T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOLON KANSERİNDE TÜMÖR SUPRESSÖR MİKRORNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

Emine TEKER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2018

T.C

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOLON KANSERİNDE TÜMÖR SUPRESSÖR MİKRORNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

Emine TEKER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2018

Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ danışmanlığında, Emine TEKER'in hazırladığı **"Kolon Kanserinde Tümör Supressör mikroRNA'ların Araştırılması"** konulu bu çalışma 24/05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak ile kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ ……..

Üye : Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN ……

Üye : Dr. Öğr. Üyesi 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:15159

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirilerin, 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.Kanser 5
2.1.1. Kanserin tarihçesi 7
2.1.2. Kanserin moleküler biyolojisi ve mekanizmaları 9
2.1.3.Kanserin tedavisi 11
2.2. Kolon Nedir? 12
2.2.1.Kolon kanseri ve oluşumu 13
2.3. MikroRNA'ların Genel Yapısı ve İşlevi 15
2.3.1. miRNA'ların tarihçesi 18
2.3.2. miRNA'nın biyogenezi 18
2.3.3. MikroRNA ve kanser 20
2.3.4. Onkogenik ve Tümör supressör mikroRNA'lar 21
2.3.5.Tümör supressör mikroRNA'lar 22
2.3.6. Onkogenik miRNA'lar 25
2.4.Mikroarray 28
2.4.1.Mikroarray'in kullanım alanları 31
2.4.2. Mikroarray teknolojisinin avantajları 32
2.4.3. Mikroarray teknolojisinin dezavantajları 32
3. MATERYAL ve YÖNTEM 33
3.1. Materyal 33
3.1.1. Hasta seçimi 33
3.2. Yöntem 33
3.2.1. Mikroarray yöntemi 33
3.2.1.1. Total RNA izolasyonu 34
3.2.1.2. RNA kalitesinin ve miktarının belirlenmesi 35
3.2.1.2.1. Nanodrop ölçümü 35
3.2.1.3. Elektroforez 36
3.2.1.3.1. Jel hazırlanması 37
3.2.1.3.2. RNA örneklerinin agaroz jele yüklenmesi 38
3.2.1.4. Poly (A) kuyruğu eklenmesi 38
3.2.1.5. Flash tag biotin hsr ligasyon aşaması 39
3.2.1.6. Hibridizasyon aşaması 40
3.2.1.7. Yıkama-boyama-tarama 41
3.2.1.8. Analiz 42
4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 44
4.1. miRNA-320c-2'nin Ekspresyon Profili 45
4.2. miRNA-520a'nin Ekspresyon Profili 46
4.3. miRNA-1298'nin Ekspresyon Profili 47
4.4. miRNA-635'nin Ekspresyon Profili 48
4.5. miRNA-let-7f'nin Ekspresyon Profili 49
4.6. miRNA-548f-1'nin Ekspresyon Profili 50
4.7. miRNA-550-1'nin Ekspresyon Profili 51
4.8. miRNA-451'in Ekspresyon Profili 52
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 54
KAYNAKLAR 57
ÖZGEÇMİŞ 63

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOLON KANSERİNDE TÜMÖR SUPRESSÖR MİKRORNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

Emine TEKER

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ
Yıl: 2018, Sayfa: 63

Kolon kanseri, en sık görülen gastrointestinal sistem kanseri olup, genetik faktörler, çevresel maruziyetler, diyet, sindirim sisteminin inflamatuar durumları gibi etiyolojik nedenlere bağlı olarak gelişen bir multifaktöriyel hastalıktır. Özellikle son on yıldır, bu hastalıkla mücadele amacıyla; kolon kanserinin mekanizmalarını anlamaya ve yeni tedavi stratejileri belirlemek üzere yoğun bir çaba sarf edilmektedir. Çalışmamızda, kolorektal kanser teşhisi konmuş 6 hastanın kolon bölgesinden alınan normal ve tümör dokularda, tümör süpressör özellikte miRNA ekspresyonları araştırılmıştır. Normal ve tümör dokularında miRNA ekspresyonları mikroarray yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu dokularda eksprese olan miRNA' ların kat değişim değerleri karşılaştırılmış, normal dokuya oranla tümör dokusunda ekspresyonları baskılanan, 8 adet tümör süpresör miRNA belirlenmiştir. Mikroarray teknolojisi gerek kolon kanserinde ve gerekse de bu kanserin öncül lezyonlarında, eş zamanlı olarak geniş sayıda genin transkripsiyon profillerini incelemeye fırsat oluşturmaktadır. Bulgularımız, kolon kanserinde kişiye özel tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından hedef miRNA'ların seçimi için önemli bir veri kaynağıdır.

ANAHTAR KELİMELER: Kolon Kanseri, miRNA, Mikroarray Teknolojisi, Tümör Supressör.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF TUMOR SUPRESSOR MIKRORNA IN COLON CANCER

Emine TEKER

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

Supervisor: Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ
Year: 2018, Page: 63

Colon cancer is the most common gastrointestinal system carcinoma and is a multifactorial disease that develops due to etiologic factors such as genetic factors, environmental exposures, diet, and inflammatory conditions of the digestive tract. Especially in the last decade, in order to combat this disease; intensive efforts have been made to understand the mechanisms of colon cancer and to determine new treatment strategies. In our study, tumor suppressor miRNA expressions were investigated in normal and tumor tissues from colon regions of 6 patients diagnosed with colorectal cancer. miRNA expressions in normal and tumor tissues were determined using microarray method. The fold change values of the miRNAs expressed in these tissues were compared and 8 tumor suppressor miRNAs which expressions were suppressed in tumor tissues compared to normal tissues were determined. Microarray technology provides an opportunity to examine large numbers of transcription profiling in large numbers simultaneously in colon cancer, and also in the initial lesions of this cancer. Our findings are an important data source for the selection of target miRNAs in terms of the determination of patient-specific treatment options in colon cancer.

KEY WORDS: Colon Cancer, MicroRNA, MicroarrayTechnology, Tumor Suppressor.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda yardımını esirgemeyen ve zamanını harcamaktan kaçınmayan, bana her konuda destek veren danışman hocam Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ'e, çalışmama destek sunan HÜBAK'a, yüksek lisans çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen Sema ATMANOĞLU, Hasine YEL ve Havva GÜMÜŞ'e teşekkür ederim. Her zaman desteklerini hissettiğim, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Kansere neden olan faktörlerin grupları 7
Şekil 2.2. Kolonun anatomik yapısı 13
Şekil 2.3. Genomik ve epigenetik faktörler ile kolorektal kanser gelişimi 15
Şekil 2.4. miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanması 16
Şekil 2.5. miRNA' ların Biyogenezi, İşlenmesi ve Olgunlaşması 19
Şekil 2.6. Onkogenik ve Tümör Süpressör MikroRNA'lar 22
Şekil 2.7. Tümör supressör mikroRNA 23
Şekil 2.8. miRNA'nın kanser patolojisini kapsayan moleküler mekanizması 24
Şekil 2.9. miR 17-92' nin fonksiyonu 26
Şekil 2.10. Mikroarray sistemi (Affymetrix) 30
Şekil 3.1. Doku Homojenizasyon Cihazı (Precellys Evolution, cryolys) 35
Şekil 3.2. Nanodrop cihazı (Implen) 36
Şekil 3.3. Elektroforez Sistemi (Cleaver) 37
Şekil 3.4. Elektroforez Sistemi (Cleaver) 38
Şekil 3.5. Doku örneklerinden elde edilen PCR ürünlerinin yüklendiği Mikroarray çipi 41
Şekil 4.1. miRNA-320c-2'nin tümörlü ve normal dokudaki Linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* p<0.05) 46
Şekil 4.2. miRNA-520'nin tümörlü ve normal dokudaki Linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* p<0.05) 47
Şekil 4.3. miRNA-1298'in tümörlü ve normal dokudaki Linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* p<0.05) 48
Şekil 4.4. miRNA-635'in tümörlü ve normal dokudaki Linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* p<0.05) 49
Şekil 4.5. miRNA-let-7'nin tümörlü ve normal dokudaki Linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* p<0.05) 50
Şekil 4.6. miRNA-548f-1'in tümörlü ve normal dokudaki Linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* *p<0.01) 51
Şekil 4.7. miRNA-550-1'in tümörlü ve normal dokudaki Linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* p<0.05) 52
Şekil 4.8. miRNA-451'in tümörlü ve normal dokudaki Linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* p<0.05) 53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Poly (A) Tailing master miks içeriği 39
Çizelge 3.2.Ligasyon miks bileşenleri 40
Çizelge 3.3. Hibridizasyon miks içeriği 40
Çizelge 3.4. Boyama işlemi bileşenler……..42
Çizelge 4.1. miRNA transkriptlerinde down-regüle olan bazı miRNA'lar 45

SİMGELER DİZİNİ

miRNA	MikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
HPV	Human Papilloma Virus
pri-miRNA	Primer transkript
Microprocessor complex	Mikroişlemci kompleks
DNA	Deoksiribonükleik asit
Microprocessor complex	Mikroişlemci kompleks
BIC	Bcell Integration Cluster
KLL	Kronik Lenfositik Lösemili
TSmir	Tümör süpresör miRNA'lar
Mikrodizilim	Mikroarray
°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
CRC	Kolon Kanseri (Kolorektal Kanser)
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
ml	Mililitre
nm	Nanometre
ng	Nanogram
NACIO	Sodyum Hipoklorit
TAC	Transcriptome Analysis Console
ANOVA	Analysis of Variance
*	İstatiksel Olarak Anlamlı

1.GİRİŞ

Kanser, çeşitli nedenlerden ötürü hücrenin bölünmesini kontrol eden noktalarda zarar görmüş olan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla karakterize olan bir sağlık sorunudur. Kanser, görülme sıklığı ve ölüm oranı açısından yüksek seviyede görülen bir hastalık olmasıyla beraber tüm dünyada büyük bir önem arz etmektedir. Ölüm nedenlerinin araştırıldığı Türkiye'de ve ABD'de kanser ölüme en çok neden olarak ikinci sırada yer almaktadır (Anonim, 2013a; American Cancer Society, 2013). Kanser hastalığının tedavisinden daha iyi sonuç alınabilmesi ve tedaviye erken yanıt vermesi için erken teşhis çok önemlidir. Çeşitli kanser türlerinden rektum, meme, serviks, ve kolonda gelişen tümörler erken teşhistarama yöntemleriyle taranabilmekte ve böylece ölüm seviyelerinde önemli düşüş görülmektedir (American Cancer Society, 2013). Kanser hangi evrede olduğu ve ne denli yayıldığı belirlenerek hangi kanser çeşidi olduğu ve hangi evrede olduğuna göre ameliyat, kemoterapi veya radyoterapi gibi yöntemler uygulanabilmektedir (Anonim, 2013b).

Sağlık Bakanlığı'nın hazırlamış olduğu Sağlık İstatistiki Yıllığının 2010 daki verilerinde Türkiye'de görülen kanser çeşitlerinden erkek ve bayanlarda görülme sıklığı açısından bayanlarda ilk sıralarda kolorektal, meme, tiroid, ve mide kanserleri yer alırken erkeklerde isemesane, prostat,akciğer ve kolorektal kanserleri yer almaktadır (Anonim, 2010). Çocukluk çağında en sık görülen kanser türleri lösemi, beyin, kemik ve böbrek tümörleri, lenfomalar (Çağlar, 2006).

Kanser çeşitlerinden biri olan kolon kanseri ölüm oranları bakımından ABD'de üçüncü sırada yer alırken, Türkiye'de dördüncü sıradadır (Anonim, 2013a., Siegel ve ark., 2013). 2013 yılında tüm dünyada tüm kanser çeşitleri için görülmesi beklenen hasta sayısı 1,660,288 tahmin edilirken beklenen ölümlerde sayısının ise 580,349 kadardır (Howlader ve ark., 2013). Bunlardan erkeklerde ve bayanlarda %9'unun kolorektal kanser olacağı tahmin edilirken meydana gelebilecek ölüm oranlarında da kolorektal kanserlerin %9 ile üçüncü sırada olduğu söylenebilir(Siegel ve ark., 2013).

Hastalıkların insanlarda görülme sıklığı bu kadar fazla önem taşırken kanser gibi ciddi bir hastalığında moleküler anlamda incelenip, daha iyi tanınıp ve çeşitli tedavi yöntemlerinin bulunmasında büyük önem taşımaktadır.

Karmaşık bir sürece sahip olankolorektal kanser, bazı genetik ve epigenetik değişikliklerin normal dokuda büyümeyi kontrol eden moleküler mekanizmalarının bozulması sonucunda meydana gelmektedir (Hermsen, 2002). Kolon kanserleri, kansere yakalanan hasta sayısı ve ölüm oranı bakımından önem arz etmektedir. Farklı popülasyonlarda farklı görülme oranıyla beraber değerlendirildiğinde kadınlarda 3, erkeklerde 4.sırada en sık görülen kanserdir ve bu oran erkeklerde biraz daha yüksek görülmektedir. Kanada, ABD ve hemen hemen tüm Avrupa ülkelerinde akciğer kanserinden sonra kanserinden sonra meydana gelen ölümlerin 2. nedenidir(Bresalier, 2002). Klinik ve patolojik gelişmelere rağmen kolorektal kanserin tanı ve tedavisinde kullanılan belirteçleri sınırlı kalmaktadır (Aiello, 2011).

Günümüzde teknolojinin bu denli hızlı gelişmesine parelel olarak bilimsel alanda yapılan çalışmalarda da bu hız artmıştır. Dolayısıyla bilimsel alanda yapılan çalışmaların sayılarında artış göstererek, buradan elde edilecek sonuçların da diğer çalışmalara öncelik edecektir. Böylece hatasız veriler ve zaman kaybı en düşük hale gelecektir. Tabi ki bu durum tüm hastalık çeşitleri içerisinden kanser gibi tüm insanlığı önemli derecede etkileyen hastalık çeşidiyle ilgili yapılan çalışmalarda daha da önem kazanmıştır. Kanserle ilgili yapılan çalışmalarda ilerlemeler, mikroRNA (miRNA) adı verilen küçük, kısa RNA dizilerinin kanserle ilgisi olduğu kanıtlanmıştır. Böylece miRNA'lar üzerinde yapılançalışmaların artmasına ve miRNA ile ilgili veri tabanlarına daha fazla veri eklenmesine sebebiyet vermiştir. Tabiki bu veriler özen ve titizlikle elde ediliyor olmasına karşın bazen eksik ya da hatalı olabilmektedir.

miRNA'lar yüksek seviyede korunan, bitki ve hayvan genomlarında protein kodlamamasına rağmen genin ekpresyonu üzerinde önemli rol oynayan tek iplikçikli yaklaşık 20-24 nükleotid uzunluğundaki kısa RNA molekülleridir. MikroRNA'lar hedefteki mRNA'ya uygunluk sağlayan hedefteki mRNA'nın 3'UTR kısmına bağlanıptranslasyonel baskılamayı yaparak ya da hedefteki mRNA'nın kesilerek genin

ekspresyonunu düşürüp düzenlemesinde görev alırlar. (Seydel ve Aksoy.,2009). miRNA kendine özgü bağımsız bir promotor kontrolünde sentezlenir veya transkripsiyon sonucu oluşan mRNA'nın intronlarında yer alır.Bir kanser türünde artış gösteren bir miRNA ekspresyonu başka bir kanser türünde azalma gösterebilir. Bu nedenle kişiye özgü her bir kanser olgusunda miRNA profili farklılık gösterebilmektedir. Günümüzde özellikle hastalıkların erken tanısı, hastalıklardan korunma ve hastalıklara karşı tedavi yöntemlerinde biyomarkır olarak kullanılan miRNA'lar oldukça önem arz etmektedir. Küçük molekül yapısına sahip miRNA'lar daha büyük molekül yapısına sahip mRNA'lara göre parçalanmaya karşı daha fazla korunur bir yapıya sahip oldukları için kanser tanı ve tedavi çalışmalarında biyomarkır olarak daha çok tercih edilmektedir. Fakat miRNA'larla ilgili yapılan bu ölçümler miRNA'ları tespit etme hızına yetişememekle beraber, araştırmacılarda ölçüm sonuçlarını beklemek zorunda kalmaktadır.

Bu çalışma ile miRNA'ların gen ifade ürünlerinin, bilgisayar destekli yöntemler ile tahmin edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda gen ifadesi araştırılan miRNA'nın, gen ifade ürünü bilinen miRNA'ların promotör kısımları ve transkripsiyon faktörler arasındaki beraberliğinden yola çıkarak ifadesinin tahminine çalışılmıştır (Tuncer, 2014). Özellikle son on yıldır kanserle mücadele etmek amacıyla kolon kanserinin mekanizmalarını anlamaya ve yeni tedavi stratejileri belirlemek üzere yoğun bir çaba sarf edilmektedir.

Kanserde tek bir genin incelenmesindense gen ekspresyonunun tümünün analizi, tanı ve taşhis açısından daha büyük bir önem arz etmiştir (Seydel,2009). Bu kapsamda;

1. Mikroarray sistemi ile bireye özgü gen ekspresyon profilinin belirlenmesi,
2. Mikroarray ile elde edilen verilerin RT-PCR ile doğrulanması.

Mikroarray teknolojisi gerek kolon kanserlerinde ve gerekse de bu kanserlerin öncü lezyonlarında eş zamanlı olarak binlerce genin transkripsiyon profillerini inceleme imkanı sağlayan moleküler bir tekniktir. Bu işlev doğrultusunda çalışmamızda mikroarrayleri kullanarak kolon kanseri gelişiminde ve ilerlemesinde

ekspresyonu değişen yeni genleri belirlemeyi düşündük. Bunun yanında hastalığın başlama ve ilerleme süreçlerinde mesajcıRNA'ların (mRNA) sentez miktarı ve miRNA'lar tümör dokularında biyomarker özellikleri araştırıldı.

