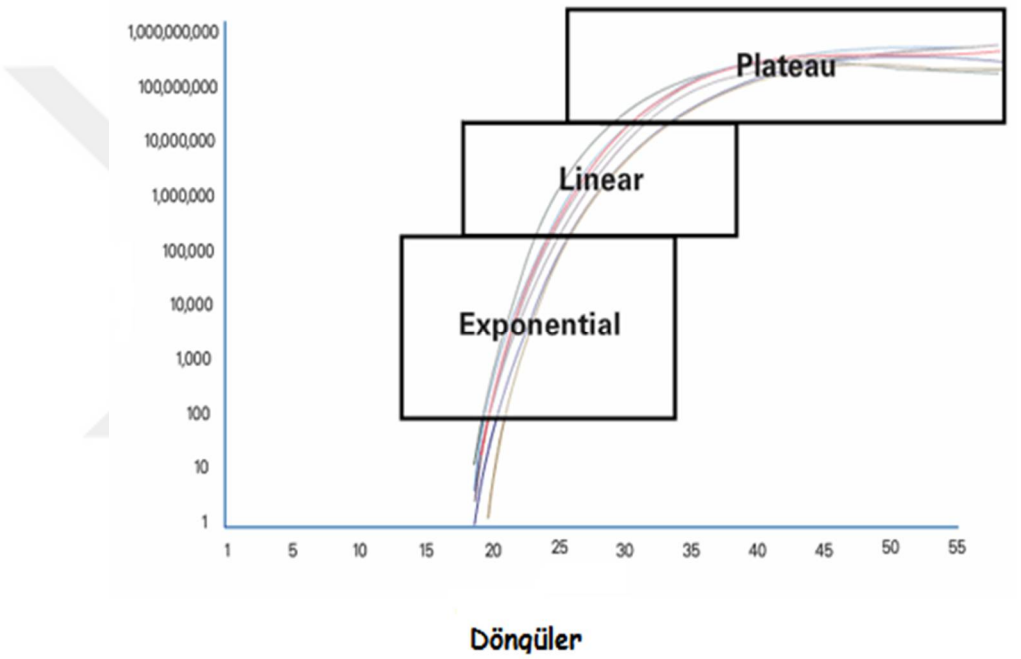
Birçok faktör Ct'nin mutlak değerini ve hedef konsantrasyonunu etkilemektedir. Genomik DNA miktarı ne kadar yüksek olursa PCR sürecinde biriken ürün o kadar hızlı tespit edilir ve Ct değeri o kadar düşük olur. Uygulamada Ct değerini belirleyen eşik çizgisinin seçimi genellikle teknisyene kalmış bir seçimdir ve bu da RT-PCR'ın kişisel öğelerinden biridir. Eşik çizgisi herhangi bir arka plan aktivitesinin ilerisinde, üstel artış aşamasına denk gelen, logaritmik gösterimde lineer görülen bir bölgede seçilmelidir (Weighardt, 2006).

RT-PCR ile geleneksel PCR arasındaki farkların daha iyi anlaşılabilmesi önce PCR'ın fazlarını iyi bilmek gereklidir. PCR' da üç temel faz vardır. Bunlar; exponential, linear ve plateu (end-point) fazlarıdır (Şekil 2.9).

1. *Exponential Faz:* Bu fazda floresans miktarı, arka plan seviyelerine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek (genellikle taban çizgisinin standart sapmasının 10 katı) bir eşiğe ulaşır.
2. *Linear Faz:* Bu fazda PCR, ideal reaksiyon koşullarında her devirden sonra ikiye katlanan PCR ürünü ile optimum amplifikasyon süresine ulaşır.
3. *Plateu Faz:* Tepkime bileşenleri sınırlandığında ve floresans yoğunluğunun artık veri hesaplaması için kullanışlı olmadığı zaman plato safhasına ulaşılır (Wong ve Medrano, 2005).

Verilen bu bilgilerden de anlaşılacağı üzere geleneksel PCR'da verileri görebilmek için son faz olan plateu fazına kadar beklemek zorunludur. Fakat RT-PCR da en erken faz olan exponential fazdan itibaren amplifikasyon tespit edilir. Böylece hata oranı en aza indirilir ve daha doğru sonuçlara ulaşılır.

RT-PCR'ın çok hızlı bir teknik olması da büyük avantaj sağlamaktadır. Çünkü ekstraksiyon, amplifikasyon ve görüntüleme aşamaları RT-PCR'da 3 saatten daha kısa sürede gerçekleşebilmektedir. (Flori ve ark., 2004)



Şekil 2.9. PCR fazları (URL-3, 2017)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada cerrahi parça alma işlemine girmiş ve RNAlater solüsyonu ile fiksasyon işlemi gerçekleşmiş olan 6 kolorektal kanserli hastanın, kolon bölgesinden alınan sağlam ve tümörlü doku kısımları Gaziantep Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji bölümünden soğuk zincirle laboratuarımıza getirtilmiştir ve -80 derece muhafaza edilmiştir.

3.1. Materyal

Çalışmada RNAlater solüsyonu (Applied Biosystems) ile fikse edilmiş kolorektal kanserine sahip hastaların sağlam ve tümörlü kısımlarından alınan doku örnekleri (0.5 cm^3) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Kolorektal kanserli dokularda miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla yaptığımız çalışma RNA izolasyonu, izole edilen RNA'nın konsantrasyonunun ölçümü, cDNA oluşturma, RT-PCR ve istatiksel analiz aşamalarını içermektedir.

3.2.1. RNA izolasyonu

Toplam RNA 'Qiagen miRNeasy Mini Kit kullanılarak izole edilmiştir. MiRNeasy Mini Kit, örneklerin fenol / guanidin bazlı lizizini ve toplam RNA'nın silikambran bazlı saflaştırılışını birleştiren bir kittir. QIAzol Liziz Reaktifi, dokuların lizisinin kolaylaştırılması, RNazların engellenmesi ve organik ekstraksiyon ile lizattan hücresel DNA ve proteinlerin çoğunun çıkarılması için tasarlanmış fenol ve guanidin tiyosiyanatın monofazik bir çözeltisidir.

Doku örnekleri mekanik parçalama işleminden sonra, 700 µl QIAzol Liziz Reaktifi kullanılarak homojenize edildi. Homojenatlar 140 µl kloroform içerisine alındıktan sonra santrifüj işlemine alındı. Santrifüj sonrası örneklerde meydana gelen üst sıvı faz alınarak organik faz atıldı. 18 nükleotiten fazla nükleotite sahip tüm RNA moleküllerine uygun bağlanma koşullarını sağlamak için üst sıvı faza 525 µl etanol eklendi. Örnek daha sonra RNeasy Mini spin kolonuna konuldu. Burada fenol ve diğer kontaminantların etkili bir şekilde yıkanması için sırasıyla RWT Tamponu (700 µl) ve RPE tamponu (500 µl) eklendi. Son olarak yüksek kalite RNA, 30-50 µl RNaz içermeyen suda yıkandı ve RNA izolasyonu tamamlanmış oldu.

3.2.2. Ölçüm

İzole edilen RNA, RNA saflığı ve konsantrasyonu hakkında bir endikasyon vermek üzere NanoDrop spektrofotometre p360 (Implen) (mikrohacim spektrofotometre) kullanılarak ölçüldü.

İzole edilmiş RNA örneklerinin 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümleri yapıldı. Elde edilen verilerden 260 ve 280 nm'deki optik dansite (OD) değerleri birbirleriyle oranlandırıldı. 260 ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerin oranın 1.8 ile 2.0 arasında olması durumunda RNA saflaştırılmış kabul edildi. Eğer oran bu değerden çok düşük çıkarsa 280 nm'de absorbe olan protein, fenol veya diğer kirleticilerin varlığından söz edilebilir. Çünkü 280 nm' de ölçülen bir değerdeki artış A260/A280 oranında düşmeye neden olur.

3.2.3. cDNA oluşturma

İzole edilen RNA'ları DNA'ya dönüştürmeden RT-PCR' da miRNA'ların ekspresyon seviyelerini belirlememiz mümkün değildir. Bu sebeple çalışmada örneklerde bulunan miRNA'lara özgü primerler (Çizelge 3.1) ve miScript II RT kiti (Çizelge 3.2) kullanılarak ters transkriptaz yöntemi ile cDNA'lar oluşturulmuştur. Çalışma boyunca, kitlerin içerisindeki karışımların sıcaklıklarının sabit kalması amacıyla buz üzerine bırakılmıştır. Öncelikle, izole edilen RNA çözüldü. Nükleik

asit karışımının (10x) ve miScript HiFlex tamponunun (5x) oda sıcaklığında (15-25°C) çözünmesi sağlandı. Tüplere nazikçe vurularak her çözeltinin karışması sağlandı. Tüplerin kenarlarından artık sıvı toplamak için kısa bir süre santrifüjlendi. Ters transkripsiyon ana karışımı çizelge 3.3'e göre hazırlandı ve karıştırıldı. Ters transkripsiyon master karışımı içeren her bir tüpe RNA şablonu eklendi, karıştırıldı ve kısa bir süre santrifüjlendi. 37ºC'de 60 dakika inkübe edildi. MiScript ters transkriptaz'ı inaktive etmek için 95°C'de 5 dakika inkübe edildi ve işlem tamamlandı.