Bu çalışmamızda kolon kanserli hastaların tümörlü ve normal dokularındaki tümör supressör miRNA seviyelerininmikroarray tekniği kullanılarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamız kolon kanserindeki tümör süpressör miRNA'lar ile ilgili bilgilerimizi arttıracak ve erken teşhis ile kişiye özel tedavi-hedefe yönelik sentetik miRNA'lar, ilaç tipi ve dozunun belirlenmesine imkan verecektir. Bu çalışmada kolon kanserinin tedavisinde miRNA'ların rollerini anlayabilmek için miRNA'lara ışık tutmak amaçlarımız arasındadır. Ayrıca miRNA gen ifadesinin tahminine yönelik yapılan ilk çalışmalar arasında olduğundan, daha sonraki çalışmalarada ışık tutması nedeniyle büyük önem taşmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1.Kanser

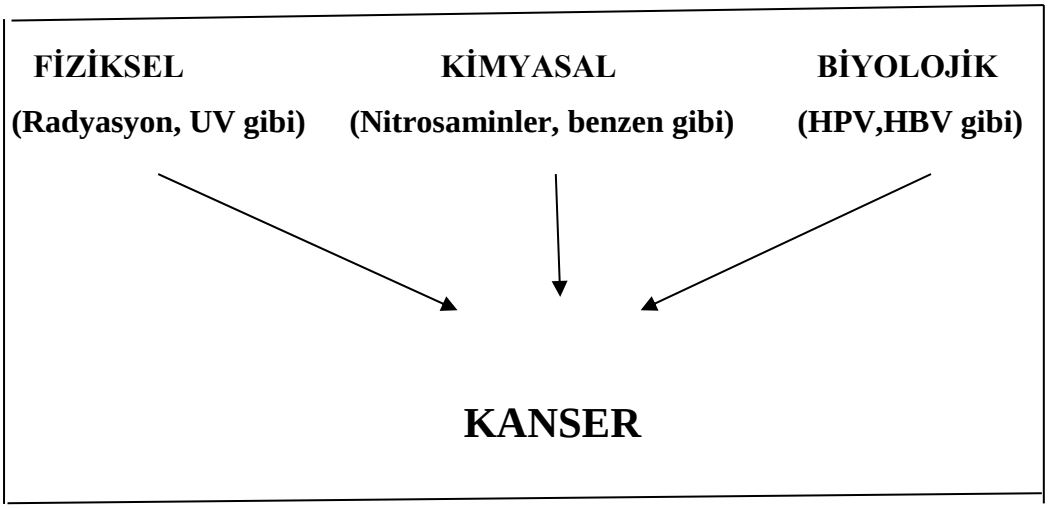
Modern tıbbın kaydettiği tüm gelişmelere rağmen kanser maddi ve manevi olarak günümüzün en önemli sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesidir. Tek bir organı etkileyebildiği gibi uzaktaki organlara da yayılarak etkisini gösterebilir. Her ne kadar bazı standartlar belirlenmiş olsa da her kanser türüne özgü olarak farklı yaklaşımlar ve tedaviler uygulanmaktadır. Her insanın farklı bir DNA'ya sahip olması oyunun kuralını değiştiren en büyük etmendir. Bu nedenle "onkolojik hastalıklar" terimini kullanmak daha uygun olabilir. Onkoloji kanserin tüm türlerini kapsamaktadır. Kanserin tedavisinin yanısıra, kansere neden olan etmenlerin bulunması, kanserin oluşmadan engellenmesi, sosyal ve psikolojik destekler ile hastanın ve hasta yakınlarının rahatlatılması kanseri son derece karmaşık ve büyük bir problem haline getirmektedir. Tüm bu sorunları çözmek adına onkoloji tıbbın farklı dallarını birlikte kullanır.

Hücrenin transformasyonu, çoğalma hızının artması, apoptozisin yavaşlaması veya ortadan kalkması sonucunda kontrolsüz hücre büyümesiyle beraber ortaya çıkan süreç "kanser" olarak isimlendirilir. Psikolojik, fiziksel, sosyal ve manevi boyutları etkileyen kanser kişinin yaşantısında önemli değişikliklere neden olmaktadır.

Kanserin tedavisinde radyoterapi, kemoterapi, cerrahi, immünoterapi, hormon terapisi, hedeflenmiş terapiler ve gen terapi gibi biyolojik terapiler tek başına veya birlikte kullanılabilirler. İnsan vücudunu etkilediği bilinen çok fazla kanser türü bulunmaktadır. Normal vücut hücreleri belirli düzen içinde büyür, gelişir, bölünür ve ölürler. İnsan yaşamının ilk dönemlerinde vücuttaki hücreler çoğunlukla, kişi yetişkin oluncaya kadar hızla bölünürken ilerleyen zamanlarda ise ya ölenlerin yerinin yenisinin alması ya da yenilenmek amacıyla bölünür. Kanserli hücrelerde ise bu durum hiçbir şeye ihtiyaç duymaksızın vücutta herhangi bir kısımdan kontrol dışı

olarakolağan olarak çoğalan hücrelerdir. Çok fazla kanser türünün olmasına karşın bütün kanser çeşitlerinin temeli program dışı ve kontrolsüz hücre bölünmelerine dayanmaktadır. Moleküler olarakhücrelerin kontrol dışı bölünebildiği halde dağılma göstermeyip, bu şekilde görünen tümörler iyi huylu (benign) tümörler olarak bilinmektedir. Bu tümörler herhangi bir cerrahi işlemler yardımı ile normal dokudan uzaklaştırmak mümkündür. İlk meydana geldiği yerdekibirincil (primer) dokunun parçalayarak lenf sistemine veya kan sistemine dahil olduktan sonra vücudun diğer kısımlarına ulaşabilenkanserleşmiş tümör hücreleri kötü huylu (malignant) tümör olarak bilinmektedir. Malignant hücrelerin farklı dokulardaki sekonder (ikincil) tümör oluşturmasına metastaz denir (Alberts ve ark., 2007).

Kanserin genetik bir hastalık olduğu olgusu hemen hemen gnümüzdeki tüm araştırmacılar tarafından kabul edilmektedir. Kanser; DNA tamir mekanizması genlerinin, proto-onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin, ve hücre döngülerini kontrol altına alan diğer genlerin mutasyona uğramasıyla ilişkili bir durumdur. Bu görüşün destek aldığı başlıca iki nokta vardır. İlki kanser hücrelerinin bölünerek çoğalması sonucu meydana gelen hücrelerin yine kanser hücresi olması; ikincisi ise bu hücrelerin fenotipik özelliklerinin hücre genomunda kodlanıyor olmasıdır. Kanser hücreleri aşırı çoğalma eğilimi göstermekle kalmaz; hücreler arası uyum ilişkisini kaybederek bağımsız hale gelebilirler. Ortamda yeterli besin bulunduğu sürece kontrolsüz çoğalmalarını sürdürürler. Bu özellikleri nedeniyle kanserli hücrelere ölümsüzlük sıfatı verilmiştir. Ayrıca bu hücreler, dolaşım sistemleri aracılığıyla organizma içinde dağılarak yeni kanserli koloniler oluşturabilirler ki bu da metastaz özelliğidir. Kanserin oluşumuna yol açan faktörleri üç grup altında toplamak mümkündür. Bunlar fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlerdir (Şekil 2. 1).



Şekil 2.1. Kansere neden olan faktörlerin grupları

Kanserlerin köken aldıkları doku çeşidine göre sınıflandırılabilirler:
- Karsinoma: Epitel dokunun içinden,
- Sarkoma: Bağ dokusundan ve kas dokusundan,
- Lösemiler ya da lenfomalar: Kan hücreleri ve hematopoietik hücrelerin içinden köken almış olanlar (Alberts ve ark., 2007).

Kanser, mortalite ve morbidite açısından ilk sıralarda bulunurken bununla beraber topluma getirmiş olduğu ekonomik ve sosyal yük de bir toplumda büyükbir sorunu olarak tanımlanabilmektedir (Korkmaz, 2010). Ortaya çıkmasının önlenebilmesi, çeşitli tarama basamaklarıyla ölümün yok edilebileceği, erken tedavinin yaşam kalitesine çok fazla şey katabildiğini ve kanserlerden korunmanın önemli bir durum olduğu bilinmektedir (Tuncer, 2007).

2.1.1. Kanserin tarihçesi

Tarih boyunca kanser insan ve hayvanlarda sık görülen bir problem olmuştur. Kanser hakkında bilinen en eski kayıtlar MÖ 3000 yılına kadar uzanmaktadır. Kanser kelimesi Latince yengeç anlamına gelen "*canker*" veya ''*carcinos*'' kelimelerinden türemiştir. Tümör terimi ilk defa MÖ 3. yüzyılda tümörün etrafındaki şişmiş damarları bir yengecin bacaklarına benzettiği için Hipokrat tarafından kullanılmış, Yunan doktor

Galen ise şişme anlamına gelen “oncos” terimini kullanmıştır(Baykara, 2016). İnsanoğlunun kanser ve çeşitleri ile bilimsel olarak tanışması 17. Yüzyıl olmuştur ve aynı yüzyıl içerisinde insanoğlunun kanserle ilgili bilgilere ulaşmasına hız katmıştır. Giovanni Morgagni ‘nin yaptığı otopsilerde ölüme sebebiyet veren patolojik farklılıkları keşfederek yaptığı onkolojik çalışmalar olmuştur (Hunt, 2000). Ünlü İskoç bilim insanı John Hunter cerrahi işlemler yardımıylabazı kanserlerin onarılabileceğini söylemiştir (Nutton, 1988). Cerrahi müdahalelerin keşfiyle yaklaşık bir asır sonrasında anestezideki gelişmelerle beraber cerrahi işlemlerle de ilerlemeler kaydedilmiş olup ve mastektomi geliştirildi (Mansi ve ark., 1989).

Mikroskop teknolojisinde 19. yüzyılda meydana gelen gelişmelere bağlı olunarak onkoloji bilimi de ortaya çıktı. Hücresel patolojinin ilklerinden olan Rudolf Virchow modern patolojiyle birlikte onkoloji bilimi birleştirdi. Bunu, yalnızca kanser tanısının tespiti dışında, aynı zamanda kanserin cerrahi müdahalesinde de yeni bir döneme geçti. Ameliyatla hastadan alınan dokulardanhastalığın kesin teşhisi bulunmaya başlanıldı (Rather, 1957).

Tüm bu gelişmelerle birlikte, 18. yüzyıl içinde üç çeşit gözlem kanser epidemiyolojisinde ön plana çıkmıştır. İtalyan Doktor Bernardino Ramazzini 1713 senesinde rahibelerdeki serviks kanserinin ve göğüs kanserinin oranını karşılaştırdığında yaşam tarzının da kansere etkisi olduğunu ortaya çıkardı. Bundan yola çıkarak hamilelik temelli ya da enfeksiyon nedenli hormonal faktörlerinde kanser oluşumu üzerine etkilerinin anlaşılmasında kilit taşı rolünü üstlenmiştir (Felton, 1997). Bu yüzyıldaki araştırmacılar tümörlü dokudanalınmaması durumunda hastalığında çok yüksek seviyede ilerleme kaydedeceğini görmüşler ve tümör kısmının alınması doğrultusunda birtakım yöntemler ve cerrahi işlemlerdenemişlerdir. Kan naklinin veanestezinin keşfinden önceki zaman diliminde de birçok cerrahi operasyon yapılmış, ancak anestezinin keşfedilmesi ile beraber içinde bulunulan zaman zarfındaki ameliyatlara ameliyat yüzyılı denilmiştir (Felton, 1997).

2.1.2. Kanserin moleküler biyolojisi ve mekanizmaları

İlk olarak 1914 yılında Boveri genomik yapıda bulunan anormalliklerin kanser oluşumunda etkileyici olabileceğini söylemiş ve uzun zaman sonrası yapılan araştırmalarda bu hipotezi kanıtlar niteliktedir (Descamps ve Prigent 2002; Sathananthan ve ark., 2006). Teknolojideki gelişmelee parelel olarak ve yeni keşiflerle birlikte kanserin moleküler mekanizmasınaışık tutulmuş oldu. Hücrelerin bölünmesi ve kontrolü genlerin kontrolü altında olduğundan kanser temel olarak genlerle ilişkili olan bir hastalıktır. Kromozomlar üzerinde bulunan genler sıkıca paketlenmiş durumda olup bu genlerin üzerindeki fiziksel veya kimyasal değişimler doğrudan hücrenin işlevini etkileyebilir. Her ne kadar gende meydana gelen bir hasara bağlı olarak DNA tamir sistemleri genin işlevini yeniden kazandırmaya çalışsa da her zaman başarı sağlanamaz. Bu durumda genlerin ürünü olan proteinlerin eksik veya hatalı üretilmesi hücresel işlevlerde bozulmaya yol açar.

Genin işlevini değiştiren bir başka etmen ise genin yapısını değiştirmeden işlevinin değişmesine neden olan metillenme, asetillenme, fosforillenme, ribozillenme gibi epigenetik modifikasyonlardır. Bu modifikasyonlar sadece özel bir bölge üzerinde etki gösterebileceği gibi kromozomların tamamını veya büyük bir bölünü etkileyen bölgesel delesyonlar, insersiyonlar veya inversiyonlar şeklinde de görülebilir.

Kanserin oluşumunda en büyük role sahip olan 3 gen grubu bulunmaktadır. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir. Hücre büyümesini ve farklılaşmasını sağlayan normal genler olan proto-onkogenler, mutasyonlar, artmış gen ifadesi, gen duplikasyonları ve/veya kromozal yeniden düzenlemeler nedeniyle etkin hale geçip onkogen haline dönüşebilirler. En bilinen onkogenlere örnek olarak *RAS, Erk, MYC* gibi genler gösterilebilir.

Hücrenin bölünmesini ve çoğalmasını kontrol eden, hasar durumunda DNA tamirini başlatan, tamir girişiminin başarısız olması durumunda apoptozu tetikleyen gen gruplarına ise tümör baskılayıcı genler denir. Bunlardan en bilineni ve en çok çalışılanı *TP53* genidir. Delesyonlar, nokta mutasyonları, epigenetik susturmalar, kromozomların düzgün ayrılamaması ve mitotik rekombinasyonlar tümör baskılayıcı

genin işlevinin kaybolmasına yol açarak hücre döngüsündeki kontrol kaybolmasına ve sonuçta da karsinogeneze neden olabilirler.

Bir diğer önemli gen grubu ise, hasarlı DNA'yı tamir etmek üzere gerekli proteinleri o bölgeye çeken ve böylece genin işlevinin yeniden kazanılmasını sağlayan DNA tamir genleridir. DNA tamir genlerinin bir diğer önemli işlevi ise tamirin başarısız olması durumunda hücrenin apoptotik veya nekrotikyolak yok edilmesini sağlamaktır. Ancak bu önemli gen grubundaki işlev kayıpları hücrenin kanserleşmesinde sıklıkla karşılaşılan bir problemdir. En çok bilinen DNA tamir genlerinden bir tanesi, işlevinin bozulması nedeniyle meme kanserinin oluşmasına yol açan BRCA (göğüs kanseri) genidir. Mutasyonlar kanser hücrelerindeki; apoptoz sinyallerinde duyarsızlaşma ve büyüme faktörü üretebilme işlevleri gibi normal hücrelerde mevcut bulunmayan özellikleri kazandırır ve bu özellikleri sahip olan kanser hücrelerinin de kontrol dışında çoğalması gözlenir. Öyle ki hücreler içinde meydana gelmiş olan her mutasyon da kansere neden olmaz, ama bazı genler üzerindeki mutasyonlar kanser ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar; tümör baskılayıcı, proto-onkogenler ve DNA tamir mekanizması genleridir.

Kanserin ortaya çıkmasında tütün ve tütün ürünlerinin kullanımı, alkol, kötü beslenme, obezite, virüsler, iyonizan ışınlara maruziyet, mesleki hastalıklar ve çevresel kirleticiler sayılabilir. Hepatit B, Hepatit C ve HPV (Human Papilloma Virus) gibi virüsler karsinogenezde çok çalışılan virüslerdir.

Deoksiribonükleik asit (DNA)'te mutasyonların oluşmasından sonraki kısımda: tümör başlangıcı, tümör gelişimi, malignans dönem ve tümör yayılma dönemi olmak üzere 4 farklı süreç ortayaçıkar (Hahn ve Weinberg 2002).

Tümörün oluşumunda birçok basamak katkıda bulunur ve bunların her biri tümörün gelişimini hızlandırmaktadır (Lewin, 2004). Bu zaman zarfında oluşabilecek olayların tamamına henüz net olarak ışık tutulmamış olsa da, tümör oluşumunun önemlilik arz eden genlerde oluşabilen ve tümör hücrelerine bazı büyüme olanakları taşıyan mutasyonların çoğalmasıyla bulunmuştur (Burger ve Abraham, 2003). Tüm

kanser hücrelerinde bulunan ve onları normal hücrelerden uzaklaştıran bazı özellikler bulunmaktadır. Kısaca;

- Tüm kanser hücrelerinin büyüme sinyalleri açısından diğer hücrelerden bağımsız olarak hareket ederler. Proliferasyonda dış sinyallere ihtiyaç duyulmamaktadır.
- Kanser hücrelerinin apoptozla olan sınavı diğer hücrelerinkine göre çok daha az olmaktadır. Kanser hücreleri apoptoz sinyal mekanizmalarından etkilendiği kadar normal hücreler etkilenmezler.
- Normal hücreler sınırlı sayıda çoğalırken kanser hücreleri sınırsız bir çoğalma eğilimi içindedirler.
- Kanser hücrelerinde mutasyon yüzdesi çok yüksekte olduğundan genetik açıdan kararsız olan hücrelerdendirler.
- Kanser hücreleri özel adhezyon moleküllerinin olmadığı orijinal yerlerinde duramazlar, diğer doku kısımlarına dağılıp ve buralarda çoğalmaya devam ettirirler (metastaz).
- Kanser hücreleri antiproliferatif sinyallere karşında bir tepki vermezler.
- Kanser hücreleri beslenme işlemleri için damar oluşumunu (anjiyogenez) tetiklerler (Alberts ve ark., 2003; Alberts ve ark., 2007).

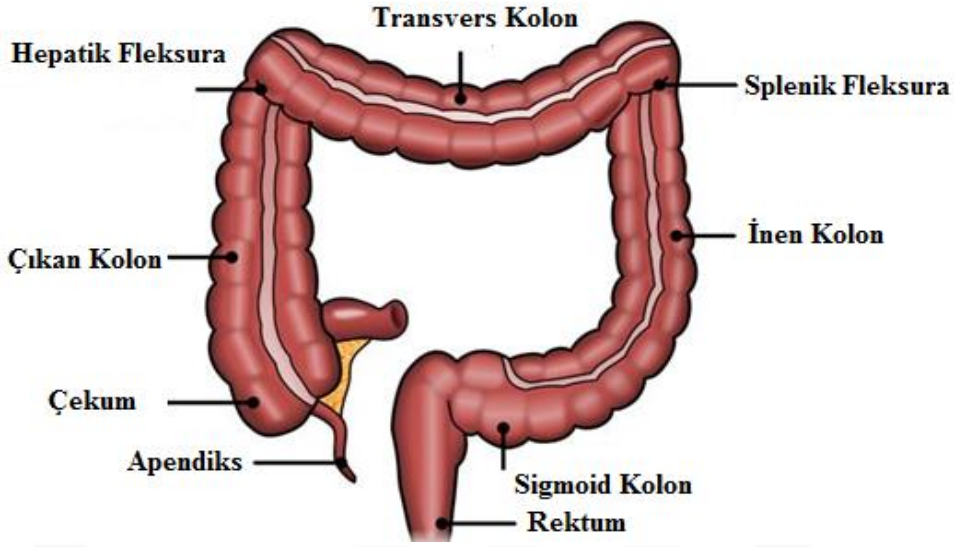
Kanser hücreleri zeki hücrelerdir çünkü az oksijen, az yiyecek, zor koşullara karşı gösterdiği direnç ve zaman içerisinde bu koşulları kendi lehine çevirmesi ile yaşama tutunur. Kanser hücreleri zamanla transforme olabilir yani şekil değiştirebilir. Normal hücrelerin belli bir zemine tutunarak büyümesi ve yaşaması mümkünken, kanser hücreleri herhangi bir yere tutunmadan da yaşayabilir ve büyüyüp çoğalabilirler. Birçok kanser türü başlangıçta belirti vermez ve her kanser türünün aynı olmadığı unutulmamalıdır. Kanserin tipine bağlı olarak görülen genel belirtiler değişiklik gösterebilir. Bu nedenle her kanser türüne yaklaşım farklı olmaktadır. Ancak unutulmaması gereken erken teşhisle birlikte iyi bakımın beklenen hayat süresini ve kalitesini arttırdığıdır. Bu nedenle yeni yöntemler denenmektedir.