Çizelge 3.1. cDNA oluşturmak için kullanılan miRNA'lara özgü primerler

Primerler	Sekanslar
miRNA-21	CGGCGTAGCTTATCAGACTGATG
miRNA-92	TATTGCACTTGTCCCGGCCT
miRNA-145	GTCCAGTTTTCCCAGGAAUCCCT
miRNA-192	CGGCGTGTAAACATCCTACACTC

Çizelge 3.2. MiScript II RT kiti içeriği

Bileşenler	**Örneklik Reaksiyon**
miScript Reverz Transkriptaz Karışımı	24 µl
10x miScript Nükleik Karışımı	50 µl
5x miScript HiSpec Buffer	100 µl
5x miScript HiFlex Buffer	100 µl
RNaz İçermeyen Su	1.9 ml

Çizelge 3.3. Reverz transkripsiyon reaksiyonu bileşenleri

Bileşenler	**Hacim/Reaksiyon**
5x miScript HiFlex Tamponu	4 µl
10x Nukleik Karışımı	2 µl
RNaz İçermeyen Su	
miScript Reverz Transcriptaz Karışımı	2 µl
Şablon RNA	
Total Hacim	20 µl

3.2.4. Real Time PCR kullanımı

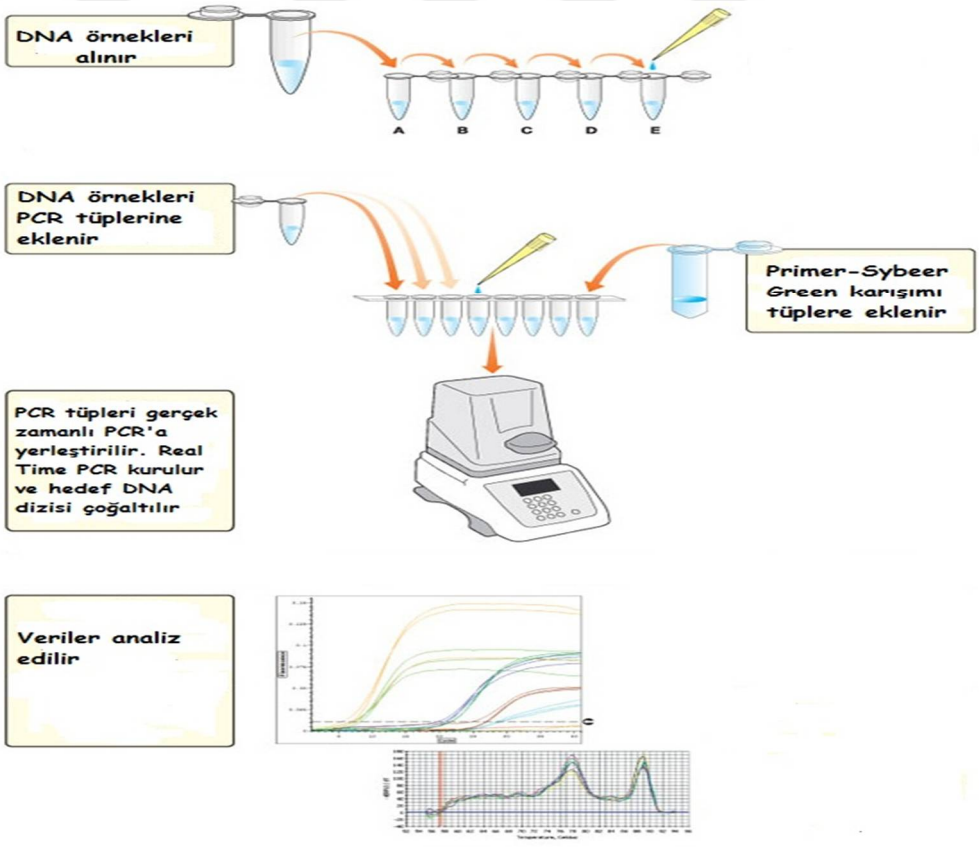
cDNA'ların gerçek zamanlı ekspresyon seviyesini belirlemek için Rotor Gene-Q Real Time PCR (Qiagen) kullanıldı (Şekil 3.1). MiScript Reverz Transkripsiyon Kiti kullanılarak gerçekleştirilen ters transkripsiyon işlemini, miScript SYBR Green PCR Kiti (Çizelge 3.4) ve Rotor-Gen Q üzerindeki miScript Primer testi takip etti ve böylece miRNA'ların tespiti sağlanmış oldu. Ters transkripsiyon işlemi ile cDNA'ya dönüşen RNA'lar miScript SYBR Green PCR kiti ile floresans özelliği kazandı. SYBR Green boyası, çift sarmal DNA' nın zincirleri arasına bağlanarak az miktarda floresans yaymakta ve daha sonraki bilgisayar analizleri için gerekli olan floresans sinyalini oluşturmaktadır. RT-PCR ile analize hazırlanan örnekler Rotor Gene-Q Real Time PCR cihazına yerleştirildi. Rotor Gene-Q Real Time PCR'da geleneksel PCR'da olduğu gibi denatürasyon (denaturation), hibridizasyon (annealing) ve amplifikasyon (extension) olmak üzere üç reaksiyon aşaması, döngü 40 kez tekrarlanacak şekilde ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı. İşlem bittikten sonra ct değerleri elde edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Rotor-Gene Q Real Time PCR (Biorad)

Çizelge 3.4. MiScript SYBR Green PCR kit içeriği

Bileşenler	Örneklik Reaksiyon
HotStarTaq® DNA Polimeraz QuantiTect SYBR Green PCR Buffer dNTP mix, dUTP içeren SYBR Green I ROX™ pasif referans dye 5 mM MgCl2	3 x 1.7 ml
10x miScript Universal Primer 1 ml	1 ml
RNaz İçermeyen Su	2 x 2 ml



Şekil 3.2. RT-PCR aşamaları (URL-4, 2017)

3.2.5. İstatiksel analiz

Veriler ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Normal ve kanserli dokulardaki miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında nanparametrik Wilcoxon X testi kullanıldı. Normal ve kanserli dokularda miRNA ekspresyon düzeylerinin kat değişimleri (fold change) Livak metoduyla hesaplanmıştır. MiRNA ekspresyon düzeylerinin kendi aralarındaki korelasyonun belirlenmesinde nanparametrik Spearman's rho korelasyonu kullanıldı. Hesaplama sonuçları p değerlerinin 0.05'ten düşük olması durumunda istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Kolorektal kanser (CRC) dünyadaki en ölümcül hastalıklardan biridir. Kolorektal tümör, vücudun farklı bölgelerine saldıran veya yayılabilen hücrelerin anormal gelişmesinin bir sonucudur. CRC için tanımlanmış risk faktörleri yaşlanma, cinsiyet, aile öyküsü, yaşam tarzı ve inflamatuar bağırsak hastalığı gibi önceden var olan koşullardır. CRC çoğu zaman geç evrelere kadar asemptomatiktir ve sadece kanser metastatik hale geldiğinde teşhis edilebilir (Haggar ve ark., 2009; Ren ve ark., 2015; Carrol ve ark., 2016).

MikroRNA, mRNA'yı hedefleyerek transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen, 21 nükleotidden oluşan tek sarmallı kısa RNA moleküleridir. miRNA'lar, omurgalılar, omurgasitler ve bitkiler arasında evrimsel olarak korunmuş olan kodlamaya girmeyen RNA'ların bir sınıfıdır (Lagos-Quantina ve ark., 2001; Reinhart ve ark., 2002). Son zamanlarda miRNA'lar CRC'nin erken teşhis, tanı ve tedavisinde güçlü bir kaynak olarak görülmektedir.

Çalışmada cerrahi parça alma işlemine girmiş olan 6 kolorektal kanserli hastanın, kolon bölgesinden alınan sağlam ve tümörlü doku kısımlarından miRNA analizleri yapılmıştır.

Hastaların sağlam ve tümörlü kısımlarından alınan örneklerde miRNA'ların reverz transkripsiyon işlemi için miRNA'lara özgü miRNA-145, miRNA-192, miRNA-21 ve miRNA-92'nin primerleri kullanılmıştır. Böylece hastalardan alınan örneklerdeki miRNA-145, miRNA-192, miRNA-21 ve miRNA-92 adlı miRNA'ların hastaların sağlam ve tümörlü kısımlarında ekspresyon seviyeleri belirlenmeye çalışılmıştır.

miRNA-145, miRNA-192, miRNA-21 ve miRNA-92'nin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla Real-Time PCR (RT-PCR) kullanılmıştır. RT-PCR ile elde edilen Ct değerleri üzerinden kat değişimi hesaplanmış ve bu sayede

tümörlü dokudaki miRNA ekspresyon seviyeleri normal dokudaki ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırılmıştır.

Ct değerleri Real Time PCR reaksiyonundaki hedef konsantrasyonunun göreli bir ölçüsüdür. Hedef örneklemindeki miRNA miktarının tam tersine göre yorumlanmaktadır ve numunedeki kopya sayısıyla ilişkilendirilmektedir. Düşük Ct değerleri yüksek miktarlarda hedeflenmiş miRNA varlığını gösterirken, daha yüksek Ct değerleri hedef miRNA'nın daha düşük miktarlarda eksprese edildiğini ifade etmektedir. Hatta yüksek miktarda miRNA anlık oluşan floresans-döngü grafiğinde floresans çizgilerinin erken pik yapmasını sağlamaktadır.