2.1.3.Kanserin Tedavisi

Kanserin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemleri en sık başvurulan yöntemler olmakla birlikte, hormon terapisi ve biyolojik yöntemlerin kullanılması gibi farklı yaklaşımlar dadiğer yöntemlere destek olacak şekilde birlikte veya tek başına kullanılabilir. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması, tedavilerin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi nedeniyle tek bir kesin tedavi yönteminin varlığından bahsetmek imkansızdır(Baykara, 2016). Bir toplumda kanser nedeniyle meydana gelen ölümlerin enaza indirgenmesi için kanserin erken evrede teşhisiyle mümkündür. Kanserin erken evrede teşhis edildiği populasyonlarda, kanserin görülme sıklığı daha düşüktür (Açıkgöz, 2011). Kanserde erken teşhis ve taramayla birlikte, sebepleri, risk faktörleri ve belirtilerinin nasıl oluştuğuhakkında toplum içinde farkındalık yaratarak bilinç oluşturmakta oldukça önemlidir (Açıkgöz, 2011; Cross, 2010)

2.2. Kolon Nedir?

Kolon ve rektum, sindirim sistemi içinde bulunan birer kısımdır. Kalın bağırsak, ince bağırsağın hemen ardından gelen organdır ve ortalama 1,5 m uzunluğa sahiptir. Ters haldeki U harfine benzer şekilde karnın sağ alt tarafından kör bağırsak ile başlayıp, yukarı doğru çıkar ve karaciğer altından dönüş yapıp yatay geçer. Sol üst köşede bulunan dalağın alt kısmında ve tekrar bir dönüş yapıp sol kısımdan aşağı kısma doğru uzanarak rektumla birleşmektedir. Rektum, yaklaşık 15 cm uzunluğunda ve kalın bağırsağın genişlemesi sonucunda oluşmuşsindirim sisteminin son kısmıdır (Şekil 2.2). Suyun emiliminde ve atıkların vücuttan atılımında görev yapmaktadır (Anonim, 2017).



Şekil 2.2. Kolonun anatomik yapısı

2.2.1.Kolon Kanseri ve Oluşumu

Kolon kanseri, gerek gelişmiş ve gerekse de gelişmekte olan toplumlardaki sık rastlanılan kanserler arasındadır. Kolon kanseri en sık görülen gastrointestinal sistem kanseri olup, genetik faktörler, çevresel maruziyetler (diyet dahil), sindirim sisteminin inflamatuar durumları gibi etiyolojik nedenlere bağlı gelişen bir multifaktöriyel hastalıktır. Çoğunlukla tarama testleri esnasında tanı konulmakla beraber en sık görülen klinik bulgular demir eksikliği anemisi, rektal kanama, karın ağrısı, barsak alışkanlıklarında değişiklikler, intestinal obstrüksiyon veya perforasyondur. Erken dönemde halsizlik, kilo kaybı gibi nonspesifik semptomlardan, ileri dönemde abdominal hassasiyet, makroskopik rektal kanama, abdominal kitle, hepatomegali, assit gibi geniş spektrumda bulgular saptanabilir. Ülkemizdeki istatistiki verilere göre kolon kanseri en çok görülen kanser türleri arasında erkeklerde görülen akciğer ve prostat kanserlerinden sonra, kadınlarda görülen akciğer ve meme kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır (Jemai, 2009).

Günümüzde 100 kadar kanser türü teşhis edilmiş ve kolon kanserinin tüm kanser ölümlerinin %15'ini oluşturduğu rapor edilmiştir (Siegel ve ark., 2012). Kolorektal

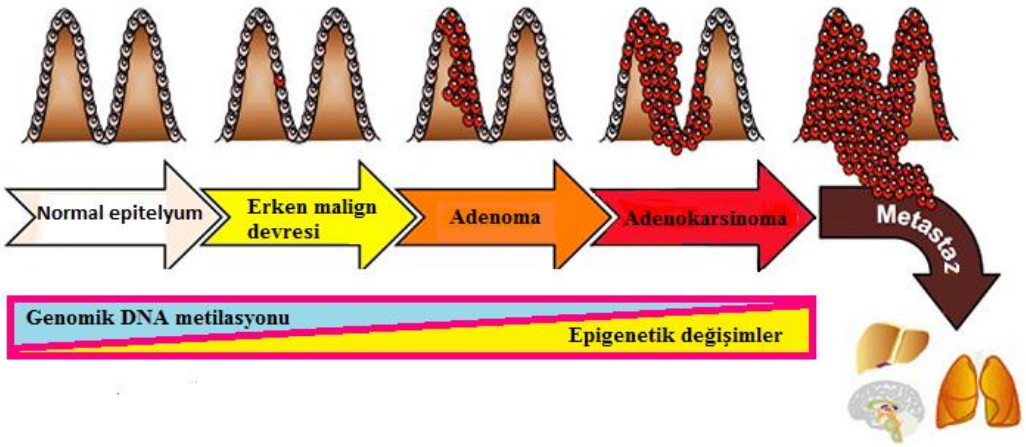
kanserin biyolojik ve genetik özelliklerini anlamaya yönelik önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Bu bilgiler; yavaş yavaş klinik kullanıma entegre edilerek kolorektal kanser gelişiminde bireysel risklerin daha detaylı şekilde ortaya konulması, daha iyi tarama stratejilerinin bulunması, prognozun daha iyi değerlendirilmesi ve antikanser tedavilerin etkinliğinin daha efektif bir şekilde saptanabilmesi alanında rol oynamaya başlamıştır.Kolon ya da kalın bağırsak kanseri erkeklerde 4. sırada kadınlarda 3. sırada en sık görülen kanser türüdür (Gürsoy ve ark., 2003).Kolon kanserinin oluşma şekillerini şöyle sıralayabiliriz.

a) Rastlantısal Kolon Kanseri,

b) Ailesel Kolon Kanseri,

c) Kalıtsal Kolon Kanseri

Kolon kanserinin teşhisinde ve tedavisindeki gelişmelere rağmen hastaların yaklaşık %50'si metastazdan dolayı ölmektedir (Corte, 2012; Drusco, 2014). Son zamanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre kolon kanser oluşumunun %35'inin kalıtsal olduğu belirtilmektedir (Schetter, 2012). ilk aşama polipoluşumudur. Daha sonra tümör hücreleri yayılır, epiteli geçerek kaslar, lenfdüğümleri, karaciğer ve diğer organlara dağılır. Kalıtsal kolorektal kanser, bazıgenlerde mutasyon oluşumuyla başlar. Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının sonucu olarak oluşan reaktif oksijen metabolitlerindeki miktar; enflamasyon, radyasyon, yaşlanma ve yanlış beslenme gibi nedenler sonucu artmaktadır. Bu etkileşimler sonucu pek çok hücresel onkogenin aktivasyonu ve tümör supresör genlerin inaktivasyonu meydana gelmektedir (Concepcion, 2012; Bonfrate, 2013; Russel, 2009; Franco, 2013). Fazla miktarda kırmızı et ve yağlı yiyecek tüketimine karşılık yetersiz sebze-meyve alımı kolon kanser riskini arttırmaktadır (Boyle ve Leon., 2002).



Şekil 2.3. Genomik ve epigenetik faktörler ile kolorektal kanser gelişimi

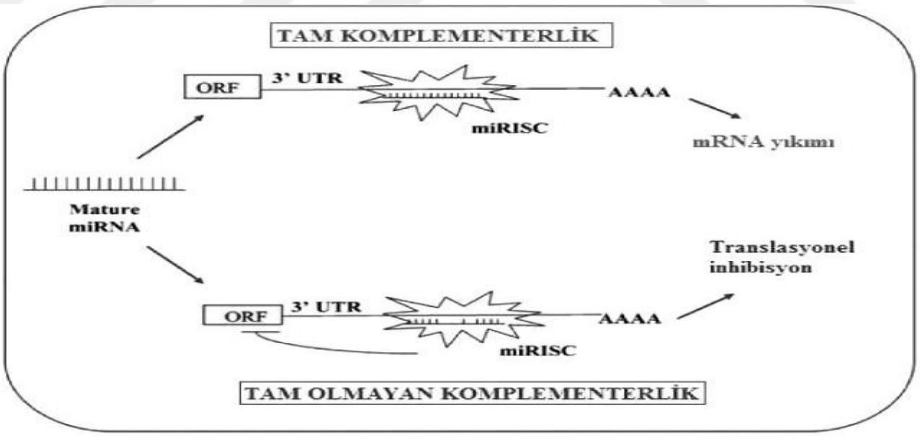
Kolorektal kanser, yaygın görülen, önemli morbidite ve mortalite nedeni olan bir hastalıktır. Kolorektal kanserler Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) kanser ölümleri içinde üçüncü sırada yer alırken, yeni tanılanan kanserlerinde yaklaşık%10' unu oluşturmaktadır(Anonim, 2016). GLOBOCAN 2012 ve Dünya Kanser Raporu 2014 verilerine de Dünya'da tanı konulan kolon kanseri 1,4 milyon (%9,7) olarak belirtilmiştir(Anonim, 2014a). Ülkemizin 2012 yılında ölüme sebebiyet veren hastalık türlerinden %21,1 ile kanserler, ikinci sırada bulunmaktadır. Kolorektal kanser çeşidi, diğer tüm kanserlerin içinden %7,6 oranında bulunurken ve tüm kansere bağlılık gösteren ölümlerde %7,4 mortaliteden sorumludurlar (Okyay, 2013). Sağlık Bakanlığı istatistik verilerine göre kolorektal kanserler, ülkemizde en sık görülen ilk 5 kanser arasında olup insidansı yüz binde 17 olarak bildirilmektedir (Okyay, 2013., Anonim, 2014b).

2.3. MikroRNA'ların Genel Yapısı ve İşlevi

Biyomedikal veBiyoloji alanlarındaki teknolojik araçların gelişmesi ve hassaslaşması, bilim insanları hücrenin içindeki daha da küçük molekülleri görmeyi sağlamıştır. Bu küçük moleküllerin görevleri veişlevleri yapılan hassas deneylerle anlaşılmaya bulunmaya çalışılmıştır. Birçok molekülün hücre içindeki görevlerinin bilinmesine rağmen, halen işlevleri belinmeyen moleküller bulunmaktadır.

Teknolojinin hızlıbir şekilde gelişmesi ve detaylı araştırmalar yapılmasıyla henüz varlığı bilinmeyenyeni moleküller keşfedilecektir. Bu doğrultuda son yıllarda, genlerin düzenlenmesi (gene regulation), miRNA adı verilen kısa RNA dizilerinin keşfiyle yeni bir olay keşfedilmiştir. miRNA'lar hücrenin gelişmesi ve hücre içi düzenin sağlanması gibi bazı önemli roller üstlenmektedir.

miRNA, yüksek oranda korunmuşDNA kısmından kodlanan ama proteine translasyonu olamayan, ortalamaolarak 18-22 nükleotid uzunluğundaki, küçük RNA moleküleridir.(Saydam ve ark., 2010). DNA'dan transkripsiyonu gerçekleşen fakat proteine dönüşümü gerçekleşmeyen genlerden kodlanan miRNA'ların, hedef genin mRNA'lara göre düşük bağlılıkla bağlanmasına, mRNA yıkımının ve translasyonel baskılanmasına neden olduğundan gen ifedesinin kontrolünde önemli roller üstlenmiştir. miRNA'ların hedef mRNA ile komplementerliği tam ise mRNA'nın parçalanmasıyla,komplementerlik daha az ise translasyon baskılanmasıyla sonuçlanması beklenir (Görür ve ark., 2011).



Şekil 2.4. miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanması

Farede, *Drosophilada*, *Caenorhabditis* ve *Arabidopsis*'de birçok sayıda miRNA tanımlanmıştır (Seydel ve Aksoy., 2009). miRNA kendine özgü bağımsız bir promotor kontrolünde sentezlenir veya transkripsiyon sonucu oluşan mRNA'nın intronlarında yer alır. İnsan genomuyla ilgili yapılan öncü çalışmalarda 250 kadar miRNA'nın

olduğu söz ediliyordu (Bartel, 2004). Güncel olan miRNA veritabanının 21. Versiyonunda, 35828 olgun miRNA'nın gen ifadesi ve223 canlı türünde 28645 hairpin prekürsörün varlığından söz etmek mümkündür (Kozomara ve ark., 2014).. 2000 yıllarından itibaren çalışmaların başladığı miRNA üzerinde 2014 yılı itibariyle PubMeD literatür taramalarında yaklaşık 9000 makalenin yayınlanmış olması bu molekülün önemini açık bir şekilde göstermektedir. miRNA'nın görevini iyi yapamaması veya miktar olarak azalması (tümör supressör miRNA), bazı durumlarda da artması (onkogenik miRNA) başta kanser ve yaşlanma ile ilgili olmak üzere çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır (Scheter, 2012; Corte, 2012; Yi, 2013). Bir kanser türünde artış gösteren bir miRNA ekspresyonu başka bir kanser türünde azalma gösterebilir. Bu nedenle kişiye özgü her bir kanser olgusunda miRNA profilifarklılık gösterebilmektedir.

Günümüzde özellikle hastalıkların erken tanısı, hastalıklardan korunma ve hastalıklara karşı tedavi yöntemlerinde biyomarkır olarak kullanılan miRNA'lar oldukça önem arz etmektedir. Küçük molekül yapısına sahip miRNA'lar daha büyük molekül yapısına sahip mRNA'lara göre parçalanmaya karşı daha fazla korunur bir yapıya sahip oldukları için kanser tanı ve tedavi çalışmalarında biyomarkır olarak daha çok tercih edilmektedir. Kan, idrar, gözyaşı, süt ve amniyon gibi vücut sıvılarında değişik oranlarda bulunan miRNA'lar yakın doku ve organların tümörleşme durumları hakkında bilgi veren ve dolayısıyla erken teşhis ve tedavi için önem arz eden biyomarkırlardır.

miRNA'ların % 60 kadarı bağımsız şekilde eksprese edilirken, %15'i kümeler şeklinde ve geriye kalan % 25'ide intron gen bölgesinden eksprese edilirler (Seydel ve Aksoy., 2009). miRNA'lar hücre gelişimi, hücre farklılaşması, sinyalizasyon, hücre döngüsü, DNA tamir mekanizması, apoptozis, metastaz, oksidatif stres ve dolayısıyla kanser gibi önemli biyolojik mekanizmalarda görev almaktadır (Schetter, 2012; DiLeva, 2014; Liu, 2014).

2.3.1. miRNA'ların tarihçesi

Ambros ve arkadaşları tarafından ilk olarak 1990'lı yılların başlangıcında, miRNA'larla ilgili yapılan genetik çalışmalarda nematod türünden gelen bir solucan olarak bilinen*Caenorhabditiselegans*'ların gelişimi üzerine yapılmıştır. miRNA terimi ilkdefa 2001 yılından itibaren kullanılmayabaşlanılmıştır (Lee RC., 1993). İlk keşfedilen miRNA, lin-4 ailesidir. 7 yıl sonrada *Caenorhabditiselegans*'ın gelişimindedüzenleyici işlevi olduğu düşünülen miRNA let-7 ailesi tanımlanmıştır.

2.3.2. miRNA'nın biyogenezi

MiRNA'lar birbirini izleyen üç aşamada meydana gelmektedir.

Birinciaşamada miRNA'ların sentezi için miRNA genlerinden RNA polimeraz II (RNA pol II) enzimi yardımıyla öncü miRNA (pri-miRNA) sentezlenmesi,

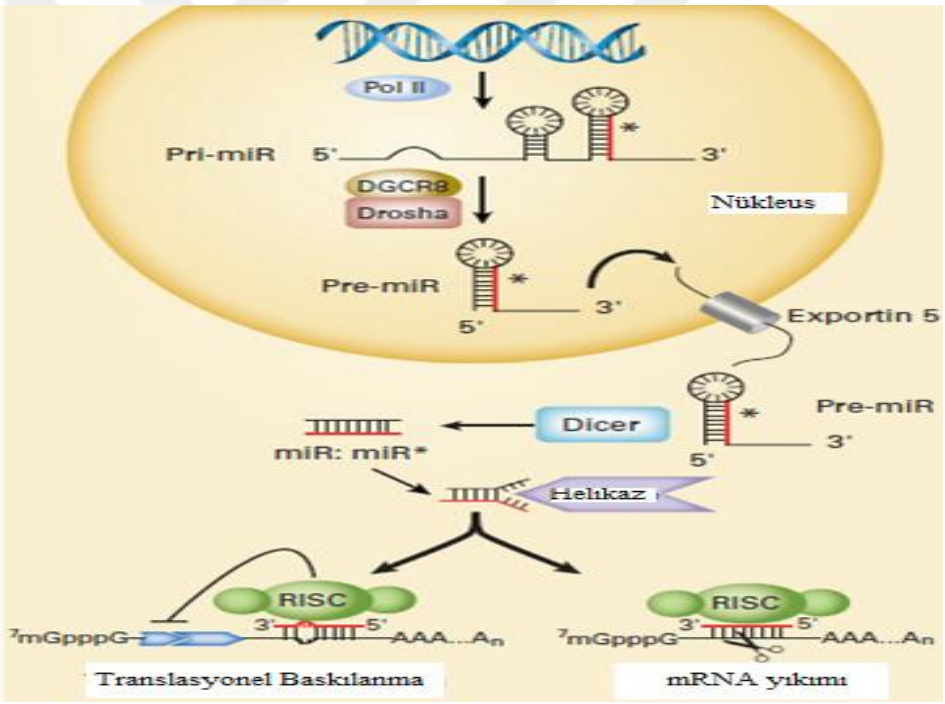
İkinci aşama 60 ile 70 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA'nın oluşumu,

Üçüncü aşamada ise çekirdekte oluşan pre- miRNA' lar Exportin 5 adındaki molekül yardımıyla sitoplazmaya taşınması (Çelik ve ark., 2013).

miRNA'lar, genomik DNA'dan RNA polimeraz II enzimi yardımıyla primer transkript(pri-miRNA) sentezlenip, pri-miRNA(500-3000 baz), "poli A" ve "cap'' kuyruğu bulunan sap-ilmik halindedir (Şekil 2.5). Nükleusta pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinden biri olankofaktörü Pasha(veya DGCR8) ve endonükleaz Drosha tarafından ortalama olarak 70 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA'ya dönüştürürler (Lee ve ark., 2003). Nükleaz çeşitlerinden biri olan Drosha ile çift iplikçikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha'nın oluşturduğu karmaşık yapıya mikroişlemci kompleks(Microprocessor complex) ismi verilmektedir (Esquela ve ark., 2006).

Pre-miRNA molekülünün bir nüklear taşıma reseptör özelliği taşıyan Exportin 5 ve nüklear bir protein olan RAN-GTP'yle birlikte sitoplazmaya taşınır(Lund ve ark., 2004). Devamında pre-miRNA'lar sitoplazmada bulunan RNAaz III enzim ailesinden Dicer isimliendonükleaz ile kesilip 18-22 nükleotid uzunluğundaki çift zincirli

miRNA: miRNA dubleksine çevrilir(Zhang ve ark., 2002).Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş olan susturma kompleksinin (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatmaktadır.Dicer, pre-miRNA'nın sap-ilmiğini kestikten sonra, miRNA: miRNA ikilisinin sadece içlerindenbir tanesi RISC kompleksine bağlanır. RISC kompleksinin içinde bulunmakta olan bir RNAz olan argonaute'unda etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip kompleksle birleştirilir. Buna kılavuz iplik (guide strand) denilmektedir. Diğer ipliğe ise anti-kılavuz ya dayolcu iplik denilmektedir ve RISC kompleksinin substratı şeklinde sindirilir. miRNA'lar, aktif RISC kompleksine dahil olduktan sonra, ya protein translasyonunun baskılanmasınayada argonaute proteinleri aracılığıyla mRNA'nın yıkımına sebep olmaktadırlar (Gregory ve ark., 2005).



Şekil 2. 5. miRNA' ların biyogenezi, işlenmesi ve olgunlaşması

2.3.3. MikroRNA ve kanser

İnsan genomunun %3'ünü oluşturan miRNA gen ürünleri, hücre gelişimi, hücre farklılaşması, sinyalizasyon, hücre döngüsü, DNA tamir mekanizması, apoptozis, metastaz, oksidatif stres ve dolayısıyla kanser gibi önemli biyolojik mekanizmalarda görev almaktadır (Schetter, 2012; DiLeva, 2014). Hücreler apoptoz fonksiyonlarını kaybedip, anormal olarak çoğaldıklarında genelde kanserleşmeye yüz tutarlar. Hücre proliferasyonunda ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte etkili kilit rol üstlenen miRNA molekülleridir. Özellikle son zamanlardayapılan çalışmalarda bu moleküllerin kanser oluşumuna katkıda bulunduğu görülmektedir. Kanserle ilişkilendirilmiş genomik bölgelerin yarısından çoğunun miRNA'yı kodlayan genlerden oluşması mikroRNA'ların kanser gelişiminde önemli bir yerde bulunduğunu göstermiştir (Karagün B ve ark., 2014).

Kanserleşme sürecinde miRNA'ların etkili olduğunun ilk kanıtı, Calin ve arkadaşlarının 2001 senesinde Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarının üzerinde yaptıkları moleküler çalışmayla bulunmuştur. Tümörlü ve normal doku arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi için, miRNA'ların kanser teşhisinide zorlaştırmıştır. Calin ve arkadaşları, 245 fare ve insan miRNA probu içeren miRNA mikroarray çalışmasıyla mir-15a ve mir-16-1'in ekspresyon düzeylerinin B hücreli KLL hastalarında ciddi bir şekilde azalış olduğu raporlamışlardır. MiRNA ekspresyon profilinin, KLL hastalarının kliniği ve biyolojisiyleilgili olduğunu göstermektedir (Calin GA, 2012; Saydam ve ark., 2011).

Günümüzde miRNA'larla alakalı yapılan çalışmaların bütünü kanser hücreleriyle normal hücreler arasındaki ekspresyon profilindeki farklılık dikkate alınarak yapılmıştır (Zhou ve ark., 2010). mRNA ekspresyon profillerini belirlemekte kullanılan yöntemler ayrıca miRNA'ların kanserdeki mevcut rollerini de anlamak için yapılan çalışmalarda da bulunmaktadır.

Kanserde tek bir geni incelemek yerine, gen ekspresyonunun bütün analizi, tanı ve teşhis önem taşımaktadır. Kanserin moleküler biyolojisinde miRNA'lar görevlerini yerine getirirken spesifik promotorlar transgenikler, antisens inhibitörler, real time

PCR ve miRNA mikroarray olmak üzere çeşitli yöntem ve metodlar kullanılmaya başlanılmıştır (Zhang ve ark., 2006). Bu şekilde yapılan çalışmalar, gen ekspresyon profillerinin, başka durumlardan benzerlik gösterebilen tümörlerin birbirinden ayırabildiğini ve hastalığında kliniğiyle veya tedaviye vereceği yanıt açısından bilgi vermektedir.

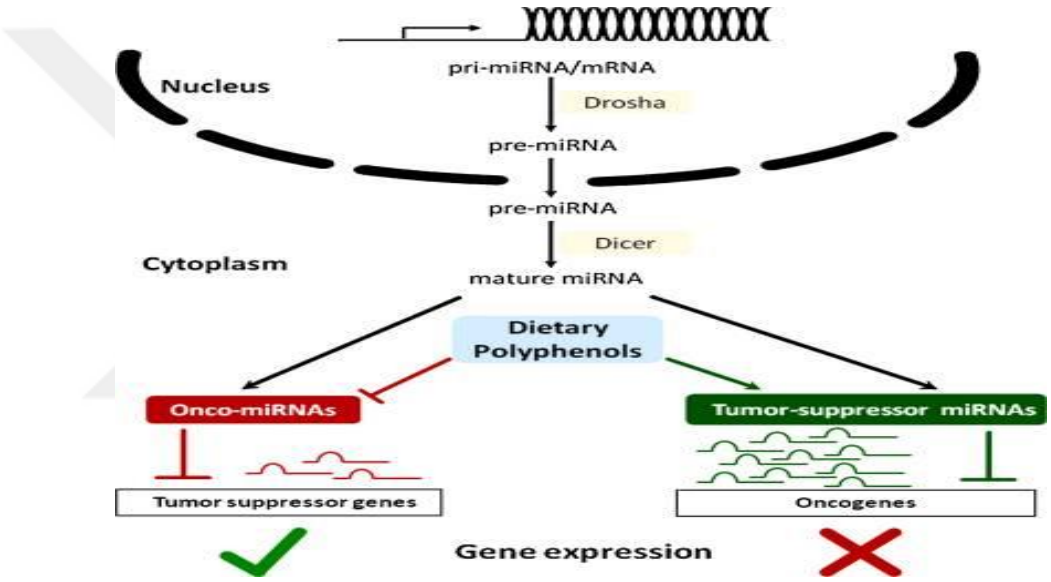
Son zamanlarda kanserle ilgili yapılan çalışmalarında miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki normal hücrelerin miRNA'sıyla karşılaştırılarak yeni sonuçlar elde edilmiştir. Kanserde miRNA'nın az eksprese olmasıyla tümör baskılayıcı olarak işlev görebildiğinin onkogen veya hücre farklılaşmasını ya da apopitozisi kontrol altına alan genleri düzenleyip kanseri önleyebileceği ihtimalini akıllara düşürmüştür. Kanserde miRNA'ların aşırı eksprese olmasının, onkogen olarak işlev gösterdiğini ve apoptozu kontrol eden gen olanları ya da tümör baskılayıcı gen olanları negatif olarak düzenleyip kanser gelişmesinde rol aldığınıgöstermiş olmakta ve elde edilen bu bilgiler ışığında tedavide kullanılabilme durumunu göz önüne getirmiştir. Kanser patolojisinde miRNA'nın işlevlerini çalışmak için down veya up regüle miRNA'nın ekspresyonunu düzenlemede önemli yer tutmuştur. Kanser patolojisinde miRNA'ların işlevleri çalışılırken özel promotorlar, antisens inhibitörler, transgenikler, real time PCR ve miRNA mikroarray vb özellikteki çeşitli yöntemlerde kullanılmaya başlanmıştır (Seydel ve ark., 2009).

MikroRNA'lar, hedeflerinde bulunan mRNA'ların moleküler yolaktaki özelliklerine göre tümör supressör ya da onkogenik olarak adlandırılabilmektedirler (Cowland JB ve ark., 2007).

2.3.4. Onkogenik ve Tümör supressör mikroRNA'lar

mikroRNA'lar, onkogenik veya tümör supresör özellikte olabilmektedirler. Normal dokularda bulunan miRNA'ların bir kısmının protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği ispatlanmıştır. İşlevi bir onkogenin ekspresyon seviyesini kontrol etmekle görevli olan miRNA'lara"tümör süpresör miRNA'lar" (TSmir) denir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı olan miRNA'ların ekspresyonlarındaki azalma

onkogenin ekspresyonunun artmasına sebep olurken, tümör oluşumuna da neden olmaktadır. Bunun tam tersi olarak, "onko-mir"olarak tanımlanan birtakım miRNA'ların kanser gelişimini hızlandırdığı görülmektedir. mikroRNA'lar, onkogenik ve tümör süpresör mRNA'ların her ikisini potansiyel hedef noktası olarak görüp,fonksiyonlarını da bu mRNA'lar üzerinden gösterirler (Karagün ve ark., 2014). mikroRNA'lar, onkogenik ve tümör supresör mRNA'ların her ikisini de hedefleyebilirler. Bu nedenle, belirli bir miRNA'nın asıl işlevini ya TS-mir'in ya da onko-mir'lerin hücresel içeriğine bağlamak mümkündür (Cowland JB, 2007).



Şekil 2.6. Onkogenik ve tümör supressör mikroRNA'ların işlevi

2.3.5.Tümör supressör mikroRNA'lar

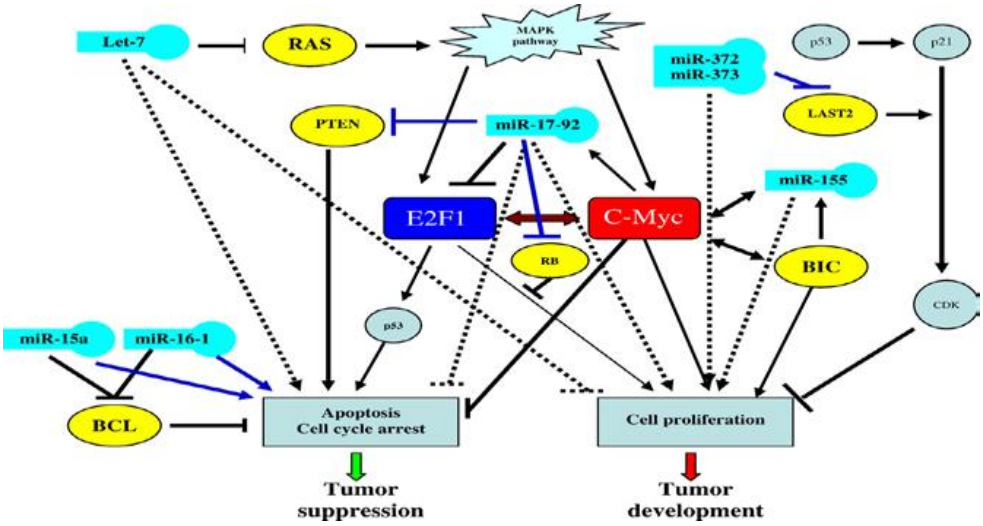
İlk defa 2001 yılında miRNA'ların kanserleşme süreci içindeki etkisi miR-15a ve miR16-1'in teşhisi ile rapor edinilmiş olarak bulunmakta, bu miRNA'ların etki mekanizması ise 2005 senesinde Cimmino'nun ve arkadaşlarıyla beraber yayınlamış oldukları çalışmayla ispatlanmıştır. Her iki miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin KLL (Kronik Lenfositik Lösemi) hücrelerinde, anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteini olan Bcl-2'nin üretimiyle ters orantılığı orataya çıkarılmıştır. Böylelikle Cimmino ve

arkadaşlarının miR-15a ve miR16-1'in tümör supressör etkisine sahip oldukları ispatlamış oldular. İki miRNA'nın düşük seviyelerinin (tümör süpresör fonksiyon kaybı) yüksek seviyedeki Bcl-2 proteini ile alakalıolması sebebiyle anormal hücre büyümesini gerçekleştirdiği yüksek oranlarda (normal tümör supressör aktivite) da apoptozla alakalı olduğu ortaya çıkarılmıştır (Cimmino, A., 2005).



Şekil 2.7. Tümör supressör miRNA'nın işlevi

Normal seviyelerindeki kontrolsüz hücre büyümesinin önlediği ispatlanan miR-15a ve miR16-1'in böylece tümör supressör olduğu belirlendi. Hücreyi apoptoza yönlendiren durumlarda apoptozu önleyip hücrenin yaşamasını sağlar. Bcl-2'nin yüksek seviyede ekspresyonuna sağlayan bir kromozom translokasyonununsonucunda, bcl-2 onkogenine dönüşür. Bcl-2 ailesi birbirine tamamen ter etkileri olan iki grupdur. Bunlardan ilki proapopitotik etkiyle apopitozisi ve Sitokrom C'nin mitokondriden stoplazmaya geçişini indükler. İkincisi ise anti-apopitotikdir, apopitozisi baskılar ve Sitokrom C'nin salınmasını engeller (Şekil 2.8) (Aksoy ve Seydel., 2009).



Şekil 2.8. miRNA'nın kanser patolojisini kapsayan moleküler mekanizması

miRNA ailesinin üyelerinden biri Let-7'dir. Let-7 ailesi *Drosophila, C.elegans* ve omurgalı sınıfını da içinde bulunduran birçok canlıda mevcuttur. Genellikle insanlarda görülen kanser çeşitleri delesyona uğramış olan bölgelerdedir. Akciğer kanserlerinin teşhisinde rol model oynamaktadır. Ras onkogeni, let-7 gen ailesinin asıl hedefindedir ve let-7 Ras ekspresyonunu translasyonel baskılama için RAS mRNA'sının 3'UTR bölgesinin etkisiyle yapar. Ras proteinleri, mitojenik sinyal yolaklarında büyüme faktör reseptörlerini, Raf protein-serin/protein-treonin kinaz aktivasyonunu sağlayarakçok önemli rolleri üstlenmiştir. Böylece, ERK MAP kinazların aktifleşmesiyle beraberprotein kinaz döngüsünü başlatılmış olunur (Seydel ve Aksoy., 2009)

Ras gen ailesi; H-ras, K-ras ve N-ras'tan olarak üçe ayrılır. Ras genleri insanda görülen kanser çeşitlerinin ortalama olarak %20'sinde, bağırsak kanserlerinin yarısında ve akciğer kanser türlerinin de 1\4'ünde görev almaktadır. Ras geninde oluşan nokta mutasyonunun kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır. Ras geni birden çok büyüme faktörü reseptörlerinden aldığı mitojenik sinyallerin iletiminde görev alarak, guanin nükleotid bağlayan proteinleri kodlamaktadır. Ras proteinlerinin aktivitesi GTP'nin ya da GDP'nin bağlanma şekline göre değiştiğinden, protein aktif (GTP-bağımlı) ve protein aktif olmayan (GDP-bağımlı) durumlarının arasında kalınabilmektedir. Ras onkogenlerine has mutasyonlar, Ras proteinlerinin devamlılık

göstererek, GTP'ye bağlılık gösteren aktif durumunun korumasına sebep olur. Bu durum, normal olan Ras proteinlerine bağlı GTP'nin de parçalanmasını uyaran GAP'a (GTPaz aktive edici protein) onkojenik Ras'ın cevap veremeyeceğinden dolayıdır. Hücre içinde bulunan GTPaz aktivitesinin düşüş göstermesi bağlı olarak onkojenik Ras proteinleri aktifleşmiş haldedir. Sonuç olarak GTP-bağlı kalarak hücrenin kontrolsüz çoğalmasına olurlar sebep olmaktadır (Seydel ve Aksoy., 2009).

Üç tane izoformu olan miR-29(miR-29a, miR-29b, miR-29c), tümör supresör özellik gösteren mikroRNA'lar olarak bilinir. miRNA-143'ün birden fazla histolojik tümör çeşidinde, anormal olarak büyümeyi baskılamış olduğu gözlemlenmiştir (Saydam ve ark., 2011).

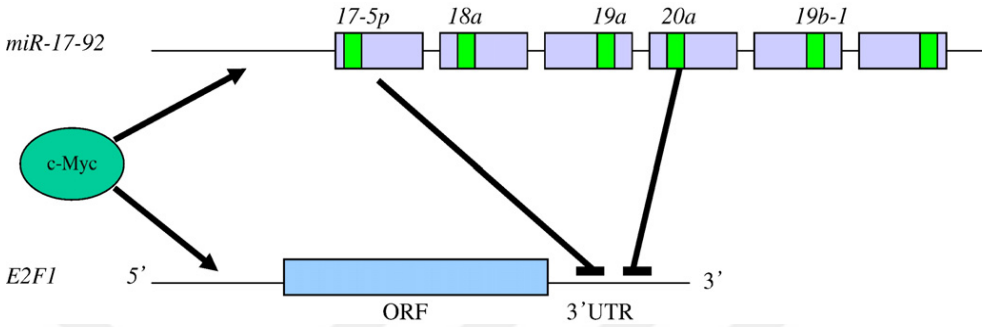
B-hücreli olan kanserler meme, mesane, kolorektal, serviks ve hipofiz tümörlerinde, miR-143'ün tümör süpresör olduğu ortaya konulmuştur. Serviks kanser çeşidinde miR-143'ün hücre proliferasyonunun baskılandığı, kolorektal kanserde ise *KRAS*(viral onkogenik) ve KRAS'ın sinyal yolununda direkt engellediği gözlemlenmiştir (Karagün ve ark., 2013).

2.3.6. Onkogenik miRNA'lar

Tümör süpresör miRNA'ların aksine, onkogenik miRNA'lar yüksek oranda kanser çeşitlerinde kontrolsüz büyümeyi arttırma ya da antiapoptotik yönde etkinlik gösterirler. Teşhis edilen ilk onkogenik miRNA'lardan biri olan, protein kodlamayan BIC Bcell Integration Cluster) ile birlikte eksprese olunan miR-155'tir.Onkogen gibi davranan bir diğer mikroRNA, miR-21'dir. Mir-21'inKLL, AMLve glioblastomagibi hematolojik malignlerde ve katı tümörlerde, kolon karaciğer, mide, akciğer, meme, prostat ve pankreas kanserlerine benzerlik gösteren birçok kanser çeşidinde yüksek oranda ekspresyonu gözlemlenilmiştir(Saydam ve ark., 2011).

miR 17-92 geni onkogen olarak işlev gösteren miRNA'lara güzel bir örnek oluşturur. 13q31 kromozomunda bulunan polisistronik bir miRNA'dır. 13q31 gen bölgesi akciğer kanseri ve lenfomanın çeşitlerinden türetilmiştir. miR-17-92

ekspresyonu, normal dokulara oranla akciğer kanseri ve lenfomaları bulunduranen agresif şekili olan akciğer kanseri ve insan B hücre lenfomasında yükseliştedir. Tümör supresör olarak görev alan PTEN ve RB 2'yi hedefleyerek onları inaktifleştirir (Zhang, 2006; Jiang, 2005; Hammond, 2006) (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9. miR 17-92' nin fonksiyonu

Konaç ve ark., 2010 yılındaki çalışmalarında insanda görülen tümörleri yeni onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak sınıflandırmaktadır. Genomun kodlanmakta olunan genlerinin major düzenleyicilerinden biri olan miRNA'lar, moleküler tıp alanında yeniprognostik, diyagnostik ve hedef odaklı terapötik biyomarkırların tespitinde umut vericiliği artırmıştır. Dolayısıyla, günümüze kadar ürolojik kanserler ile bağlantılı olduğu ispatlanmış miRNA'ların kanser oluşumunda, gelişimindeki ve ilerlemesindeki hedef genler odaklı işlevsel rollerinin ve ifadelenme profillerinin belirlenmesinde kliniğe yansımalarına dikkat çekmeyi sağlamış bulunmaktadır. miRNA'lar, ökaryotik hücrelerde birden çok işlevde bulunduğundan, miRNA'lardan kaynaklı kanser ve daha birçok hastalık ortaya çıkmaktadır. Birden çok miRNA'nn ifadelenme profilleri ve lokalizasyon dikkate alındığında alındığında karsinogenezde kilit roller üstlendiği görülmüştür. Belli olan tümörde birden fazla genin ifade edilme profilinin robotik teknolojiler (mikroarray), miRNome üyelerinin yardımı aracılığıyla ortaya konulabiliyor ve adeta araştırılan tümörün imzası (parmak izi) ortaya çıkarılabiliyor. Tümörün protein şeması ortaya konularak, çoklu-biyomarkırların da panel olarak çalışılabilmesi temeline dayanan genomiks ve proteomiks teknolojileri, kanser hastalığında birden çok genin ve faktörün etkilendiği hastalık türlerinde,

prognostik, has ve duyarlı diyagnostikve terapötik amaçlı moleküler klinik çalışmalara önemli cevaplar oluşturabilen yeni bir çalışma alanı oluşturmaktadır.