Hastalardan alınan normal ve kolon kanserli doku örnekleriyle yapılan çalışma sonucu belirlenen miRNA'lara özgü ortaya çıkan Ct değerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Tümörlü doku ve normal dokuda miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması ile farklılık belirlenen miRNA'ların Ct değerleri

Hasta	İsim	Doku	Ct Değerleri
01	miRNA-145	Kontrol	17.52
01	miRNA-145	Tümör	23.14
01	miRNA-192	Kontrol	15.33
01	miRNA-192	Tümör	21.87
01	miRNA-21	Kontrol	18.92
01	miRNA-21	Tümör	13.66
01	miRNA-92	Kontrol	24.16
01	miRNA-92	Tümör	17.96
02	miRNA-145	Kontrol	17.6
02	miRNA-145	Tümör	22.33
02	miRNA-192	Kontrol	19.7
02	miRNA-192	Tümör	19.85
02	miRNA-21	Kontrol	16.43
02	miRNA-21	Tümör	16.03
02	miRNA-92	Kontrol	21.57
02	miRNA-92	Tümör	17.38
03	miRNA-145	Kontrol	11.92
03	miRNA-145	Tümör	17.7
03	miRNA-192	Kontrol	12.94
03	miRNA-192	Tümör	21.27
03	miRNA-21	Kontrol	16.03
03	miRNA-21	Tümör	9.51
03	miRNA-92	Kontrol	24.01
03	miRNA-92	Tümör	15.03
04	miRNA-145	Kontrol	17.9
04	miRNA-145	Tümör	19.52
04	miRNA-192	Kontrol	18.55
04	miRNA-192	Tümör	29.35
04	miRNA-21	Kontrol	13.63
04	miRNA-21	Tümör	13.55
04	miRNA-92	Kontrol	19.7
04	miRNA-92	Tümör	22.98
05	miRNA-145	Kontrol	10.51
05	miRNA-145	Tümör	13.29
05	miRNA-192	Kontrol	16.10
05	miRNA-192	Tümör	21.44
05	miRNA-21	Kontrol	12.64
05	miRNA-21	Tümör	11.43
05	miRNA-92	Kontrol	17.32
05	miRNA-92	Tümör	16.59
06	miRNA-145	Kontrol	13.39
06	miRNA-145	Tümör	15.24
06	miRNA-192	Kontrol	16.33
06	miRNA-192	Tümör	18.51
06	miRNA-21	Kontrol	31.58
06	miRNA-21	Tümör	11.58
06	miRNA-92	Kontrol	17.78
06	miRNA-92	Tümör	17.36

Tümör ve normal dokulardaki miRNA ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında miRNA-21 ve miRNA-92'nin ekspresyon seviyesinin tümörlü dokularda normal dokulara göre yüksek olduğu, miRNA-145 ve miRNA-192'nin ekspresyon seviyelerinin ise tümör dokularda normal dokulara göre düşük olduğu gözlenmiştir. Bu miRNA' lar arasında miRNA-21 ve miRNA-192'nin istatistiksel olarak anlamlı şekilde değerlendirildiği gözlemlendi ($p<0.05$) (Çizelge 4.2).

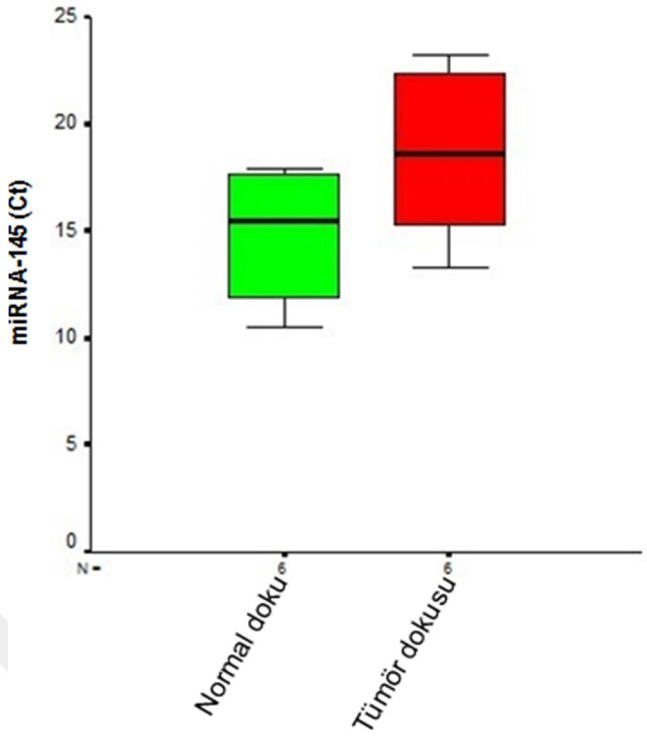
Çizelge 4.2. Tümör doku ve normal dokuda miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması

miRNA	Kat Değişimi (Fold Change)	p değeri
miRNA-145	0.215	0.109
miRNA-192	0.061	**0.010**
miRNA-21	136.051	**0.045**
miRNA-92	17.436	0.055

4.1. miRNA-145' in Ekspresyon Profili

miRNA-145, CRC'de KRAS ve BRAF genlerinin aktivitelerini inhibe ederek tümör baskılayıcı olarak görev yapan bir biyobelirteçtir (Pagliuca ve ark., 2013). Micheal ve arkadaşları da 2003 yılında miRNA-145'in CRC'de azalma gösterdiğini ve türmör baskılayıcı olduğunu öne süren ilk gruptur. Çalışmada elde edilen veriler bu çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

miRNA-145'in tümörlü dokularda normal dokuya göre daha düşük düzeyde eksprese edilerek (0.215 kat) aşağı (down) regülasyona uğradığı gözlenmiştir. Fakat istatiksel analiz sonucunda tümörlü doku ve normal doku arasında belirlenen bu seviye farkı istatiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmamıştır. (Şekil 4.1).

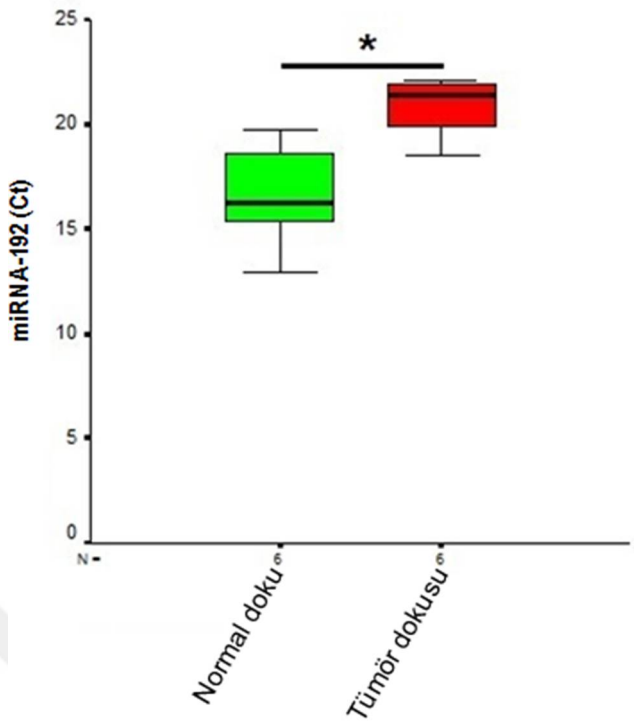


Şekil 4.1. miRNA-145'in tümörlü ve normal dokudaki Ct değerlerinin istatiksel analiz grafiği

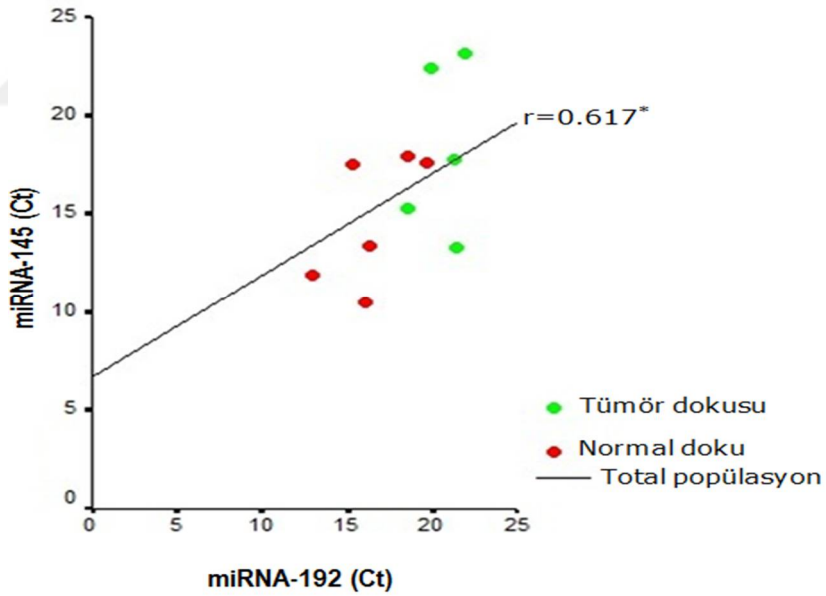
4.2. miRNA-192'nin Ekspresyon Profili

miRNA-192, CRC'de Bcl-2, Zeb2 ve VEGFA genlerinin ekspresyonunu aşağı (down) regüle ederek CRC metastazını engellemektedir (Geng ve ark., 2013). Günümüzde yapılan bir takım çalışmalar da miRNA-192'nin CRC'de aşağı (down) regüle olduğunu göstermektedir (Schetter ve ark., 2008; Chiang ve ark., 2012). Çalışmada elde edilen veriler bu çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

miRNA-192' nin ekspresyon profili incelendiğinde miRNA-192'nin tümörlü dokuda normal dokuya göre düşük düzeyde eksprese edilerek (0.061 kat) aşağı (down) regülasyona uğradığı gözlenmektedir. Ayrıca istatiksel analiz sonucunda tümörlü doku ve normal doku arasında belirlenen bu seviye farkı istatiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur (p=0.010) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. miRNA-192'nin tümörlü ve normal dokudaki Ct değerlerinin istatiksel analiz grafiği