Pritchard C., ve Grady W., 2010 yılında yaptıkları Colorectal Cancer Molecular Biology Moves İnto Clinical Practice adlı çalışmadakişisel ilaç sözü kolorektal kanser genetiğinde artık klinik bir gerçekliktir. Cetuximab ve Panitumumab monoklonal antibodi terapileri ile tedaviye rehberlik etmek amacıyla spesifik moleküler değişimler için olan kolorektal kanserleri test etmede son zamanlarda daha fazla kanıt bulunmamaktadır ki bu Cetuximab ve Panitumumab monoklonal antibodi terapileri epidermal büyüme faktör reseptörlerini hedef almaktadır. Bu derlemede, kolorektal kanserin genetik mekanizması ve bu değişimlerin erken teşhis, tedavi yanıtlarının öngörüsü ve riskin önceden tahmini için olan biomarkerlarla nasıl ilişkisi olduğu üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmalara göre anti-EGFR tedavisine rehberlik edecek KRAS mutasyonel analizi kişisel ilaç alanında ilk başarılar arasındadır. MSI ve BRAF mutasyonu lynch sendrom genetik testinde belirgin rollere sahiptir ve bu markırlar kolorektal kanserin tahmini için büyük rol üstlenmektedir. Sonuç olarak, risk tespiti için moleküler markırları kullanmak ve kolorektal kanserin erken tespiti umut vermektedir. Ayrıca, bu markırları kullanmak moleküler ilaç alanının bir parçası olacaktır.

Mosakhani ve ark., 2012 yılında microRNA profiling predicts survival in anti-EGFR treated chemorefractory metastatic colorectal cancer patients with wild-type KRAS and BRAF yaptığı çalışmasında Anti-EGFR monoklonal antibadileri metastatic kolorektal kanserin tedavisinde etkilidir. Fakat KRAS/BRAF' ta mutasyona sahip olan ve bunların yaklaşık yarısı kadar mutasyona sahip olmayan hastalarda bu antibadiler cevap vermez. Burada miRNA'ların anti-EGFRmAb'lere etkilerini görebilmek içinmiRNA analizi üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmada primer tümöre ve yabani tip KRAS/BRAF sahibi 33 hastanın miRNA ekspresyon profili üzerinde mikroarray kullanarak çalışılmıştır. Ayrıca bu çalışmada her miRNA'nın hayatta kalma (OS) ile ilişkisini Cox proportional hazards regression model ile test edilmiştir. Mir-31'in çok ekspresi ve miR-592'in az ekspresi hastalığın kontrolüne karşı hastalığın ilerlemesinde görülmüştür. Mir-31 ekspresyonu ve hedef genlerinin SLC26A3 VE ATN1 düşük

regülasyonu kantitatif reverz transkriptaz polimeaz zincir reaksiyonu tarafından doğrulanmıştır. miRNA ekspresyonuna dayalı hasta kümesi hasta kümeleri içinde OS' de belirgin bir farklılık göstermektedir. Let-7 ailesinin üyeleri düşük OS'a sahip hasta kümesinde yüksek regülasyon göstermiştir. Ek olarak, miR-140-5p yüksek regülasyon ve miR- 1224-5p düşük regülasyonu hem küme analizinde hem de Cox modelinde düşük OS ile belirgin bir şekilde ilişkilidir. Doğal tip KRAS/BRAF sahibi mCRC hastalarında miRNA profillemesi anti-EGFRmAb tedavisinin yararlarını etkili bir şekilde tahmin edebilmektedir. Hastaların büyük çoğunluğu bu miRNA'ların tahmini işaretleyici uygulamaları için gereklidir.

Sonuç olarak kolon kanserli dokulardaki tümör süpressör miRNA'larn mikroarray yöntemi kullanılarak belirlenmesi ve bu hedef doğrultusunda miRNA temelli kanser tedavisi çalışmaları sonucunda onkogenik etkiye sahip olabileceğini düşündüğümüz miRNA'ları etkisiz hale getirmek için bu bazlara uyumlu anti- tedavisinde telomeraz inhibisyonuna benzer şekilde önemli bir gelişme sağlayacağı kanaatindeyiz. Ayrıca, tümör süpressör miRNA'ların az sentezlendiği CRC hastalarına bunu dışarıdan takviye ederek tümör gelişimi durdurulabileceği düşünülmektedir.

2.4.Mikroarray

Bilişim teknolojilerindeki gelişmeye parelel olarak, İnsan Genom Projesinden elde edilenlerle birlikte, tanı yöntemlerinde yeni bir döneme geçilmiştir. Bu dönemde yeni gen teknolojileri arasında bulunanmikroarray teknolojisi en dikkat çeken yöntemlerdendir. Belki de bu yöntem biyoteknolojinin ulaştığı en son noktalardan birisidir.

Genellikle naylon, cam, membran ya da silikon yapıda bulunan katı yüzeylerin üzerinde küçültülmüş alanlara yerleştirilmiş olan milyonlarca birbirine denk olan tek iplikçikli DNA parçacıklarının (prob), antikor veya epitopik belirteçlerin yardımıyla genomda depolanmış halde bulunmakta olan bilgilerin hibridizasyon gibi özgün

kimyasal bağlanma temellerine odaklı bir prensiple inceleyen tekniktir. Uygulanan yöntem ve amaç farklılıkları olmakla birlikte, “DNA chip”, “microchip”ve “DNA array” gibi açıklamalar da benzer uygulamaları ifade eder. Bununla beraber, *insitu* oligonükleotit sentezi yöntemiyle üretilmiş olmakla beraber yüksek konsantrasyonlu mikroarray platformları çip olarak tanımlanırken, “DNA array” ifadesi özelliklede cam lamların üzerinde hazırlanmış daha küçük kapasiteli platformlarda kullanılmamacı güdebilir. Mikroarray yönteminin en önemli özelliğiyse, dar bir alanda çok sayıda genomik gözlemlemenin yapılıyor olmasıdır. Bu teknikle yakın bir zamanda küçük bir okuyucu cihaz yardımıyla hasta başındaki çok sayıda bulunan hastalık ya da etken arasından ayırıcı tanının yapılmasına ya da tedavi sonuçlarının değerlendirilmesine imkan sağlayacaktır (Saraçlı, 2007).

İnsan genomunda ortalama 30.000 gen bulunduğu tahmin edilmektedir. Bu kadar fazla genin her birini ayrı ayrıanaliz etmenin kolay olmadığı söylenebilirAncak günümüzdeki teknolojik gelişmelere parelel olarakçok fazla sayıdaki genin aynı anda analizinin yaplmasına imkan vermektedir. Hızlı bir artış gösteren dizilim bilgilerinden en yüksek derecede faydalanılabilmesi için yeni teknolojik gelişimlereihtiyaç duyulmuştur. Bu teknolojiler arasındanda en kuvvetli olanlarından birisi de oligo nükleotidlerin ya da tamamlayıcı DNA (complementary DNA, cDNA) kısımlarının yüksek konsantrasyonda yan yana dizilmesiyle karakterize olan mikroarray (mikroçip, mikrodizilim) teknolojisidir (Seydel,2007).



Şekil 2.10. Mikroarray sistemi (Affymetrix)

Mikrodizi tekniğinin ilk girişimleri Schena veShalon tarafından gerçekleştirilmiştir(Bignell ve ark 2004). Öncü arrayler, 1980'lerin yarısında keşfedilmiştir ve mikroarray denilmiştir. Bu cihaz üretimine ise 300 mikronluk DNA problarıyla başlanılmış ve spotların büyüklüğü 300 mikron olacak şekilde ayarlanmıştır. Çoğunlukla DNA klonlama işlemi, PCR ürünlerinde veya oligonukleotidlerde ve özellikle de radyoaktiflik bakımından etiketlenmiş olanamaçlar doğrultusunda kullanılmıştır. Mikroarray teknolojisi öncül olarak tıpta kllanılmıştır (Seydel,2007).

Mikroarray'lerin gen ekspresyonunda kullanılma amacıyla ilgili ilkçalışmalar 1995 yılında Science Dergisi'nde yayınlanmıştır (Schena ve ark., 1995). Mikroarray yöntemi kullanılarak ile tanımlanmış ilk ökaryot genom ise *Saccharomyces cerevisiae*'nin genomu olmuştur ve bu çalışma da yine Science Dergisi'nde, 1997 senesinde yayınlanmıştır (İpekdal, 2006).

Mikrodizi teknolojisi geliştikçe kanser çalışmaları alanındaki kullanılma potansiyeli de artmış olmaktadır. Kanserli ve normal hücrelerde bulunan tüm mRNA ve miRNA'nın ekspresyon modellerinin karşılaştırılabilmesi önem kazandırıyor. Bu nedenle ekspresyon profillerini tek bir zaman zarfında teşhisedebilecek bir metot

olarak mikrodiziyöntemi kullanılır. İki renkli floresana dayalı mikroçip teknolojisi (DNA mikroçip) aynı zamanlı gen ekspresyonlarının saptanmasınıda çok büyük katkıda bulunmaktadır. Bir kısım laboratuvarlarda DNA mikroarray teknolojisinin kullanılmasıylabirlikte miRNA mikroarray teknolojisini oluşturmuştur (Babak ve ark.,2004; Barad ve ark., 2004; Liang ve ark., 2005; Liu ve ark., 2004; Nelson ve ark., 2004; Nelson ve ark., 2004; Thomson ve ark., 2004).

Tümörlü dokular ile normal dokular arasındaki ilişkinin çok daha iyi anlaşılmasında miRNA mikroarray analizleri geniş içerikli bir teknoloji halini almıştır (Liang ve ark., 2005; Liu ve ark., 2004). Bunun devamı niteliğinde de bazı miRNA tümör baskılayıcıya da onkogen genin bulunmasıyla miRNA'ların da kanserdeki görevini araştırmada, çoğunlukla miRNA mikroarrayleri kullanımaktadır (Calin ve ark., 2005; Iorio ve ark., 2005; Lu ve ark., 2005).

2.4.1.Mikroarray'in kullanım alanları

- Gen ekpresyon çalışmalarında,
- SNP'lerin belirlenmesinde,
- Mutasyon taraması ve genotiplemede,
- Protein ekspresyon çalışmalarında,
- Protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesinde,
- Hastalık araştırmaları; kanser, kalp hastalıkaları, mental hastalıklar(Alzheimer, Parkinson vb),
- Kanser; organ ve tümör gelişim tipine göre klasiksınıflandırma yerine tümör hücrelerindeki gen aktivite tipine göre sınıflandırma yapılabilmesi,
- Her bir spesifik kanser tipine göre tedavi stratejilerinin belirlenmesi
- Farklı tedavi yöntemlerinin tümör üzerindeki etkilerinin araştırılmasında,
- Daha etkili tedavilerin geliştirilmesi(Pehlivan, 2007., Akar, 1999).

2.4.2. Mikroarray teknolojisinin avantajları

- Gen ifadelerinin genel bir görüntüsünün elde edilmesi.
- Bilinen bir hücre çeşidinin belirli bir ortamdaki gen ifade profilinin belirlenmesi ve bu profilin farklı hücre tipleri ya da farklı çevre şartlarında gen ifade profillerinin kıyaslanması.
- Az miktardaki DNA örnekleriyle çalışılabilmesi.
- Mikroarray teknolojisiyle, DNA üzerinde bulunan tek bir baz değişikliğinin bile saptanılabilmesi, kısa bir zaman aralığında ve oldukça pratik bir şekilde birkaç bin genin analizlerinin yapılmasınaolanak vermesi.
- Bilgisayar destekli bir sistem olduğundan insan kaynaklı olan hatalarında ortaya çıkma ihtimalini de düşürmektedir (Başaran ve ark.; 2010).

2.4.3.Mikroarrayteknolojisinin dezavantajları

- Bütün mikrodizin deneylerinin aynı hassasiyetle yapılmamış olması,
- Ekspresyondaki en küçük değişimlerin analizde farkına varılmayacak boyutta olması,
- Farklı çiplerin kullanılması sonucu yapılan deneylerin birbiriyle karşılaştırılmasısırasında ortaya çıkan zorluklar,
- Optimizasyon ve standardizasyon sorunlarıyla birlikte herhangi bir çalışmadan çıkarılan sonuçların bütün yönüyle ele alabilecek biyoinformatik programlarının henüz tam geliştirilememiş olması.

Bu ve buna benzer problemleri çözüme kavuşturma doğrultusunda Microarray Gene Expression Data Society benzeri birkaç yeni kuruluşlar ortaya çıkmaktadır (Başaran ve ark., 2010).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Hasta seçimi

Çalışmada Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine başvuran, patolojik olarak kolon kanser teşhisi konmuş hastalardan örnekler alındı. Çalışma kolon kanseri teşhisi konulmuş hastalarda miRNA ekspresyonlarının araştırıldığı prospektif bir çalışma nitliğindedir. Çalışma için etik kurul onayı alındı(Harran Üniversite, Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alındı (Rapor No:2014/020).Hastaların; yaşı, cinsiyeti, iletişim bilgileri kaydedildi. Çalışmada 4 erkek ve 2 kadın hastanın kolon doku materyali kullanıldı. Çalışma için kolon kanserli hastaların hem normal dokusu hem de tümör dokusu 200 ml RNA later solüsyonu içerisine konularak, toplamda 12 örnek olacak şekilde soğuk zincir içerisinde laboratuvarımıza getirildi. Dokular -80°C de muhafaza edildi. Çalışmada RNAlater solüsyonuile fikse edilmiş kolon kanserine sahip hastaların nornal ve tümörlü kısımlarından alınan doku örnekleri(0.5 cm^3) kullanıldı.Herbir hastanın normal ve tümör dokularında bulunan tümör supressörmiRNA'ları belirlemek üzere mikroarray yöntem ile çalışıldı. Çalışmada GeneChip miRNA 2.0 Array Protokolü (Affymetrix) kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1.Mikroarray yöntemi

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 toplamından oluşmaktadır. Bir mikroarray'de bu spotlardan onbinlerce bulunabilmektedir. Her DNA spotu prob adı

verilen genellikle 20-100 nükleotid uzunluğunda belirli bir DNA sekansına sahiptir (Taub ve ark.,1983). Arraylerin üzerinde bulunan bu DNA dizilerinin üzerine laboratuvarda olan cDNA'lar uygulanmaktadır. cDNA komplementerini bulduğu noktayla hibridize olmakta ve floresans ışımalar yardımıyla bu noktadan görüntü almak mümkün olmaktadır. Array üzerinde bulunan her bir nokta ayrı bir deney olarak değerlendirilmektedir (Yoltaş ve Karaboz,2010). Mikroarray'ın çalışma basamakları;

1. Total RNA Hazırlanması
2. Poly(A) Kuyruğu Eklenmesi
3. Ligasyon Aşaması
4. Hibridizasyon
5. Yıkama-Boyama-Tarama
6. Analiz

3.2.1.1. Total RNA izolasyonu

Çalışmada -80^{0}C' de saklanan kontrol ve tümörlü kolon dokularındantotal RNA izolasyonu için miRNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) kullanıldı. Normal ve tümörlü kolon dokularından alınan doku parçaları alınıp 2 ml' lik 10 manyetik top bulunan tüplere alındı. 0. 5 cm^3'lik doku parçasının1.5 katı kadar Qiazol ilave edildikten sonra tüpler homojenizasyon cihazına yerleştirildi. Cihaz 7600 rpm'de 3 döngü yapacak şekilde ayarlandı(Her bir döngü 30 sn).Doku örneklerinin mekanik parçalanması işlemi sonunda elde edilen üst faz 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınarak üzerlerine 140 ml kloroform ilave edilerek 2dk oda sıcaklığında bekletildi.12.000x *g* /15dk/+4^{0}C de santrifüj edildi.Üst faz yeni tüplere alınarak geri kalan içerik atıldı.

Yaklaşık olarak 20'den fazla nükleotite sahip olan tüm RNA mokülleri dışındaki diğer molekülleri ortamdan uzaklaştırmak için üst sıvı faza 1.5 katı olacak kadar %100 etanol eklendi. Örnek, daha sonra RNeasy Mini spin kolonuna(2 ml) konuldu.8000 *g*/15 sn santrifüj'den sonra ve spin kolonların toplama tüpleri atılarak yeni eppe-ndorf tüplere alındı. Sırasıyla RWT tamponu (700 ml) ve RPE tamponu (700 ml) eklenip santrifüj yapıldı (8.000x *g* / 15 sn). Tekrar RPE tamponu (500 ml)

eklendikten sonra 8.000x *g* de 2 dk santrifüj yapıldı ve işlem sonunda yeni tüplere transfer edilen spin kolonlar 13.000x *g* /1 dk santrifüj işlemine alındı.

Son olarak spin kolonlar yeni eppendorf tüplere alınarak 30 µlRNaz içermeyen su eklendi.8.000x *g*/1 dksantrifüj edildi. Bu işlem iki iki defa tekrarlandıktan sonra eppendorf tüplerdeki spin kolonlar atıldı ve RNA izolasyonu tamamlanmış oldu. Örnekler-80^{0}C'ye alındı.



Şekil 3.1. Doku Homojenizasyon Cihazı (Precellys Evolution, cryolys)

3.2.1.2. RNA kalitesinin ve miktarının belirlenmesi

3.2.1.2.1. Nanodrop ölçümü

İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu hakkında bir bilgi üzereOD_{260} (nükleik asit optik konsantrasyonu) ve OD_{280} (protein optik konsantrasyonu) değerlerinin NanoDrop spektrofotometre p360 (Implen) (mikrohacim spektrofotometre) yardımıyla ölçüldü.

Mikroarray işleminine tabi tutulan örneklerdeki total RNA'nın, belirli bir değerde olması gerektiğinden 260 / 280 nm oran aralığının 1.7 ile 2.0 değerleri

arasında olması durumunda RNA saflaştırılmış olarak kabul edildi. Bu oranın bu değer aralığından daha düşük çıkması durumunda; 280 nm'de absorbe olan DNA, protein ve diğer kirleticilerden bahsedilmektedir. Çünkü 280 nm'de ölçülen bir değerdeki herhangi bir artış A260/A280 oranında düşüşe sebep olacaktır.



Şekil 3.3. Nanodrop cihazı (Implen)

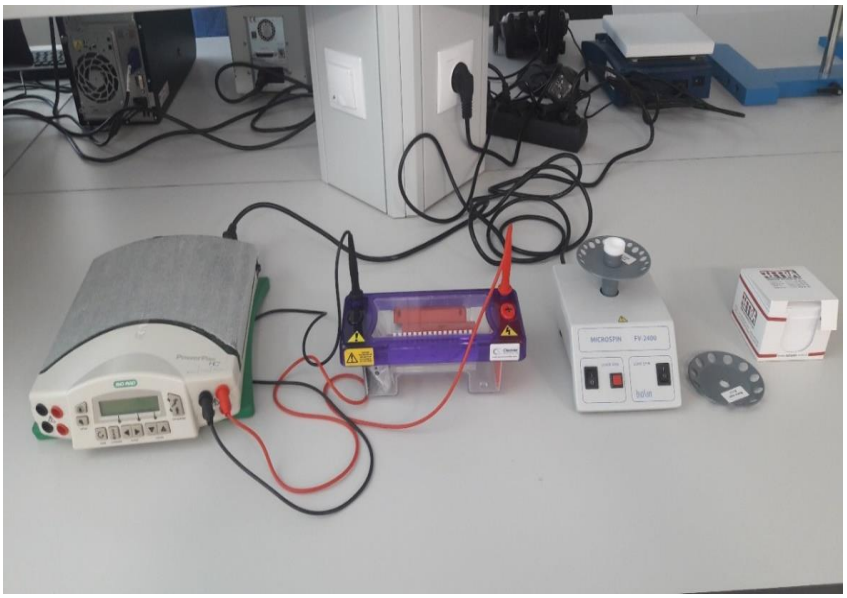
3.2.1.3. Elektroforez

Elektroforez, Moleküler Biyoloji ve Biyokimya deneylerinde çoğunlukla kullanıla gelmiş, makro molekülleri ayırmada ve bazı durumlarda saflaştırmamızı olanak tanıyan bir tekniktir. Protein ve nükleik asitlerin, büyüklüklerindeki, biçimlerindeki veyüklerindeki farklılıklar göz önünde bulundurulmasına dayalı bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Elektrik varlığında hareket halinde olanmoleküllerin jel boyunca karşı tarafa hareket etmesi jel elektroforezi olarak tanımlanmaktadır Elektroforez işlemi sırasında gereken güç, jelin her iki uç kısmında yerleşik olarak bulunmakta olanelektrotlara uygulanmakta olan voltaj ile ilişkilidir. Elektrik alanındaki bir molekülün hangi hızla jel ortamında hareket ettiği, o molekülün özelliği ile ilişkilidir.

Birden fazla önemli biyolojik makromoleküllerde (örn Amino asitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler) iyonlaşabilme özelliğine sahip gruplar bulunurken ve PH' ya bağlılık gösteren çözeltilerde katyon (+) veya anyon (-) biçiminde, elektrik yükü taşıyan gruplar içerirler. Net yükündeki özelliklere bağlı olunarak, yüklü partiküller katota veya anoda doğru hareket etmektedirler. Örneklendirirsek elektrik alanındaki jel nötral PH' da bulunuyorsa, DNA' nın negatif yüklü kısımlarının fosfat grupları anado doğru hareket ediyordu (Westermeier, 1997).

3.2.1.3.1. Jel hazırlanması

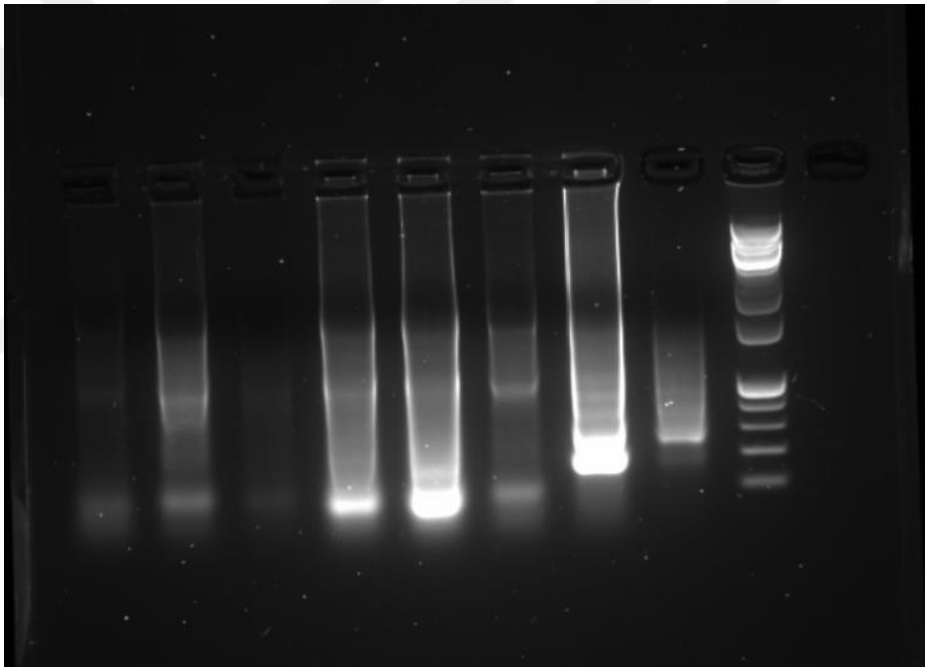
1.5 gr agarozhassas terazide ölçülerek 50 ml'lik cam şişeye konularak üzerine 100 ml (1X) TAE eklendi.1.3 ml Sodyum hipoklorit (NaClO) eklenerek hafifçe karıştırıldı. Mikrodalga fırında agaroz çözününceye kadar bekletildi. Şişe oda sıcaklığında soğutulmaya bırakıldı, oda sıcaklığına gelince 4 damla jelred boyası eklenerek hafifçe karıştırıldı.Hazırlanan jel karışımı elektroforez tankına dökülerek soğutulmaya bırakıldı.



Şekil 3.4. Elektroforez Sistemi (Cleaver)

3.2.1.3.2. RNA örneklerinin agaroz jele yüklenmesi

RNA örneğinden 5 µL ve 2 µL 10X'lik yükleme boyasından alınarak karıştırıldı. 1X 'lik TAE tampon çözeltisinden agaroz jelin üzerini kapatacak kadar tankın içine döküldü. Jeldeki ilk kuyucuğa 4ml DNAmarkıryüklendi. Diğer kuyucuklara ise sırası not edilerek hazırlanan RNA ve boya karışımı eklenildi. Agaroz jelin elektroforez sistemi (Cleaver) güç kaynağına bağlandıktan sonra 115 volt, 110 mA, 90 dakikalık süreçte örnekler yürütülme işlemine alındı. Bu süre sonunda erdikten sonra agaroz jel görüntüleme cihazının içine (ChemidocBiorad) yerleştirilip, UV ışığı altında görüntüler elde edildi.



Şekil 3.5. Elektroforez Sistemi (Cleaver)

3.2.1.4. Poly (A) kuyruğu eklenmesi

Bu aşama RNA molelekülüne 3'ucundan poly(A) kuyruğu ekleme aşamasıdır. Kuyruklama için ATP karışımının 1 Mm' lik TRİS ile dilüle edildi. Poly (A) Tailing Master mixde kullanılmak üzere ATP miks (1:500=1 µl stok ATP(Vial 3) + 499 µl 1 Mm Tris).+4ºC muhafaza edilen Affymetrix Flash Tag/Biotin HSR RNA Labelling kit kullanıldı.

Tüm örneklerden eşit miktarda RNA alınarak çalışılmaya başlanıldı. Array çalışması için -80 ^{0}C de bekletilen örnekler dolaptan alınır hafifçe spin yapıldıktan sonra nanospektrofotometre ile okundu. Örnekler soğuk blok içerisine yerleştirildi. Örnekler 1000 ng ve totalde 8 µl olacak şekilde, ayarlanıldı. Hazırlanan eppendorf tüplere sırasıyla 2 µl (Vial 8) eklenip, hafifçe karıştırıldı ve ondan sonra spin yapıldı.

Çalışmada 2 örneğimiz olduğundan X 2.5 olacak şekilde Poly (A) Tailingmaster mix hazırlandı.

Çizelge 3.1. Poly (A) Tailing master mix içeriği

Bileşenler	**Örnek**	**X 2.5**	**X 3**	**X 7**
10X Reaction Buffer (Vial 1)	1.5 µl	3.75 µl	4.5 µl	10.5 µl
25Mm $MnCl_2$ (Vial 3)	1.5 µl	3.75 µl	4.5 µl	10.5 µl
Diluted ATP Mix(1/500)(Vial 3)	1 µl	2.5 µl	3 µl	7 µl
PAP Enzyme (Vial 4)	1 µl	2.5 µl	3 µl	7 µl
TOTAL	**5 µl**	**12.5 µl**	**15 µl**	**35 µl**

***** PCR cihazı 37ºC ve 15 dk olacak şekilde programlandı.

5 µl Poly (A) Tailing master miks ve 10 µlRNA Spikecontrololigos alınarak tüplere konuldu. Totalde 15 µl olan karışım hafifçe spin yapıldı. Karışım 37 ^{0}C de 15 dk inkübatür cihazına bırakıldı.

3.2.1.5. Flash tag biotin hsr ligasyon aşaması

İnkübatör cihazından alınan karışım soğuk blok üzerinde bekletildi. Üzerine 4 µl 5x Flash TagBiotin HSR Ligation miks (Vial5) eklendi.Ligation mix eklendikten sonra 2µl T4 DNA ligas(Vial 6) her bir örneğe eklendi ve mikropipetle hafifçe pipetaj yapıldıktan sonra oda sıcaklığında(25 ^{0}C ‘de) 30 dkinkübe edilip örnekler üzerine 2,5 µl HSR Stop solüsyonu (Vial 7) ilave edilidi. Böylece toplam volüm23,5 µl’ye tamamlandı.

Çizelge 3.2. Ligasyon miks bileşenleri

Bileşenler	Miktar
5X Flash Tag Biotin HSR Ligation Mix Biotin (Vial 5)	4.0 µl
T4 DNA Ligase (Vial 6)	2.0 µl
30 dakika inkübasyon	
Stop Solution	2.5 µl
TOTAL	23.5 µl

***Karışım 6 saat buz üzerinde bekletildikten sonra -20 ^{0}C de 2 hafta süreylehibridizasyon işlemi için muhafaza edilebilmektedir.

3.2.1.6. Hibridizasyon aşaması

Çalışma miRNA2.0 göre hazırlandı. Hibridizasyon işlemi için-20^{0}C de bekletilen örnekler alınıp oda sıcaklığında tutuldu.

Çizelge 3. 3. Hibridizasyon miks içeriği

Bileşenler	Miktar
2X Hybrıdızatıon	50 µl
27.5% Formamide (vial 12)	15 µl
DMSO	10 µl
20X Hybrızatıon	5 µl
Control Oligo B2,3 nM	1.7 µl
Total Volume	81.7 µl

Bu aşamada hibridizasyon kokteyl hazırlandı. Kokteyl 65^{0}C5dkinkübeedilidi.23.5ml olan her bir örnek üzerine 81.7 ml hibridizasyon miks ilave edildi. Toplam hacim 105.2 ml oldu. Örnekler 99^{0}C 5dk 45^{0}C 5dk inkübe edildi. Çipler yükleme işlemi için +4 ten alınıp oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon işlemi sonunda çiplere yükleme yapıldı.



Şekil 3.6. PCR ürünlerinin yüklendiği Mikroarray çipi

Çiplerin arka yüzeyinde çapraz yerleşmiş şekilde bulunan iki septadan birine pipet ucu takıldı ve diğer septaya örnek yüklemesi yapıldı. Çiplere örneklerden 100µl yükleme yapılarak ve her iki septa yapışkan bant ile kapatıldı. Daha sonra yükleme yapılan çipler hibridzasyon fırınına bırakılıp 48^0C de 60 rpm de16 saat inkübe edildi.

İnkübasyondan sonrası alınan çiplerin arka septalarındaki yapışkan bantar sökülerekFludisc cihazına yerleştirilir.

3.2.1.7. Yıkama-boyama-tarama

Çipler Gene Chip Fluidics Control sistem üzerine yerleştirildi. Cihazın yan tarafındaki yıkama şişelerine 400 ml WashA, Wash B ve H2O eklenir. Cihazın hortumları şişelere yerleştirildi. Cihaz üzerinde bulunan 4'lü bölmelerdeki tutucu kısımlara üçer adet 1.5ml'lik eppendorf tüpler yerleştirildi.

Yıkama işlemine başlarken önce Fludics System de ‘‘prime’’ işlemi yapıldı. Prime sonrasında da boyama işlemine geçildi. Çipler cihazdan alındıktan sonra tekrar yıkama işlemi yapıldı.

Çizelge 3.4. Boyama işlemi bileşenleri

Tüp	Bileşenler	Miktar (µl)
1	Stain Buffer 1	500
2	Stain Buffer 2	500
3	Array Holding Buffer	800

Fludisc cihazından alınan çiplerin arka kısımda bulunan septalara tekrar tak spotlarla kapatıldı ve çiplercihaza yerleştirilip tarama işlemi başlatıldı. Daha önce sisteme tanıtılan örneklerin isimleri seçilerek otomatik olarak array ile uyumlu script aktifleştirildi.

3.2.1.8. Analiz

miRNA ekspresyon profili Gene Chip miRNA 2.0 Array (Affymetrix) kullanılarak gerçekleştirildi. Her örnekten yaklaşık 1000 ng RNA, FlashTag Biotin HSR RNA etiketleme kiti (Affymetrix) kullanılarak biyotin ile etiketlendi. Daha sonra, işaretlenmiş örnekler mikrodizi çipleri üzerindeki insan probları ile 48 rpm'de 60 rpm'de16 saat melezleştirildi**.**Hibridizasyondan sonra prob dizileri yıkandı ve AGCC Akışkan Kontrol Yazılımına göre Fluidics Station 450 kullanılarak boyandı. Daha sonra dizide floresan Affymetrix kullanılarak tarandığı GeneChip yüksek çözünürlüklü 6 g yama ile tarandı. Affymetrix GeneChip tarafından üretilen prob hücre yoğunluğu dosyaları (* CEL dosyaları) Commet Console yazılımı, güçlü bir çok dizili (RMA) algılama algoritması iş akışı kullanılarak prob seviyesi özet dosyalarına (* CHP dosyaları) aktarıldı. * CHP dosyaları, farklı şekilde ifade edilen genleri tanımlamak ve görselleştirmek için Transcriptome Analysis Console (TAC) yazılımı, 2.0 sürümü kullanılarak analiz edildi. Mikroarray analizinde öncelikle tarayıcıdan çıkan görüntülerin kalitesinin belirlenmesi ve array üzerindeki artefaktların analiz dışı bırakılması içingörüntü analizleri yapıldı. Görüntü analizleri sonrasında elde edilen verilerin istatistiksel olarak normalizasyonları gerçekleştirildi. Normalizasyonu yapılan arraylerin sinyal

yoğunluklarının log2 çevirimleri yapıldıktan sonra istatistiksel olarak örneklerin karşılaştırılması gerçekleştirildi. Tümör ve normal doku kat değişimleri değerleri karşılaştırılarak tümörlü ve normal dokular arasında miRNA' ların ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıklar belirlendi. ANOVA (Analysis of variance), testleriyle evrelere göre farklı eksprese olan miRNA'lar belirlendi. Örnekleri tümör/normal şeklinde gruplamalarında farklı eksprese olan miRNA'lara yönelik kümeleme analizi gibi istatistiksel yöntemlerle çoklu veriler arasında ilişki belirlendi.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Kansere bağlı ölümlerin büyük bir kısmını oluşturan kolon kanserleri tüm dünya da sıklıkla görülen kanser türlerinden birisidir. Göğüs, akciğer ve prostat kanserlerinden sonraki sırada yer almaktadır. Gastrointestinal sistem kanserleri içerisinde değerlendirilen kolorektal kanser, erkek ve kadınlarda görülen tümörlerin %15' ini oluşturmaktadır. Yaş, aile hikayesi, diyet, sigara, aşırı alkol tüketimi, az fiziksel hareket kolorektal kanser tümörlerinin oluşumda etkili olan başlıca risk faktörlerindendir. Kolorektal kanser sporadik ya da ailesel olarak gelişmektedir. Kalıtımsal olarak meydana gelen kolorektal tümörlerin gelişiminde, Ailesel adenomatöz poliposiz (FAP), Atenüe ailesel poliposiz (AFAP), Lynch sendromu (HNPCC), MYH ile ilişkili poliposiz (MAP) ve Hiperplaztik poliposiz gibi sendromlar rol oynamaktadır. Bu sendromlar tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %15' ini oluşmakta, bu kansere ait tümörlerin büyük çoğunluğu (% 80-90) sporadik olarak meydana gelmektedir(Ak,2013)

miRNA, yüksek oranlarda korunma altına alınmışDNA bölgelerinden kodlanan ama proteine translasyonu gerçekleşmeyen, ortalama 18-22 nükleotid uzunluğunda, küçük RNA molekülleri olarak tanımlanmaktadır. miRNA'lar hücre proliferasyonunda, farklılaşmasında ve ölümündeönemli görevler üstlenmektedir.

Çalışmamızda Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine başvuran, patolojik olarak kolorektal kanser teşhisi konmuş 6 hastadan alınan kontrol ve tümör dokuları mikroarray yöntemi kullanılarak tümör supressör miRNA'ların ekspresyonu yönünden karşılaştırılarak incelenmiştir.

Hastaların kontrol dokuları ve tümör dokularındaki miRNA'ların fold change değerlerine bakılarak up veya down regüle olan miRNA'lar belirlenmiştir. Kat değişim değerlerindeki değişimlerden yola çıkarak kontrol ve tümor dokularındaki ekspresyon değişimlerine göre tümör supressör miRNA'lar belirlenilmeye çalışılmıştır.

Kolon kanseri dokularındaki tümör supressör miRNA'ları belirlemek amacıyla microarray yöntemi kullanılmıştır. Mikroarray analizleri sonucunda kontrol ve tümörlü dokudan elde edilen kat değişim değerleri karşılaştırılarak tümör suppressor miRNA'lar belirlendi.

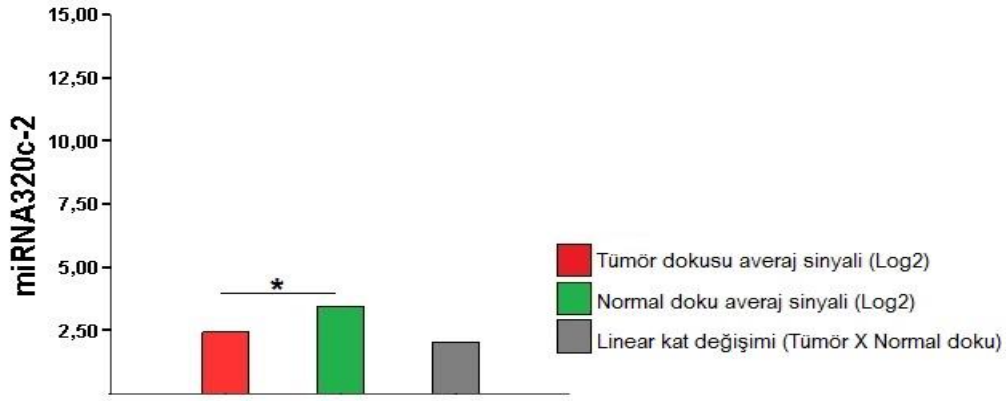
Hastalardan alınan kontrol ve tümörlü doku örnekleriyle yapılan çalışma sonucu belirlenen miRNA'lara özgü ortaya çıkan kat değişim değerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. miRNA transkriptlerinde down-regüle olan bazı miRNA'lar

NO	Tümör Supressör miRNA'lar	Tumor Bi-weightAvgSignal (log2)	Kontrol Bi-weightAvgSignal (log2)	FoldChange (linear) (Tumor vs. Kontrol)
1	hsa-mir-320c-2	2,43	3,45	-2,03
2	hsa-mir-520a	1,2	2,27	-2,11
3	hsa-mir-1298	1,23	2,48	-2,38
4	hsa-mir-635	1,93	3,29	-2,56
5	hsa-let-7f	10,84	12,24	-2,63
6	hsa-mir-548f-1	1,39	2,91	-2,86
7	hsa-mir-550-1	3,98	6	-4,06
8	hsa-mir-451	8,07	10,83	-6,78

4.1. miRNA-320c-2'nin Ekspresyon Profili

Çalışmada, miRNA 320c-2' nin mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.1); tümörlü dokularda (2.43) normal dokuya (3.45) göre daha düşük düzeyde ekspresyon gösterdiği ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (-2.03, $p<0.041$).