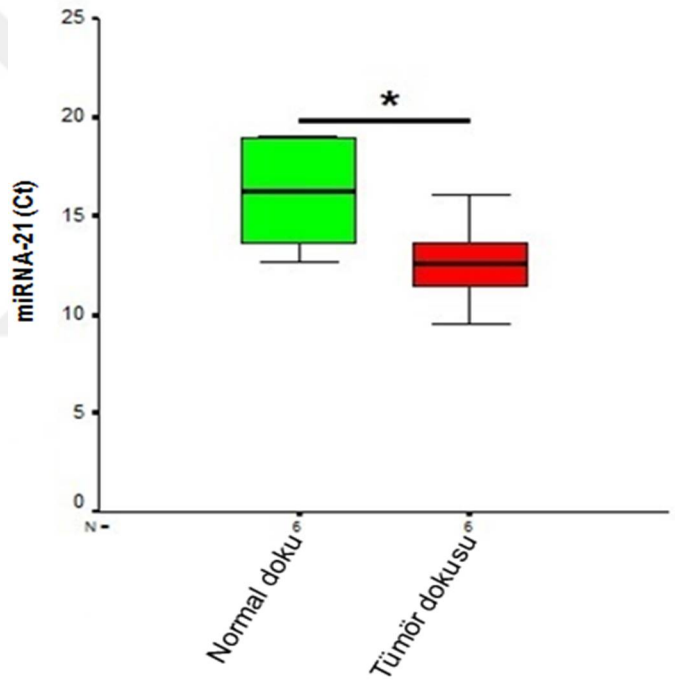


Şekil 4.3. miRNA-145'in ct değerleri ile miRNA-192'nin Ct değerlerinin korelasyon grafiği

miRNA-145'in tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerleri ile miRNA-192'nin tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerlerinin arasındaki bağıntı analizinde iki miRNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif bağıntının olduğu (r: 0.617) gözlenmektedir (Şekil 4.3).

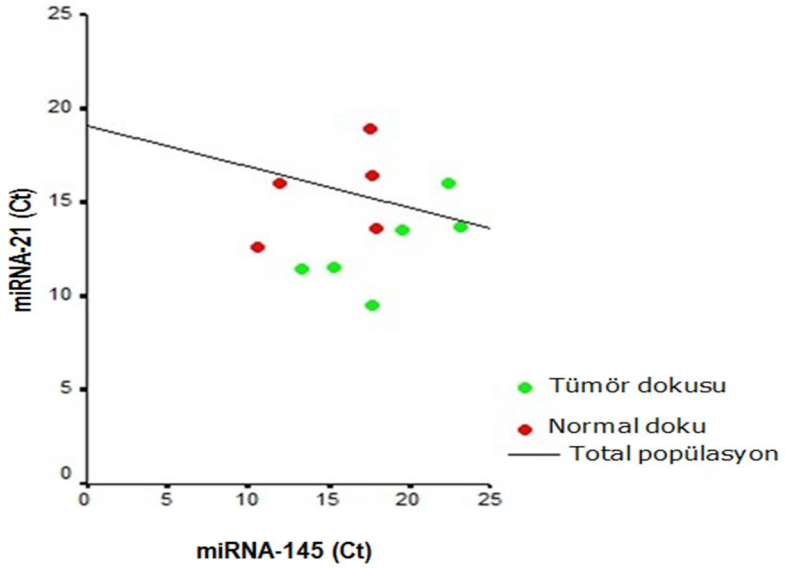
4.3. miRNA-21'in Ekspresyon Profili

miRNA-21 neredeyse tüm katı tömörlerde onkogenik davranan ve tümör dokularında normal dokulara göre yüksek miktarda eksprese edilen bir miRNA çeşididir (Calin ve ark., 2005; Ciafrè ve ark., 2005 Volinia ve ark., 2006 Meng ve ark., 2007; Garzon ve ark., 2008). Yapılan çalışmalara göre miRNA-21'in ekspresyonu, birkaç tümör baskılayıcı geni hedefleyerek hücre proliferasyonunun artmasına, apoptozun azalmasına, hücre göçünün artmasına, invazyona ve metastaza yol açmaktadır (Schetter ve ark., 2012; Zhu and Xu, 2014). Çalışmada elde edilen veriler bu çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir.



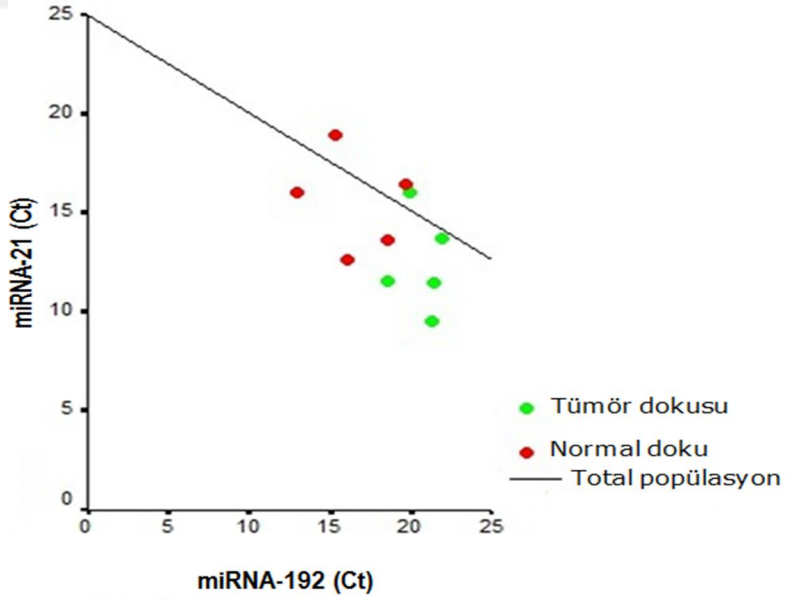
Şekil 4.4. miRNA-21'in tümörlü ve normal dokudaki Ct değerlerinin istatiksel analiz grafiği

miRNA-21'in ekspresyon profili incelendiğinde tümörlü dokuda normal dokuya göre yüksek düzeyde eksprese edilerek (136.051) yukarı (up) regülasyona uğradığı tespit edilmiştir. Ayrıca istatiksel analiz sonucunda tümörlü doku ve normal doku arasında belirlenen bu seviye farkı istatiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur ($p=0.045$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. miRNA-21'in Ct değerleri ile miRNA-145'in Ct değerlerinin korelasyon grafiği

miRNA-21'in tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerleri ile miRNA-145'in tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerlerinin arasındaki bağıntı analizinde iki miRNA arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan negatif bir bağıntının olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.6. miRNA-21'in Ct değerleri ile miRNA-192'nin Ct değerlerinin korelasyon grafiği

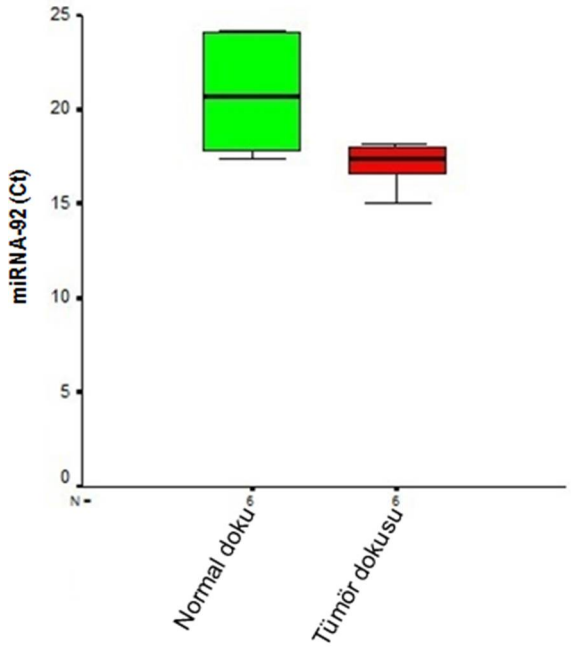
miRNA-21'in tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerleri ile miRNA-192'nin tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerlerinin arasındaki bağıntı analizinde iki

miRNA arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan negatif bir bağıntının olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.6).

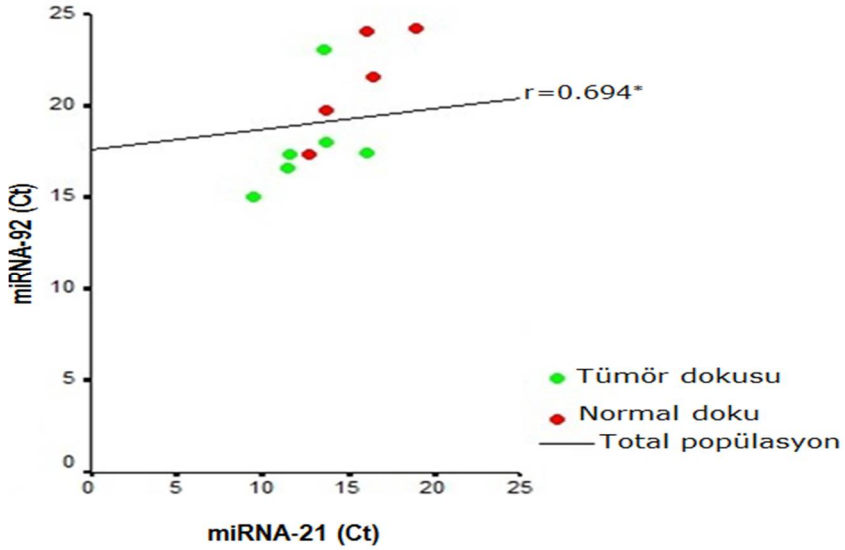
4.4. miRNA-92'nin Ekspresyon Profili

miRNA-92'de CRC'de kilit rol oynayan bir miRNA türüdür. Yapılan çalışmalar miRNA-92'nin CRC'de ekspresyon seviyesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalardan birinde miRNA-17-92 kümesinde bulunan miR-92a'nın direkt olarak kolon kanseri dokularındaki tümör baskılayıcı görev alan Bim genini hedef aldığı ve Bim geninin ekspresyonunu düşürdüğü tespit edilmiştir (Tschuida ve ark., 2011). Çalışmada elde edilen veriler bu çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

miRNA-92'nin ekspresyon profili incelendiğinde miRNA-92'nin tümörlü dokuda normal dokuya göre yüksek düzeyde eksprese edilerek (17.436 kat) yukarı (up) regülasyona uğradığı tespit edilmiştir. Fakat istatiksel analiz sonucunda tümörlü doku ve normal doku arasında belirlenen bu seviye farkı istatiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmamıştır (Şekil 4.7).

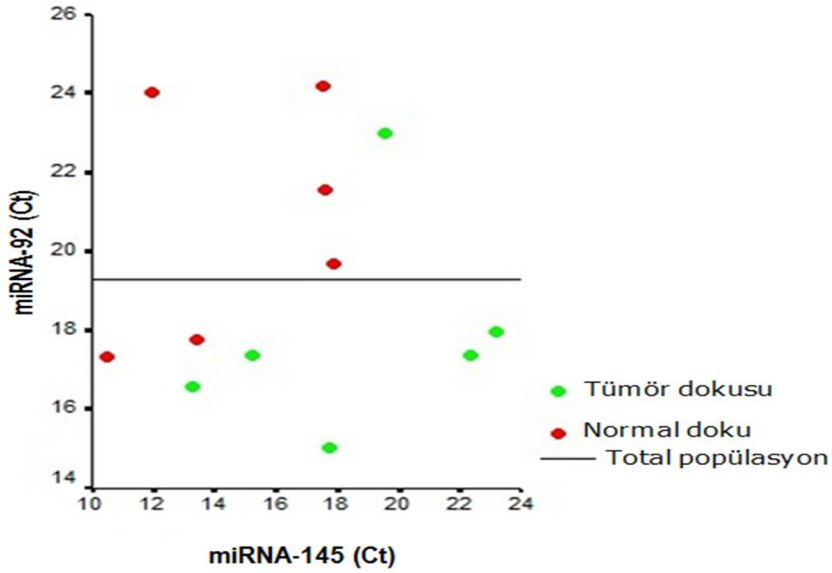


Şekil 4.7. miRNA-92'nin tümörlü ve normal dokudaki Ct değerlerinin istatiksel analiz grafiği



Şekil 4.8. miRNA-92'nin Ct değerleri ile miRNA-21'in Ct değerlerinin korelasyon grafiği

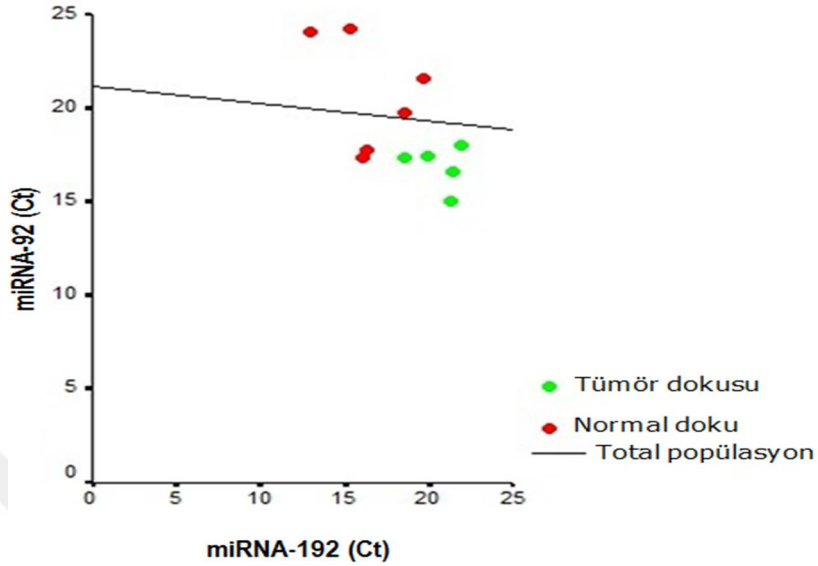
miRNA-92'nin tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerleri ile miRNA-21'in tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerlerinin arasındaki bağıntı analizinde iki miRNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif bağıntının olduğu (r: 0. 694) gözlenmektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.9. miRNA-92'nin Ct değerleri ile miRNA-145'in Ct değerlerinin korelasyon grafiği

miRNA-92'nin tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerleri ile miRNA-145'in tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerlerinin arasındaki bağıntı analizinde iki

miRNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağıntı gözlenmemektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.10. miRNA-92'nin Ct değerleri ile miRNA-192'nin Ct değerlerinin korelasyon grafiği

miRNA-92'nin tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerleri ile miRNA-192'nin tümörlü ve normal dokulardaki Ct değerlerinin arasındaki bağıntı analizinde iki miRNA arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir negatif bağıntı gözlenmektedir (Şekil 4.10).

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sonuçlarımız, eksprese edilen miRNA'lardan miRNA-145 ve miRNA-192'nin kontrol dokularına kıyasla CRC dokularında aşağı regüle olurken miRNA-21 ve miRNA-92'nin kontrol gruplarına göre yukarı regüle olduğunu göstermektedir. CRC' de dahil kanserlerde miRNA seviyelerindeki değişiklikler sadece miRNA biyogenez mekanizmalarındaki değişikliklerden kaynaklanmamaktadır. Aynı zamanda epigenetik kontrol, transkripsiyon faktörleri veya mutasyona uğramış protein kontrolleri gibi sebeplere de bağlıdır. Bu durumda tümör baskılayıcı veya onkogenik etki gösterebilen miRNA'ların CRC'nin başlangıcına, ilerlemesine ve difüzyonuna katkıda bulanacağını söylemek mümkündür.

Son yıllarda, CRC'de anormal miRNA sentezlenmesinden sorumlu mekanizmaları anlamak için önemli ilerlemeler kaydedilmiş ve birkaç miRNA veya miRNA ailesi, CRC lehine kilit düzenleyiciler olarak tespit edilmiştir. Bazı miRNA'ların CRC hücrelerinde aşırı eksprese edildiği ve tümör baskılayıcı genleri baskılayabileceğine dair bilgiler de mevcuttur. CRC teşhisinden sonra miRNA'ya dayalı tedaviler için onkogenik miRNA'ları inhibe etmek veya tümör baskılayıcı miRNA'ları aktive etmek gerekmektedir. Bunun için hedef miRNA'lar ile tamamlayıcı baz eşleştirmesi yoluyla hareket eden tek sarmallı antisens oligonükleotidler (uzunluğunda yaklaşık 20-22 nükleotid) kullanılarak onkogenik miRNA'ların inhibisyonu yönlendirilebilir ya da sentetik mikroRNA'lar veya ekspresyon vektörleri kullanılarak istenilen tümör baskılayıcı miRNA onkogenik miRNA yerine üretilebilir. Son olarak, onkogenik miRNA düzeylerini düşüren veya kanser önleme için tümör baskılayıcı miRNA düzeylerini arttıran ilaçlar geliştirilebilir (Schetter ve ark., 2013; Chi ve Zhou, 2016). Bu hedeflerin gerçekleştirilebilmesi için CRC'de ve tüm kanser türlerinde her bir miRNA'nın rolleri doğru ve kesin bir şekilde tespit edilmelidir. Böylece hastanın değerlendirilmesinde hekimlere yardımcı olabilecek bazı tanı ve prognostik biyolojik belirteçlerin tanımlanmasına ve erken tedavide ileriye dönük belirteçlerin saptanmasına olanak tanınabilir. Ayrıca miRNA'lar gelecekteki kanser tedavisinde

bir hasta için hangi ilaçların seçileceğine karar vermede ve hastanın ilaca cevap verip vermediğinin belirlenmesinde önemli rol oynayabilir (Hayes ve ark., 2014). Çalışma sonucu elde edilen bulgular da miRNA profillerinin belirlenmesine ışık tutarak bu amaçların tümüne hizmet etmektedir.

Sonuç olarak, miRNA'ların biyolojik belirteçlerinin klinik tanı, erken teşhis ve tedavisinde rol oynayabilmesi için daha hassas, hızlı ve etkili yöntemler elde edilmeli ve bu amaçla daha fazla çaba gösterilmelidir. miRNA'lar CRC dahil olmak üzere tüm kanserlerin teşhis ve tedavisinde güçlü bir kaynak olmaya devam edecektir.