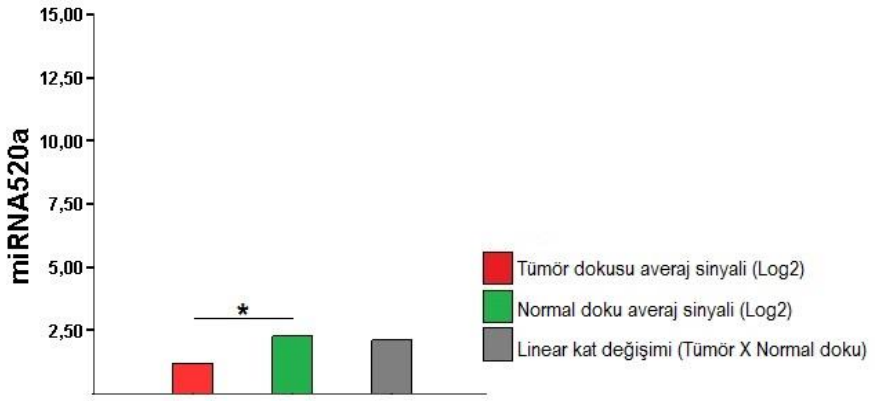


Şekil 4.1. miRNA-320c-2'nin tümörlü ve normal dokudaki linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* $p<0.05$)

4.2. miRNA-520a'nin Ekspresyon Profili

Hedef genin miRNA bağlanma bölgesindeki polimorfizmlerinmiRNA'ların hedef genlerini bağlama ve kanser riskini modüle etme yeteneğini değiştirebildiğini göstermiştir. PIK3CA'nın ekspresyonu, CRC hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde tespit edilmiştir, bu da PIK3CA'nın mRNA seviyelerinin SNP rs141178472 ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, PIK3CA 3'UTR' de bir miR-520a bağlanma bölgesi polimorfizmininrs14117847239 CRC'nin etiyolojisinde bir rol oynayabileceğine dair kanıt sağlamaktadır (Ding ve ark., 2015).

Çalışmamızda, miRNA-520a'nin mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.2); tümörlü dokularda (1.2) normal dokuya (2.27) göre daha düşük düzeyde ekspresyon gösterdiği ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (-2.11, $p<0.010$).



Şekil 4.2. miRNA-520'nin tümörlü ve normal dokudaki linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* $p<0.05$)

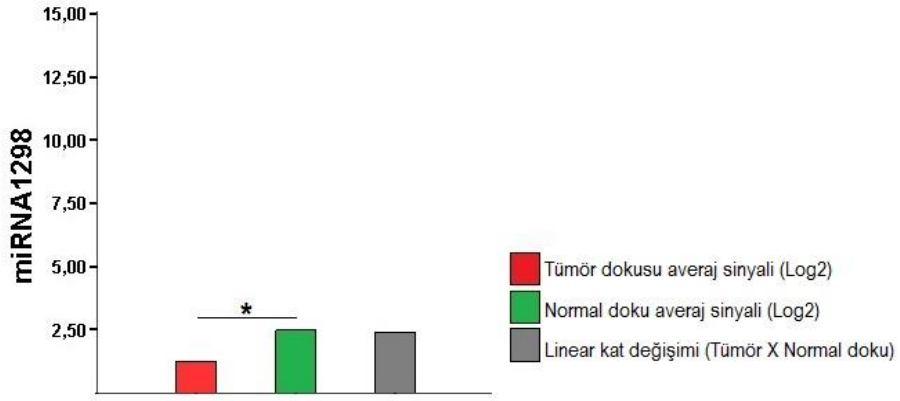
Çalışmamızdan miRNA-520a ile ilgili elde edilen veriler, yukarıda bildirilen çalışmaya parelel olarak miRNA-520a'nın kontrol dokularındaki yüksek ekspresyonundan dolayı tümör supresör bir miRNA olabileceğini desteklemektedir.

4.3. miRNA-1298'nin Ekspresyon Profili

MiRNA-1298, KRAS kaynaklı hücrelerin hem *in vitro* hem de *in vivo* büyümesini inhibe eden yeni bir miRNA'dır. FAK veya LAMB3'ünsusturulması, KRAS-güdümlü kanser hücrelerinde miR-1298 ekspresyonunun sentetik öldürücüetkilerini geri döndürürken, her iki proteinin birlikte ekspresyonu, miR-1298-kaynaklı hücrelerin ölümünükurtarmakta kritik bir öneme sahiptir. LAMB3 ekspresyonu mutant KRAS tarafından düzenlenmektedir. Klinik örneklerde, Onkogenik KRAS geni imzası olan akciğer kanseri hastalarındaLAMB3 ekspresyonu daha kötü sağ kalım ile korele bulunmuş ve bu hastalık için yeni bir adaybiyobelirteç olduğu anlaşılmıştır (Zhou ve ark., 2016).

Çalışmamızda, miRNA-1298'in mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.3); tümörlü dokularda (1.23) normal dokuya (2.48) göre daha düşük düzeyde ekspresyon

gösterdiği ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (-2.38, p<0.001).



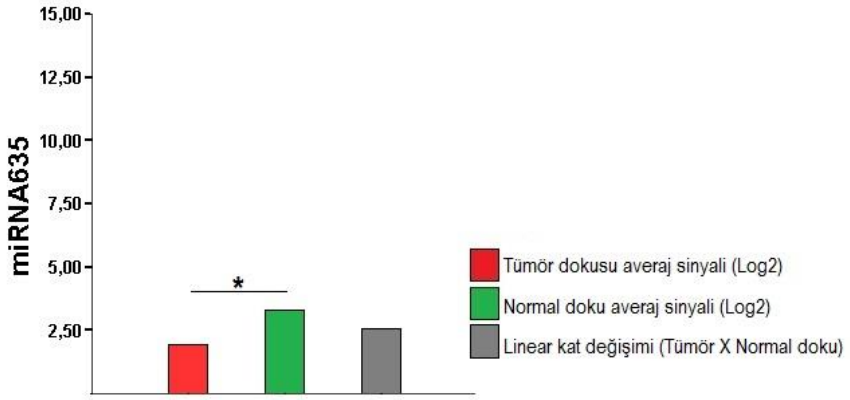
Şekil 4.3. miRNA-1298'in tümörlü ve normal dokudaki linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* p<0.05)

Çalışmamızdan miRNA-1298 ile ilgili elde edilen veriler, yukarıda bildirilen çalışmaya parelel olarak miRNA-1298'inn normal dokularındaki yüksek ekspresyonundan dolayı tümör supresör bir miRNA olabileceğini desteklemektedir.

4.4. miRNA-635'nin Ekspresyon Profili

Küçük hücreli akciğer kanserin'de miR-635'in potansiyel bir tümör baskılama işlevini bildirilmektedir. MiR-635 bir hücre istilası inhibitörü olarak tanımlanan ve diferansiyel olarak, normal ve kanserli dokularda ifade edilmiştir. Ayrıca, Ying Yang 1 (YY1) doğrudan hedef olabileceğini teyit olarak miR-635transfeksiyon siRNA aracılı YY1 demonte etkisini etkileyebilir endojen YY1 ifadesi önemli ölçüde azaltabilir. Bununla birlikte hem miR-635 transfeksiyonu hem de YY1 susturulması, NSCLC hücre invazyonunu hafifletebilir. miR-635 transfeksiyonu da ksenograft tümörlerinin büyümesini önemli ölçüde önlemektedir. Bu sonuca bağlı olarak NSCLC'de miR-635'in yeni bir tümör baskılayıcı rol üstlendiği söylenebilir (Zhang ve ark., 2016).

Çalışmamızda, miRNA-635'in mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.4); tümörlü dokularda (1.93) normal dokuya (3.29) göre daha düşük düzeyde ekspresyon gösterdiği ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (-2.56, $p<0.036$).



Şekil 4.4. miRNA-635'in tümörlü ve normal dokudaki linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* $p<0.05$)

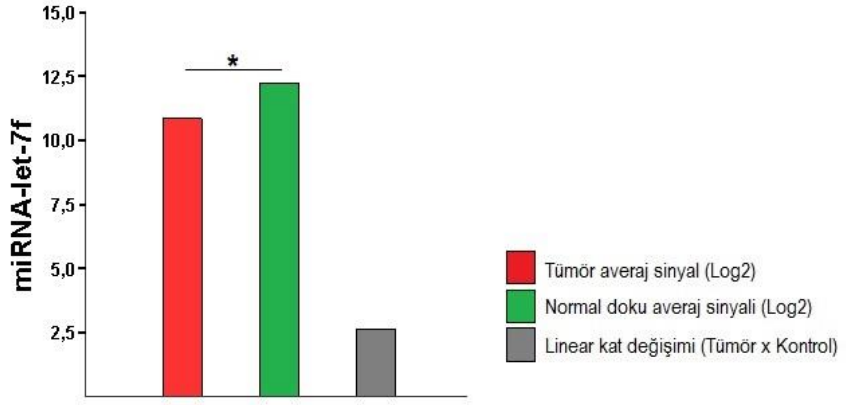
Çalışmamızdan miRNA-635 ile ilgili elde edilen veriler, yukarıda bildirilen çalışmaya parelel olarak miRNA-635'in normal dokularındaki yüksek ekspresyonundan dolayı tümör supressör bir miRNA olabileceğini desteklemektedir.

4.5. miRNA-let-7f'nin Ekspresyon Profili

İlk keşfedilen miRNA olanLet-7f aynı zamanda tümör baskılayıcı işlev gösteren ilk miRNA olarak da bilinmektedir. Let-7f' ninkolon kanserinde, genel olarak delesyona uğrayan bir kromozomal bölgenin içinde yer alması ve gen ifadesinde meydana gelen azalma sonucu onkogenik farklılaşmanında önüne geçmesi nedeniyle, tümör baskılayıcı bir miRNA olarak kabul edilmektedir (Calin ve Croce, 2006).

Çalışmamızda, let-7f' nin mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.5); tümörlü dokularda (10.84) normal dokuya (12.24) göre daha düşük düzeyde ekspresyon

gösterdiği ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (-2.63, p<0.003).

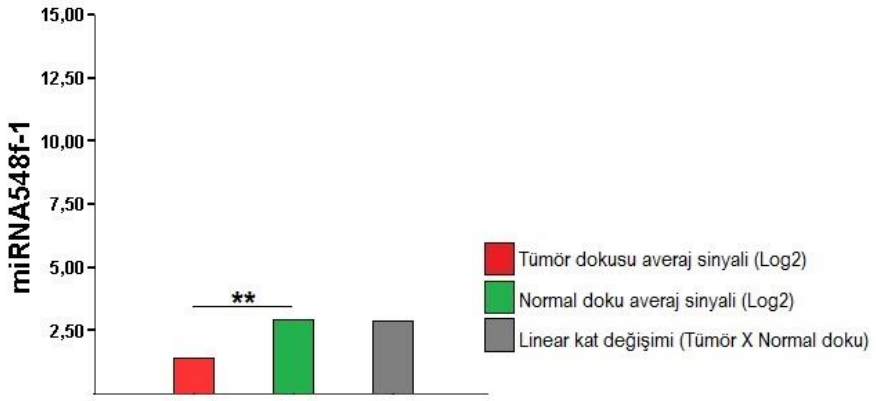


Şekil 4.5. miRNA-let-7'nin tümörlü ve normal dokudaki linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* p<0.05)

4.6. miRNA-548f-1'nin Ekspresyon Profili

Literatür araştırmaları sonucunda miRNA-548f-1 ile ilgili herhangi bir akademik bilgiye ulaşılamamıştır. Çalışmamız da bulunan miRNA-548f-1'in yeni bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, miRNA 548f-1'in mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.6); tümörlü dokularda (1.39) normal dokuya (2.91) göre daha düşük düzeyde ekspresyon gösterdiği ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak ileri seviyede anlamlı olduğu gözlemlenmiştir (-2.86, p<0.0009). Analiz sonucuna bağlı olarak yüksek seviyede anlamlı çıkan bu sonuç ışığında miRNA 548f-1'in çok güçlü bir tümör supresör miRNA rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

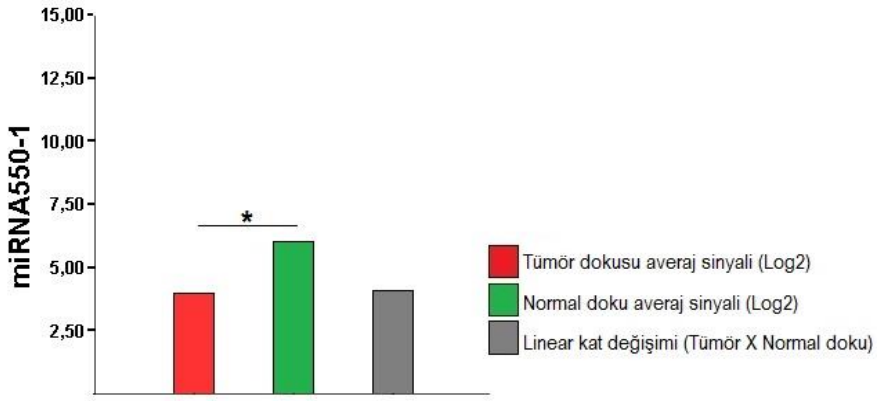


Şekil 4.6. miRNA-548f-1'in tümörlü ve normal dokudaki linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* *p<0.01)

4.7. miRNA-550-1'nin Ekspresyon Profili

Literatür araştırmaları sonucunda miRNA-550-1 ile ilgili herhangi bir akademik bilgiye ulaşılamamıştır. Çalışmamız da bulunan miRNA-550-1'in yeni bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, miRNA 550-1'in mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.7); tümörlü dokularda (3.98) normal dokuya (6) göre daha düşük düzeyde ekspresyon gösterdiği ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak da ileri derecede anlamlılık gösterdiği belirlenmiştir(-4.06, $p<0.025$). Eldeki istatiksel analizden yola çıkarak miRNA 550-1'in tümör supresör miRNA olabileceği ihtimali ortaya çıkmaktadır.

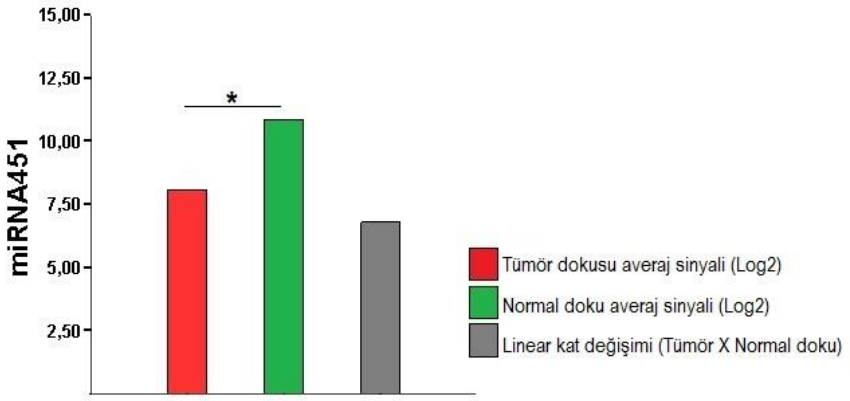


Şekil 4.7. miRNA-550-1'in tümörlü ve normal dokudaki linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* $p<0.05$)

4.8. miRNA-451'in Ekspresyon Profili

MikroRNA-451'in, insan kolon kanseri dokularında ve hücre dizilerinde (HCT116 ve HT29) önemli ölçüde aşağı regüle edildi ve kolon kanserinin Dukes aşaması ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir. Ywhaz miR-451'in bir aday hedef geni olarak ve FoxO3 nükleer birikimini inhibe ederek FoxO3'e bağlanarak tümör büyümesini uyarabilmektedir (Li ve ark., 2015).

Çalışmamızda, 451'in mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.8); tümörlü dokularda (8.07) normal dokuya (10.83) göre daha düşük düzeyde ekspresyon gösterdiği ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (-6.78, $p<0.048$).



Şekil 4.8. miRNA-451'in tümörlü ve normal dokudaki Linear kat değişimlerinin istatiksel analiz grafiği (* $p<0.05$)

Çalışmamızdan miRNA-451 ile ilgili elde edilen veriler, yukarıda bildirilen çalışmaya parelel olarak miRNA-451'in normal dokularındaki yüksek ekspresyonundan dolayı tümör supresör bir miRNA olabileceğini desteklemektedir.

5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Tümörlü ve normal dokudan eksprese olunmuş 8 tane miRNA belirlenmişti. Bu miRNA'ların normal ve tümör dokularında karşılaştırmalı analizleri sonucunda istatiksel olarak ileri düzeylerde anlamlılık ifade ettiğini tespit ettik. Dolayısıyla bu analiz sonuçlarından ve literatur taramalarından yola çıkarak kolon kanseri için tümör supresör miRNA'ların belirlenmesine çalışıldı. CRC' de dahil olmak üzere tüm kanserlerde miRNA seviyelerindeki değişiklikler sadece miRNA biyogenez mekanizmalarındaki değişikliklerden kaynaklanmadığı anlaşılmaktadı. Aynı zamanda epigenetik kontrol, transkripsiyon faktörleri veya mutasyona uğramış protein kontrolleri gibi sebeplere de bağlı olduğu gözlenmektedir. Bu durumda tümör baskılayıcı veya onkogenik etki gösterebilen miRNA'ların CRC'nin başlangıcına, ilerlemesine ve difüzyonuna katkıda bulanabileceğini söylemek mümkündür. Son zamanlarda, CRC'de anormal miRNA sentezlenmesinden sorumlu mekanizmaları anlamak için yapılan çalışmalarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

Sonuç olarak, miRNA'ların biyolojik belirteçlerinin klinik tanı, erken teşhis ve tedavisinde rol oynayabilmesi için daha hassas, hızlı ve etkili yöntemlerin ortaya çıkarılması için daha fazla çabaya ihtiyaç vardır. miRNA'lar CRCdahil olmak üzere tüm kanserlerin teşhis ve tedavisinde güçlü bir kaynak olabileceği aşikardır.

Çalışmada kanserli hastalardan alınan tümörlü dokularla normal dokulardaki miRNA'lardan mikroarray yöntemi kullanılarak analizi yapılan tümör supresör miRNA'lardan miRNA-320c-2, miRNA-520a, miRNA-1298, miRNA-635, miRNA-let-7f, miRNA-550-1, miRNA-451'nın ekspresyonlarının istatiksel olarak anlamlı olduğu belirlenirken miRNA-548f-1ekspresyon düzeyinin ileri derecede istatiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi.

miRNA'lar kolorektal kanser tanısında ve prognozu göstermede iyi biyolojik belirteç olabilme kapasitesine sahiptirler. Kolorektal kanseri erken evrede saptamada miRNA ile ilgili çalışmalara ciddi şekilde ihtiyaç duyulmaktadır. Modern tıbbın

kaydettiği tüm gelişmelere rağmen kanser maddi ve manevi olarak günümüzün en önemli sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bilindiği üzere kanser ve diğer birçok hastalık kısmen kalıtsal veya çoğunlukla vücut hücrelerinde sonradan oluşan mutasyonların bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Kanser, düzensiz hücre büyümesi, çoğalması ve bulunduğu noktadan başka doku veya organlara yayılabilen önemli bir hastalık grubudur.