Çalışmada kanserli hastalardan alınan tümörlü dokularla normal dokular kıyaslandığında miRNA-145 ve miRNA-192'nin tümörlü dokularda aşağı (down) regülasyona uğradığı gözlenmiştir. CRC gözlenen hastalara ait tümör dokularda miRNA-145'in seviyesinde 0.215 kat azalma tespit edilmiştir. miRNA-192'nin seviyesinde ise 0.061 kat azalma olduğu belirlenmiştir. Bu da miRNA-145 ve miRNA-192'nin tümör baskılayıcı miRNA olduğunu gözler önüne sermektedir. Wilcoxon W test ile yapılan analiz sonucunda tümörlü doku ve normal dokuda eksprese edilen miRNA-192'nin istatistikî olarak bir anlamlıolduğu gözlenmiştir. Wilcoxon W test ile yapılan analiz sonucunda tümörlü doku ve normal dokuda eksprese edilen miRNA-145'in ise istatistikî olarak bir anlamlılığa ulaşmadığı gözlenmiştir.

miRNA-21 ve miRNA-92'nin sağlam ve tümörlü dokularda ekspresyon seviyelerine bakıldığında her ikisinin de tümörlü dokularda up (yukarı) regülasyona uğradığı tespit edilmiştir. CRC gözlenen hastalara ait tümör dokularda miRNA-21'in seviyesinde 136.01 kat artma tespit edilmiştir. miRNA- 92'nin seviyesinde ise 17.436 kat artma olduğu belirlenmiştir. Bu da miRNA-21 ve miRNA-192'nin onkogenik miRNA olduğunu gözler önüne sermektedir. Wilcoxon W test ile yapılan analiz sonucunda tümörlü doku ve normal dokuda eksprese edilen miRNA-21'in istatistikî olarak bir anlamlılığa ulaştığı gözlenmiştir. Wilcoxon W test ile yapılan analiz sonucunda tümörlü doku ve normal dokuda eksprese edilen miRNA-92'nin ise istatistikî olarak bir anlamlılığa ulaşmadığı gözlenmiştir.

- ✓ Mevcut çalışma RNAlater solüsyonu içerisinde fikse edilmiş taze dokular kullanılarak yapılmıştır. Çalışma parafine gömülmüş doku ile gerçekleştirilebilir. Böylece dokularla farklı miRNA'ların ekspresyon seviyeleri incelenebilir.

- ✓ miRNA ekspresyon profilinin belirlenmesi amacıyla kullanılan farklı metotlarla elde edilen verilerin validasyonun yapılması uygun olabilir.

- ✓ Çalışmada olanaklar ölçüsünde örneklerin arttırılması daha geçerli sonuçlara ulaşılmasına olanak sağlayabilir.

KAYNAKLAR

AK, S., 2013. Genç Yaş Kolorektal Kanserlerde Tümör Gelişim Sürecinde miRNA' ların Önemi. Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Bursa, 73s.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., and WALTER, P., 2008. Molecular Biology of the Cell. Taylor & Francis Group, NY, 539p.

ALWINE, JC., KEMP, DJ. V., and STARK, GR., 1977. Method for Detection of Specific RNAs in Agarose Gels by Transfer to Diazobenzyloxymethyl-Paper and Hybridization with DNA Probes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 (12): 5350–5354.

BAJAN, S., and HUTVAGNER, G., 2014. Regulation of miRNA Processing and miRNA Mediated Gene Repression in Cancer. MicroRNA, 3(1): 10-17.

BALTIMORE, D., 1970. RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. Nature, 226(5252): 1209–1211.

BANDRES, E., CUBEDO, E., AGIRRE, X., MALUMBRES, R., ZARATE, R., RAMIREZ, N., ABAJO, A., NAVARRO, A., MORENO, I., MONZO, M and GARCIA-FONCİLLAS, J., 2006. Identification by Real-time PCR of 13 Mature MicroRNAs Differentially Expressed in Colorectal Cancer and Non-tumoral Tissues. Mol. Cancer, 5(1): 29-32.

BINEFA, G., RODRIGUEZ-MORANTA, F., TEULE, A., and MEDINA-HAYAS, M., 2014. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. World J. Gastroenterol, 20(22): 6786–6808.

BOR, Y.C., SWARTZ, J., LI, Y., COYLE, J., REKOSH, D., and HAMMARSKJOLD M.L., 2006. Northern Blot Analysis of RNA from Mammalian Polyribosomes. Nature Protocols, 443(7108): 234 – 237.

BRUCHOVA, H., MERKEROVA, M., and PRCHAL, JT., 2008. Aberrant Expression of MicroRNA in Polycythemia Vera. Haematologica, 93(7): 1009-1016.

CALIN, GA., DUMITRU, CD., SHIMIZU, M., BICHI, R., ZUPO, S., and NOCH, E., 2002. Frequent Deletions and Down-Regulation of MicroRNA Genes miR15 and miR16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(24): 15524-15529.

CALIN, GA., FERRACIN, M., CIMMINO, A., DI LEVA, G., SHIMIZU, M., and WOJCIK, SE., 2005. A microRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. N. Engl. J. Med., 353(17): 1793-1801.

CANTÜRK, K.M., 2010. Mesane Kanserinde miRNA'ların Ekspresyonlarının Belirlenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 76s.

CARLO, M., and CROCE, M.D., 2009. Causes and Consequences of microRNA Dysregulation in Cancer. Nat. Rev. Genet, 10(10): 704–714.

CARROLL, D., SHANAGHER, D., LYNCH M., 2016. Generalist Palliative Care Delivered by Community Nurses. J. Comm. Pub. Health. Nurs., 2(1): 122-123.

CEKAITE, L., EIDE, PW., LIND, GE., SKOTHEIM, RI., and LOTHE RA., 2016. MicroRNAs as growth regulators, their function and biomarker status in colorectal cancer. Oncotarget, 7(6): 6476-6505.

CHEN, CZ., 2005. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. N. Engl. J. Med., 353(3): 1768–1771.

CHIANG, Y., SONG, Y., WANG Z., LIU Z, GAO P, LIANG J., ZHU J., XING, C., and XU, H., 2012. MicroRNA-192, -194 and -215 are frequently downregulated in colorectal cancer. Experımental and Therapeutıc Medicine 3(2): 560-566.

CHI, Y., ZHOU, D., 2016. MicroRNAs in colorectal carcinoma: from pathogenesis to therapy. J. ExpClin Cancer Res., 35(1): 43-44.

CIAFRE, SA., GALARDI, S., MANGIOLA, A., FERRACIN, M., LIU, CG., and SABATINO, G., 2005. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. Biochem Biophys Res. Commun., 334(4): 1351-1358.

CIMMINO, A., CALIN, GA., FABRI, M., IORIO, MV., FERRACIN, M., SHIMIZU, M., WOJCIK, SE., AQEILAN, RI., ZUPO, S., DONO, M., RASSENTI, L., ALDER, H., VOLINIA, S., LIU, CG., KIPPS, TJ., NEGRINI, M., and CROCE, CM., 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting bcl2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(39): 13944–13949.

COWLAND, JB., HOTHER, C., and GRONBAEK, K., 2007. MicroRNAs and cancer. Wiley Online Library, 115(10): 1090 -1106.

CUMMINS, JM., HE, Y., LEAR,Y RJ., PAGLIARINI, R., DIAZ LA, JR., SJOBLOM, T., BARAD, O., BENTWICH, Z., SZAFRANSKA, AE., LABOURIER, E., RAYMOND, CK., ROBERTS, BS., JUHL, H., KINZLER, KW., VOGELSTEIN, B., and VELCULESCU., 2006. The colorectal microRNAome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103(10): 3687-3692.

ÇELİK, AŞÇI, D., ASLAN, KOŞAR, P., ve ÖZÇELİK, N., 2013. MikroRNA'lar and kanser ile ilişkisi. Medical Journal of Suleyman Demirel University, 20(3): 121-127.

DEMİR, Ü., 2008. Meme Kanserli Olgularda MiRNA-125a and MiRNA-34a MikroRNA'larının Genomik Dizilerinin Dizileme Yöntemiyle İncelenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 52s.

DENLI, A., M., TOPS, B., B. J., PLASTERK, R. H. A., KETTING, R. F., and HANNON, G. J., 2004. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. Nature, 432(7014): 231–235.

DOBRUCALI, A., 2003. Kolorektal kanserde sınıflama and etyopatogenez. Kolon, rektum and anorektal bölge hastalıkları, Tasarım yayıncılık, Istanbul, s:395-412.

DOUBENI, C.A., 2017. Colorectal Cancer Screening Comparative Effectiveness—Clinical Trials Are Not Always the Answer. JAMA Intern Med., 177(1):143-144.

EIS, PS., TAM, W., SUN, L., CHADBURN, A., LI, Z., GOMEZ, MF., LUND, E., and DAHLBERG, JE., 2005. Accumulation of miRNA-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(10): 3627-3632.

ESQUELA-KERSCHER, A., and SLACK, F.J., 2006. OncomiRs - microRNAs with a role in cancer. Nat. Rev. Cancer, 6(4): 259–269.

EX, DK., JOHNSON, DA., and ANDERSON, JC., 2009. American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening. Am. J. Gastroenterol, 104(1): 739-740.

FEARON, ER., and VOGELSTEIN, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 61(5): 759-767.

FLORI, P., BELLETE, B., DURAND, F., RABERIN, H., CAZORLA, C., and HAFID, J., 2004. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different stainin techniques for diagnosing Pneumocystis jiroveci pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol, 53(7): 603–607.

GARZON, R., VOLINIA, S., LIU, CG., FERNANDEZ-CYMERING, C., PALUMBO, T., and PICHIORRI, F., 2008. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. Blood, 111(6): 3183-3189.

GENG, L., CHAUDHURI, A., TALMON, G., WISECARVER, J. L., ARE, C., BRATTAIN, M., and WANG, J., 2013. MicroRNA-192 suppresses liver metastasis of colon cancer. Oncogene, 33(46): 5332-5340.

GIOVANNUCCI, E., 2001. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. Cancer Epidemiol Biomark Prev, 10(7): 725-731.

GIRONELLA, M., SEUX, M., XIE, MJ., CANO, C., TOMASINI, R., and GOMMEAUX, J., 2007. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miRNA-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104(41): 16170-16175.

GREGORY, RI., CHENDRIMADA, TP., COOCH, N., and SHIEKHATTAR, R., 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. Cell, 123(4): 631-640.

GRIFFITHS-JONES, S., 2004. The microRNA Registry. Nucleic Acids Res., 32(1): 109–111.

HAGGAR, F.A AND BOUSHEY, R.P., 2009. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Surg., 22(4): 191-197.

HAYES, J., PERUZZI, PP., LAWLER, S., 2014. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. Trends Mol. Med., 20(8): 460-469.

HE, L., THOMSON, JM., HEMANN, MT., HERNANDO-MONGE, E., MU, D., GOODSON, S. POWERS, S., CORDON-CARDO, C., LOWE, SW., HANNON, GJ., and HAMMOND, SM., 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature, 435(7043): 828-833.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., and WATSON, R., 1993. Kinetic PCR: Real time monitoring of dna amplification reactions. Biotechnology, 11(9): 1026-1030.

HILL, J. P., and STEWART, A. B., 1992. The Polymerase Chain Reaction in Molecular and Microbiology. Biotechnology and genetic engineering reviews, 10(1): 343-377.

HUR, K. , TOIYAMA, Y., TAKAHASHI, M., BALAGUER, F., TAKESHI, N., KOIKE, J., HEMMI, H., KOI, M., BOLAND, C. R., and GOEL A., 2013. MicroRNA-200c modulates epithelial-to mesenchymal transition (EMT) in human BioMed Research International 9 colorectal cancer metastasis. Gut, 62(9): 1315–1326.

IORIO, MV., FERRACIN, M., LIU, CG., VERONESE, A., SPIZZO, R., and SABBIONI S., 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res., 65(16): 7065-7070.

İSTATİSTİKLER. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Derneği. http://www.turkkanser.org/sayfa/istatistikler. Erişim Tarihi: 02.06.2017.

JOSHI, M., and DESHPANDE, J. D., 2011. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. International Journal of Biomedical Research, 2(1): 81-97.

KARAGÜN, Ş. B., ANTMEN, B., ŞAŞMAZ, İ., ve KILINÇ, Y., 2014. MikroRNA and Cancer. Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 12(1): 45-56.

KENT, OA., and MENDELL, JT., 2006. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. Oncogene, 25(46): 6188–6196.

KEVIL, C. G., WALSH, L., LAROUX, F. S., KALOGERIS, T., GRISHAM, M. B., and ALEXANDER, J. S., 1997. An Improve, Rapid Northern Protocol. Biochem. and Biophys. Research Comm., 238(2): 277–279.

KISSELJOV, F. L., 2014. MicroRNAs and cancer. Molecular Biology, 48(2): 197-206.

KOTHAPALLI, R., YODER, SJ., MANE, S., and JR, T., 2002. Microarray results: how accurate are they? BMC Bioinformatics, 3(1): 22-23.

KREFT, K., KREFT, S., KOMEL, R., and GRUBIČ, Z., 2000. Nonradioactive northern blotting for the determination of acetylcholinesterase mRNA. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol, 439(3): 66-67.

KRYNDUSHKIN, DS., ALEXANDROV, IM., TER-AVANESYAN, MD., and KUSHNIROV, VV., 2003. Yeast [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. Journal of Biological Chemistry, 278(49): 49636-49643.

KÜÇÜKHÜSEYİN, Ö., ve ÖZTÜRK, O., 2013. miRNA'lar ve Meme Kanserindeki Etkileri MicroRNAs and Their Roles in Breast Cancer, Deneysel Tıp Araştırma Dergisi, 3(5): 13-24.

LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., LENDECKEL, W., and TUSCHL, T., 2001. Identification of noandl genes coding for small expressed RNAs. Science, 294(5543): 853-858.

LAWYER, FC., STOFFEL, S. SAIKI, RK., MYAMBO, K., DRUMMOND, R., and GELFAND, DH., 1989. Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase from Thermus aquaticus. J. Biol. Chem., 264(11): 6427−6437.

LEE, RC., FEINBAUM, RL., and AMBROS, V., 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 75(5): 843-54.

LEE, Y., JEON, K., LEE, JT., KIM, S., and KIM, VN., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. EMBO J., 21(17): 4663–4670.

LETELIER, P., GARCIA, P., LEAL, P., ÁLVAREZ, H., ILI, C., LÓPEZ, J., CASTILLO, J.,BREBI, P., and ROA, J.C., 2014. miRNA-1 and miRNA-145 act as tumor suppressor microRNAs in gallbladder cancer. Int. J. Clin. Exp. Pathol., 7(5): 1849–1867.

LIN, PY., YU, SL., and YANG, PC., 2010. MicroRNA in lung cancer. Brit. J. Cancer, 103(8): 1144-1148.

LIPSHUTZ, R. J., MORRIS, D., CHEE, M., HUBBELL, E., KOZAL, M. J., SHAH, N., SHEN, N., YANG, R., and FODOR, S. P., 1995. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity, Biotechniques, 19(43): 442-447.

LOFFLER, D., BROCKE-HEIDRICH, K., PFEIFER, G., STOCSITS, C., HACKERMULLER, J., KRETZSCHMAR, AK., BURGER, R., GRAMATZKI, M., BLUMERT, C., BAUER, K., CVIJIC, H., ULLMANN, AK., STADLER, PF., and HORN, F., 2007. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involands the Stat3-mediated induction of microRNA- 21 through a highly conserandd enhancer. Blood, 110(4): 1330-1333.

LU, J., GETZ, G., MISKA, EA. ALVAREZ-SAAVEDRA, E., LAMB, J., PECK, D., SWEET-CORDERO, A., EBERT, BL., MAK, RH., FERRANDO, AA., DOWNING, JR., JACKS, T., HORVITZ, HR., and GOLUB, TR., 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature, 435(7043): 834-838.

LUCCHINI, S., THOMPSON, A., and HINTON, J.C.D., 2001. Microarrays for microbiologists, Microbiology, 147(6): 1403-1414.

LUJAMBIO, A., and LOWE, S. W., 2012. The microcosmos of cancer. Nature, 482(7385): 347–355.

LUND, E., GUTTİNGER, S., CALADO, A., DAHLBERG, JE., and KUTAY, U., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. Science, 303(5654): 95-98.

MACFARLANE, LA., and MURPHY, PR., 2010. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer, Curr. Genomics, 11(7): 537–561.

MAZEH, H., MIZRAHI, I., ILYAYEV, N., HALLE, D., BRUCHER, BLDM., BILCHIK, A., PROTIC, M., DAUMER, M., STOJADINOVIC, A., AVITAL, I., and NISSAN, A., 2013. The diagnostic and prognostic role of microRNA in colorectal cancer- a comprehensive review. J. Cancer, 4(3): 281-295.

MENDELL, JT., 2008. MiRiad roles for the miRNA-17-92 cluster in deandlopment and disease. Cell, 133(2): 217-222.

MENG, F., HENSON, R., WEHBE-JANEK, H., GHOSHAL, K., JACOB, ST., and PATEL, T., 2007. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology, 133(2): 647-658.

MICHAEL, MZ, O. CONNOR, SM., VAN HOLST PELLEKAAN, NG., YOUNG, GP., and JAMES, RJ., 2003. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. Mol. Cancer Res., 1(12): 882-891.

MONZO, M., NAVARRO, A., BANDRES, E., ARTELLS, R., MORENO, I., GEL, B., IBEAS, R., MORENO, J., MARTINEZ, F., DIAZ, T., MARTİNEZ, A., BALAGUÉ, O., and GARCIA-FONCILLAS, J., 2008. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. Cell, 18(8): 823-833.

MURAKAMI, Y., YASUDA, T., SAIGO, K., URASHİMA, T., TOYODA, H., OKANOUE, T., and SHIMOTOHNO, K., 2006. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. Oncogene, 25(17): 2537-2545.

NOBEL MEDIA, AB., 2014. The Nobel Prize In Chemistry 1993, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/. Erişim Tarihi: 26. 10. 2017.

ÖZMEN, M., 2014. Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2013. Türkiye İstatistik Kurumu, http://www.tuik.gov.tr. Erişim Tarihi: 26. 10. 2017.

ÖZTUNÇ, C., 2012. T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemili Hastalarda Mikrorna (miRNA) Gen Anlatımının Tespiti. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 76s.

PAGLIUCA, A., VALVO, C., FABRIZI, E., DI MARTINO,S., BIFFONI, M., RUNCI, D., FORTE, S., DE MARIA, S., and RICCI-VITIANI, L., 2013. Analysis of the combined action of miRNA-143 and miRNA-145 on oncogenic pathways in colorectal cancer cells reveals a coordinate program of gene repression. Oncogene, 32(40): 4806–4813.

PANG, Y., YOUNG, C. Y., and YUAN, H., 2010. MicroRNAs and prostate cancer. Acta. Biochim. Biophys. Sin., 42(6): 363-369.

PAPADOPOULOS, GL., RECZKO, M., SIMOSSIS, VA., SETHUPATHY, P., and HATZIGEORGIOU AG., 2009. The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. Nucleic Acids Res., 37(1): 155–158.

PASQUINELLI, AE., REINHART, BJ., SLACK, F., MARTINDALE, MQ., KURODA, MI., MALLER B., HAYWARD, DC., BALL, EE., DEGNAN, B., MULLER, P., SPRING, J., SRINIVASAN, A., FISHMAN, M., FINNERTY, J., CORBO, J., LEVINE, M., LEAHY, P., DAVIDSON, E, and RUVKUN, G., 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature, 408(6808): 86-89.

REINHART, BJ., SLACK, FJ., BASSON, M., PASQUINELLI, AE., BETTINGER, JC., ROUGVIE, AE. HORVITZ, HR., and RUVKUN, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates deandlopmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature, 403(6772): 901-906.

REINHART, B.J., WEINSTEIN, E.G., RHOADES, M.W., BARTEL, B. and BARTEL, D.P., 2002. MicroRNAs in plants. Genes Dev., 16(17): 1616-1626.

REN, A., DONG, Y., TSOI, H., and YU, J., 2015. Detection Of MiRNA as Non-Invasive Biomarkers of Colorectal Cancer, 16(2): 2810–2823.

ROTHSCHILD, S., 2014. MicroRNA therapies in cancer. Molecular and Cellular Therapies, 2(7): 1-8.

SAIKI, R., SCHARF, S. FALOONA, F., MULLIS, K., HORN, G., ERLICH, H., and ARNHEIM, N., 1985. A novel method for the parental diagnosis of sickle cell anemia. Am. J. Hum. Genet., 37(1): 172-173.

SAMBROOK, J., and RUSSEL, DW., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NewYork, 34p.

SAYDAM, F., DEĞİRMENCİ, İ., ve GÜNEŞ, HV., 2011. Mikro RNA'lar and kanser. Dicle Medical Journal, 38(1): 113-120.

SCHEE, K., FODSTAD, Ø., and FLATMARK, K., 2010. MicroRNAs as Biomarkers in Colorectal Cancer, 177(4): 1592-1599.

SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W., and BROWN, P. O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 270(5235): 467-470.

SCHETTER, AJ., LEUNG, SY., SOHN, JJ., ZANETTI, KA., BOWMAN, ED., YANAIHARA, N., YUEN, ST., CHAN, TL., KWONG, DL., AU, GK., LIU,

CG., CALIN, GA., CROCE, CM., and HARRIS, CC., 2008. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. JAMA., 299(1): 425–436.

SCHETTER, A.J., OKAYAMA, H., and HARRIS, C.C., 2012 . The Role of microRNAs in Colorectal Cancer, Cancer J., 18(3): 244–252.

SCHLAMP, K., WEINMANN, A., KRUPP, M., MAASS, T., GALLE, P. R., and TEUFEL, A., 2008. BlotBase: A northern blot database. Gene, 427(1): 47-50.

SCHMITTGEN, TD., ZAKRAJSEK, BA., MILLS, AG., GORN, V., SINGER, MJ., and REED, MW., 2000. Quantitative reverrse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: Comparison of endpoint and real-time methods. Anal. Biochem., 285(2): 194–204.

SEVLİ, S., UZUMCU, A., SOLAK, M., ITTMAN, M., ve OZEN, M., 2010. The function microRNAs, small potent molecules in human prostate cancer. Prostate Cancer P. D., 13(3): 208-217.

SHENOUDA, S.K., and ALAHARI, S.K., 2009. Cancer Metastasis Rev., 28(3): 369-378.

SIMONI, R. D., HILL, R. L., VAUGHAN, M., and TABOR, H., 2003. A Classic Instrument: The Beckman DU Spectrophotometer and Its Inventor, Arnold O. Beckman. The Journal of Biological Chemistry, 278(1): 49-50.

SLABY, O., SVOBODA, M., MICHALEK, J., and VYZULA, R., 2009. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. Molecular Cancer, 8(1): 102-103.

SLACK, FJ., JOHNSON, SM., GROSSHANS, H., SHINGARA, J., BYROM, M ., JARVIS, R., CHENG, A., LABOURIER, E., REINERT, KL., and BROWN, D., 2005. Ras is regulated by the let-7 microRNA family. Cell, 120(5): 635–647.

SPIZZO, R., NICOLOSO, MS., CROCE, CM., and CALIN, GA., 2009 SnapShot: MicroRNAs in Cancer. Cell, 137(3): 586–586.

SULIS, M., 2003. PTEN: From pathology to biology. Trends in Cell Biology, 13(9): 478-483.

TAM, W., BEN-YEHUDA, D., and HAYWARD, WS., 1997. BIC, a noandl gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. Mol. Cell Biol, 17(3): 1490-1502.

TANIGUCHI, M., MIURA, K., IWAO, H., and YAMANAKA, S., 2001. Quantitative Assessment of DNA Microarrays – Comparison with Northern Blot Analysis. Genomics, 71(1): 34-39.

TAUB, FE., DELEO, JM., THOMPSON, EB., 1983. Laboratory methods: Sequential comparative hybridizations analyzed by computerized image processing can identify and quantitate regulated RNAs. DNA, 2(4): 309-327.

TRAVERSO, G., SHUBER, A., OLSSON, L., LEVIN, B., JOHNSON, C., HAMILTON, SR., BOYNTON, K., KINZLER, KW., and VOGELSTEIN, B., 2002. Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. Lancet, 359(9304): 403-404.

TSANG, A. H., 2014. Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer and colorectal adenoma. World Journal of Gastroenterology, 20(14): 3847-3857.

TSUCHIDA, A., OHNO, S., WU, W., BORJIGIN, N., FUJITA, K., AOKI, T., UEDA, S., TAKANASHI, M., and KURODA, M., 2011. miRNA-92 is a key oncogenic component of the miRNA-17-92 cluster in colon cancer. Cancer Sci, 102(12): 2264-2271.

TÜRKİYE'DE KANSER KAYITÇILIĞI. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı. http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi/ Erişim Tarihi: 02.06.2017.

URL-1, http://dyes.gene-quantification.info. Erişim Tarihi: 20.09.2017.

URL-2, https://www.dna.utah.edu/LightCycler/Top_LightCycler.html. Erişim Tarihi: 17.09.2017.

URL-3, http://www.thermofisher.com/tr. Erişim Tarihi: 20.09.2017.

URL-4, http://www.bio-rad.com. Erişim Tarihi: 02.09.2017.

UYANIKOĞLU, A., DAVUTOĞLU, C., ZEYBEK, E., ve DANALIOĞLU, A., 2005. İç hastalıkları endoskopi ünitesi 6 yıllık alt gastrointestinal endoskopi sonuçları. Vakıf Gureba Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi, 3(1): 131-134.

VALASEK, MA., and REPA, JJ., 2005. The power of real-time PCR. Adv Physiol Educ, 29(3): 151–159.

VENTURA, A., and JACKS, T., 2009. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. Cell, 136(4): 586–591.

VIERSTRATE, A., 1999. https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html. Erişim Tarihi: 02.06.2017.

VOLINIA, S., CALIN, GA., LIU, CG., AMBS, S., CIMMINO, A., PETROCCA, F., VISONE, R., IORIO, M., ROLDO, C., FERRACIN, M., PRUEITT, RL., YANAIHARA, N., LANZA, G., SCARPA, A., VECCHIONE, A., NEGRINI, M., HARRIS, CC., and CROCE, CM., 2006 . MicroRNA expression signature in human solid tumors defines cancer targets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 103(7): 2257-61.

VOLKIN, E., and CARTER, CE., 1951.The Preparation and Properties of Mammalian Ribonucleic Acids. J. Am. Chem. Soc., 73 (4): 1516–1519.

WANG, D., QIU, C., ZHANG, H., WANG, J., CUI, Q., and YIN, Y., 2010. Human MicroRNA Oncogenes and Tumor Suppressors Show Significantly Different Biological Patterns: From Functions to Targets. Plos One, 5(9): 13067-13080.

WEIGHARDT, F., 2006. Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri, Avrupa Birliği Resmi Yayınlar Dairesi, Luksemburg, 238s

WOMG, M. L., and MEDRANO, J. F., 2005. Review: Real Time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques, 39(1): 75-85.

XING, Z., LI, D., YANG, L., XI, Y., and SU, X., 2014. MicroRNAs and anticancer drugs .Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai), 46(3): 233-239.

YOLTAŞ, A., ve KARABOZ, İ., 2010. DNA Mikroarray Teknolojisi and Uygulama Alanları. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, Türkiye, 8(1): 01-19.

YE, J. J., and CAO, J., 2014. MicroRNAs in colorectal cancer as markers and targets: Recent advances. World Journal of Gastroenterology, 20(15): 4288–4299.

YÜCEL, Y., AKTÜMEN, A., AYDOĞAN, T., UYANIKOĞLU, A., ŞEKER, A., GÖZENELİ, O., ÖZGÖNÜL, A., TERZİ, A., ve UZUNKÖY, A., 2015. Alt gastrointestinal endoskopisi: 1800 olgunun retrospektif analizi and kolorektal kanser sıklığının belirlenmesi. Endoskopi, 23(1): 6-8.

ZAMANİ, A. G ve ZAMANİ, A., 2013. MikroRNA'lar ve akciğer kanseri, 61(1): 57-62.

ZHANG, B., PAN, X., COBB, GP., and ANDERSON, TA., 2007. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev. Biol., 302(1): 1–12.

ZHU, W, XU, B., 2014. MicroRNA-21 Identified as Predictor of Cancer Outcome: A Meta-Analysis. Plos One, 9(8): 1033-1073.

ZISMAN, AL., 2006. Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: Implications for screening. Arch. Intern. Med., 166(6): 629–634.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad: Dilek ACAR
Uyruğu: T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: 02.09.1989
Telefon: 05443208666
Faks:
E- mail: cimen.acar.dilek@gmail.com

EĞİTİM

Derece:	Adı, İlçe, İl:	Bitirme Yılı
Lise :	Bahçelievler Deneme Lisesi, Çankaya, ANKARA	2007
Üniversite :	Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Çankaya, ANKARA	2012
Yüksek Lisans:	Harran Üniversitesi, Osmanbey Kampüsü, ŞANLIURFA	-
Doktora : -		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl:	Kurum:	Görevi:
2012-	Şanlıurfa Bilim ve Sanat Merkezi	Fen Bilimleri Öğretmeni

UZMANLIK ALANI: Eğitim, Fen, Biyoloji

YABANCI DİLLER: İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER: -

YAYINLAR: -