Çalışmamızın konusu kolon kanserlerinin gelişimi ve ilerlemesinde transkripsiyonel değişikliklerin belirlenmesi ve elde edilecek verilere dayalı olarak etkin tedaviye katkı sağlama olarak belirlenmiştir. Bu konu kapsamında; kanseri önlemede güvenirliliği yüksek erken tanı ve kişiye özgü özel tedavi seçeneklerinin oluşturulması oldukça önem arz etmektedir.

Her ne kadar CRC'nin gelişiminin anlaşılmasına yönelik olarak dünya çapında pek çok araştırma sürdürülüyor olmasına rağmen henüz bu değişimin moleküler temelinin tam olarak anlaşılmasından uzak bir noktada bulunmaktayız. miRNA temelli kanser tedavisi çalışmaları sonucunda tümör süpressör miRNA'ların tespitiyle beraber miRNA'ların az sentezlendiği CRC hastalarına bunu dışarıdan takviye ederek tümör gelişimi durdurulabilir düşüncesi önemli bir seçenektir ve bu alanda bilime katkı sağlayacağımızı ümit ediyoruz.

Kolon kanserlerinin gelişimi ve ilerlemesinde transkripsiyonel değişikliklerin araştırılmasını konu alan araştırmamızın farklı ve yeni olan yönleri ile literatüre katkıları şu şekilde özetlenebilir.

1. Kolorektal kansere özgü yeni miRNA markerların keşfedilmesi yoluyla bu alanda yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlaması durumunda,

2. Çalışmanın devamında kolorektal kanser tedavisine yönelik olarak geliştirilebilecek sentetik oligonükleotidler ile onkogenik miRNA'ların sentezini durdurarak tümör gelişimini kısmen de olsa kontrol altına alınması,

3. Tespit edilecek yeni biyobelirteçler ile anjiyogenesis, metastazis ve ilaçlara direnç mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlaması,

4. Bu çalışmanın devamı niteliğinde metodolojik olarak önerdiğimiz yöntemlerin kullanılması ile, güncel ve özgün bilimsel verilerin üretilmesi sonucukolon kanserinin moleküler temelinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlaması,

5. Çalışmamızın kanser biyolojisinde uluslararası öneme sahip yüksek etki faktörlü dergilerde/konferanslarda yayınlanması.

Eski yöntemlerde kanser teşhisi ve sınıflandırması klinik olarak tarama testleri (endoskopi bilgisayar destekli tomografi), morfolojik olarak ve biyokimyasak parametrelerle teşhis yapılırken bazı kanser türleri de metastazdan önce teşhis edilememektedir. Kolon kanserinin teşhisinde klinik tarama testleri olarak dışkıda gizli kan testi, Fleksibl sigmoidoskopi, bilgisayarlı tomografi, kolonografi (kolonoskopi) gibi testler kullanılmaktadır. Ancak toplumsal taramalarda kullanılan bu testlerin erken tanı konusunda duyarlılık ve güvenirlilik seviyesi düşüktür. Kullanacağımız GeneChip teknolojisi kanserin moleküler aşamasında, belki de daha başlamadan, iyi huylu olmasına rağmen metastaz yapabilecek tümörlerin teşhis edilmesine ve sonuçta tedavisine imkan sağlamaktadır.

Sonuçta mikroarray yönteminin en önemli özelliklerinden biri, küçük alanlarda çok fazla miktardakigenomik incelemelerin yapılmasına ortam hazırlamasıdır. Küçük bir alanda binlerce genin ekspresyon seviyelerindeki değişimler aynı zamanda tek bir çalışma ile tespit edilebilmektedir. Aynı zamanda bu teknik ile küçük okuyucu bir cihaz yardımıyla az oranlardaki örnek hacimlerinin kullanılmasıyla tek bir deneyde mikroarraylerin, SNP'lerde (tekli nükleotid polimorfizmi), hastalıklı genlerin ve normal genlerin ekspresyonlarının (mRNA'daki artışı ve azalışı) hızlı bir şekilde çalışılmasına imkan sağlaması ve böylece hastalığın tanı ve teşhisinde çok sayıda hastalık ve hastalığa neden olan etken arasından da ayırıcı olan bir tanının yapılmasına ve tedavi sonucunun değerlendirilmesinde anahtar bir rol oynayacaktır.

KAYNAKLAR

AÇIKGÖZ, A., ÇEHRELİ, R., ELLİDOKUZ, H., 2011. Kadınların Kanser Konusunda Bilgi ve Tutumları ile Erken Tanı Yöntemlerine Yönelik Davranışları, DEÜ. Tıp Fakültesi Dergisi, 25(3): 145 – 154.

AIELLO, M., VELLA, N., CANNAVO, C., SCALISI, A., SPANDIDOS, D. A., TOFFOLI, G., BUONADONNA, A., LIBRA, M., STIVALA, F., 2011. Role of Genetic Polymorphisms and Mutations in Colorectal Cancer Therapy. Molecular Medicine Reports, 4: 203-208.

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

AKAR, N., 1999. Klinik Moleküler Patolojiye Giriş. Ankara: Antıp AŞ Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar, 13-27.

ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A., LEWIS, J., ROBERTS, K., RAFF, M., WALTER, P., 2003. Essential Cell Biology.Molecular Biology of the Cell, 1616s.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. 2007. Molecular Biology of the Cell.Garland Science, New York, 351–352s.

ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A., LEWIS, J., ROBERTS, K., RAFF, M., WALTER, P. 2003. Essential Cell Biology, 2. Baskı, Garland Publishing, New York, 58.

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013. CancerFacts&Figures, Atlanta, 64s. https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/5102,saglikistatistikleriyilligi2010pdf.pdf.

ANONİM, 2010. Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2010. T.C. Sağlık Bakanlığı, Ankara, 172s.

ANONİM, 2013a.Türkiye İstatistik Kurumu, Ölüm Nedeni İstatistikleri. [http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=15847].

ANONİM, 2013b.World Health Organization, Treatment of Cancer [http://www.who.int/cancer/treatment/en/], Switzerland.

ANONİM, 2014a. Kanserden Korunma. http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html, Ankara.

ANONİM, 2014b. Kanser Önlenebilir Bir Hastalıktır. http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/45-kalin-bagirsak-kanseri.html, Ankara.

ANONİM, 2016. Cancer Facts and Statistics | American Cancer Society. www.cancer.org/acs/groups/content/documents/document/acspc-042280, Atlanta.

ANONİM, 2017. Kolon Kanseri Risk Faktörleri, Kolon Kanseri Belirtileri, Kolon Kanseri Teşhisi. https://www.memorial.com.tr/saglik-rehberleri/kolon-kanseri, İstanbul.

BABAK, T., ZHANG, W., MORRIS, Q., BLENCOWE, B. J., HUGHES, T. R., 2004. Probing Micrornas With Microarrays: Tissuespecificity And Function Alinference. Rna-A Publication of theRnaSociety, 10: 9-1813.

BARNABAS, N., MORAES, R., CALAF, G., ESTRADA, S., RUSSO, J., 1995. Role of P53 İn Mcf-10F Cell Immortalization and Chemically-Induced Neoplastic Transformation. International Journal of Oncology, 7: 1289-96.

BARTEL, D. P., 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell, 116: 281-297.

BAŞARAN, E., ARAS, S., CANSARAN-DUMAN, D., 2010. Genomik, Proteomik, Metabolomik Kavramlarına Genel Bakış ve Uygulama Alanları. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 67: 85-96.

BAYKARA, O., 2016. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5(3): 154-165.

BAYRAK, O. F., 2010. İnsan Kordomalarında Ekspresyon Farklılıkları Olan Mikrorna'ların ve İlgili Transkriptlerin İncelenmesi ve Bunların Kordomaların Patogenezindeki Öneminin Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya, 161s.

BERNSTEIN, E., CAUDY, A. A., HAMMOND, S.M., HANNON, G. J., 2001. Role For A Bidentateribo Nuclease in the initiation Step of RNA İnterference. Nature, 409: 363-366.

BONFRATE, L., ALTOMARE, D. F., LENA, M. D., TRAVAGLIO, E., ROTELLI, M. T., LUCA, A. D., 2013. "Microrna in Colorectal Cancer: New Perspectives For Diagnosis, Prognosis and Treatment", J. Gastrointestin Liver Dis., 3: 311-320.

BOYLE, P., and LEON, M. E., 2002. "Epidemiology of Colorectal Cancer", Br. Med. Bull, 64: 1-25.

BRESALIER, R. S., FELDMAN, M., FRIEDMAN, L. S., SLEISENGER M. H., 2002. Malignant Neoplasms of Thelar Geintestine. In Editors. Gastrointestinal and Liver Disease, Pathophysiology, Diagnosis, Management. Section ten. Small and large intestine.7th ed. Philadelphia. Saunders, 62-2215.

BURGER, A., and ABRAHAM, D. J., 2003. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery Volume 5: Chemotherapeutic Agents. in: Molecular Biology of Cancer, 5568s.

ÇAĞLAR, K., 2006. Çocuklarda Kanser Hastalığı 1. [http://www.drbndh.com/arsiv/kanser.html] Erişim Tarihi: 09.05.2016

CALIN, G. A., and CROCE, C. M., 2006. Microrna Signaturesin Human Cancers. Natrev Cancer, 6(11): 857-66.

CALIN, G. A., DUMITRU, C. D., SHIMIZU, M., BICHI, R., ZUPO, S., NOCH, E., 2002. Frequent deletions and Down regulation of micro- RNA Genes Mir15 and Mir16 at 13q14 in Chronic lymphocytic leukemia. ProcNatl Acad Sci USA, 99(24): 15524-29.

CALIN, G. A., FERRACIN, M., CIMMINO, A., DI LEVA, G., SHIMIZU, M., WOJCIK, S. E., IORIO, M. V., VISONE, R., SEVER, N. I., FABBRI, M., IULIANO, R., PALUMBO, T., PICHIORRI, F., ROLDO, C., GARZON, R., SEVIGNANI, C., RASSENTI, L., ALDER, H., VOLINIA, S., LIU, C. G., KIPPS, T. J., NEGRIN,I M., CROCE, C. M., 2005.A Microrna Signature Associated with Prognosisandp, Rogression in Chronic Lymphocytic Leukemia. New England journal of Medicine, 353: 1793-801.

ÇELİK, D., KOŞAR, P., ve ÖZÇELİK, N., 2013. Mikrorna'lar ve Kanser İle İlişkisi S.D.Ü. Tıp Fak. Dergisi, 20(3): 21-127.

CIMMINO, A., CALIN, G. A., FABBR, M., 2005. miR-15 and miR-16 İnduce Apoptosis by Targeting BCL2. ProcNatl Acad Sci USA, 102:13944–13949 84.

JIANG, J. M., LEE, E. J., GUSEV, Y., SCHMITTGEN, T. D., 2005. Real-Time Expression Profiling of Microrna Precursors in Human Cancer Cell Lines. Nucleic Acids Research, 33: 5394–5403.

CONCEPCION, C. P., BONETTI, C., VENTURA, A., 2012. The Microrna-17-92 Family of MicroRNA Clusters in Development and Disease. Cancer J., 18: 262-267.

CORTE, H., MANCEAU, G., BLONS, H., LAURENT-PUIG, P., 2012. Microrna and Colorectal Cancer. Digestive and Liver Disease, 44: 195-200.

COWLAND, J. B., HOTHER, C., GRONBEAK, K., 2007. MicroRNA and Cancer. APMIS, 115: 1090-106.

CROSS, A. J., FERRUCCI, L. M., RISCH, A., 2010. A Large Prospective Study of Meat Consumption and Colorectal Cancer Risk: An İnvestigation of Potential Mechanisms Underlying This Association. Cancer Research, 70: 2406.

DESCAMPS, S., and PRIGENT, C., 2002. Protein Kinases Aurora, Centrosome Amplification, Aneuploidy, and Cancers. M S-Medecine Sciences, 18: 474-80.

DILEVA, G., GAROFALO, M., CROCE, C. M., 2014. MicroRNAs in Cancer. Annu. Rev. Pathol. Mech. *Dis.*, 9: 287-314.

DNG, L., JIANG, Z., CHEN, Q., QIN, R., FANG, Y., LI, H., 2015.A Functional Variant at Mir-520a Binding Site in PIK3CA Alters Susceptibility To Colorectal Cancerin A Chinese Han Population, 252-373.

DRUSCO, A., NUOVO, G. J., ZANESI, N., DI LEVA, G., PICHIORRI, F., VOLINIA, S., FERNANDEZ, C., ANTENUCCI, A., COSTINEAN, S., BOTTONI, A., ROSITO, I. A., LIU, C., BURCH, A., ACUNZO, M., PEKARSKY, Y., ALDER, H., CIARDI, A., ANDCROCE, C. M., 2014. Microrna Profiles Discriminateamong Colon Cancer Metastasis. *PLoSOne*, 9: 1-10.

ERTÜRK. E., 2012. Meme Kanseri Gelişiminde miRNA'Ların Rolünün Araştırılması. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 121s.

ESQUELA-KERSCHER, A., and SLACK, F. J., 2006. Oncomirs – Micrornas With A Role in Cancer. NatRev Cancer, 6: 259-269.

FELTON, J. S., 1997. The heritage of Bernardino Ramazzini. Occup Med (Lond), 47: 167-79.

FRANCO, S. D., TODARO, M., DIELI, F., STASSI, G., 2013. Colorectal Cancer Defeating Challenge Accepted. Molecular Aspects of Medicine, in Press, 61-81.

GREGORY, R. L., CHENDRIMADE, T. P., COOCH, N., SHIEKHATTAR, R., 2009. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Post Transcriptional Gene Silencing. Cell, 123: 40-65.

GÜRSOY, S., ER, O., CANÖZ, O., GÜVEN, M., BAŞKOL, M., GÜVEN, K., ÖZBAKIR, O., YÜCESOY, M., 2003. Kayseri ve Yöresinde Kolon Kanserlerinin Özellikleri. Akademik Gastroenteroloji Dergisi, 2(2): 60-63.

HAHN, W. C., and WEINBERG, R. A., 2002. Modelling the Molecular Circuitry Of Cancer. Nature Reviews Cancer; 2: 331-41.

HAMMONDS, M., 2006. Micrornas As Oncogenes. Curr Opin Genet Dev., 16: 4–9.

HERMSEN, M., POSTMA, and C., BAAK, J., 2002. Colorectal Adenoma Tocarcino Maprogressi On Follow Smultiple pathways Of Chromosomal instability. Gastroenterolgy, 123: 1109-1119.

HOWLADER, N., NOONE, A. M., KRAPCHO, M., GARSHELL, J., NEYMAN, N., ALTEKRUSE, S. F., KOSARY, C. L., YU, M., RUHL, J., TATALOVICH, Z.,

CHO, H., MARIOTTO, A., LEWIS, D. R., CHEN, H. S., FEUER, E. J., CRONIN, K. A., 2013.Seer Cancer Statistics Review, National Cancer Institute, 1975-2010.

HUNT, J. M., 2003. Cancer Nursing: Principles and Practice, 4th Edition. Journal of Advanced Nursing, 31-732.

İPEKDAL, K., 2006. Microarray Teknolojisi Evrimsel ve Ekolojik Çalışmalarda Kullanımı. Proteomik ve Genomik, 16s.

JEMAl, A, SIEGEL, R., WARD, E., HAO, Y., XU, J., THUN, M. J., 2009. Cancer Statistics. CA Cancer J Clin, 59: 225-249.

KARAGÜN, B. S., ANTMEN, B., ŞASMAZ, I., KILINÇ, Y., 2014. MikroRNA ve Kanser. Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 12(1): 45-56.

KONAÇ, E., ÖNEN, H. I., SÖZEN, S., 2010. Üroonkolojide Mikrorna'ların Yeri Ve Önemi. Üroonkoloji Bülteni, 1: 3-13.

KORKMAZ, E., 2010. Kanser ve Kanser Hastalarına İlişkin Tutumların İncelenmesi. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Ens, Yüksek lisans Tezi, İstanbul, 149s.

KOZOMARA, A., and GRIFFITHS-JONES, S., 2014. MirBase Annotating High Confidence Microrna Susing Deep Sequencing Data. NucleicAcid Research, 68–73.

LEE, R. C., FEINBAUM, R. L., AMBROS, V., 1993. The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encoders SmallRNAs with Antisense Complementari Tyto Lin-14. Cell, 75(5): 843-54.

LEE, Y., AHN, C., HAN, J., CHOI, H., KIM, J., LEE, J., PROVOST, P., RADMARK, O., KIM, S., KIM, V. N., 2003. The Nuclear RNAse III Drosha İnitiates Microrna Processing. Nature; 425: 415-419.

LEWIN, B., 2004. Genes VIII, PearsonPrenticeHall, ABD, 1003s.

LI, Y., WANG, J., DAI, X., ZHOU, Z., LIU, J., ZHANG, Y., LI, Y., HOU, Y., PANG, L., WANG, X., WANG, C., HAO, Z., ZHANG, Y., JIANG, J., CHENG, H., YU, D., 2015. Mir-451 Regulates Foxo3 Nuclear Accumulation Through Ywhaz in Human Colorectal Cancer. Amerıcan Journal of Translational Research, 7(12): 2775-2785.

LIANG, R. Q., LI, W., LI, Y., TAN, C. Y., LI, J. X., JIN, Y. X., 2005. An Oligonucleotide Microarray For Microrna Expression Analysis Based on Labeling RNA with Quantum Dotandnano Gold Probe. Nucleic Acids Research, 33(2): 17.

LIU, C. G., CALIN, G. A., MELOON, B., GAMLIEL, N., SEVIGNANI, C., FERRACINM., 2014. Anoligonucleotid Emicrochipfor Genome-Wide Microrna Profiling in Human and Mousetissues. Proceedings of theNational Academy of Sciences of the United States of America, 101: 4-9740.

LORIO, M. V., FERRACIN, M., LIU, C. G., VERONESE, A., SPIZZO, R., SABBIONI, S., MAGRI, E.PEDRIALI, M.,FABBRI,M., CAMPIGLIO,M., M ENARD,S., PALAZZO,J.P., ROSENBERG,A., MUSIANI,P., VOLINIA,S., NENCI,I., GEORGE CALIN,G. A., QUERZOLI, P., NEGRINI, M., CROCE, C. M., 2005. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. Cancer Res, 65: 70-7065.

LU, J., GETZ, G., MISKA, E. A., ALVAREZ-SAAVEDRA, E., LAMB, J., PECK, D., 2005. Microrna Expression Profiles Classify Human Cancers. Nature, 435: 834-8.

LUND, E., GUTTINGER, S., CALADO, A., DAHLBERG, J. E., KUTAY, U., 2004. Nuclear Export Of Microrna Precursors. Science, 303: 95-98.

MANSI, J. L., SMITH, I. E., WALSH, G., SINNETT, H. D., MCKINNA, J. A., 1989. Primary Medical Therapy in Operable Breast Cancer. British Journal of Cancer, 60: 448.

MOSAKHANI, N., LAHTI, L., BORZE, I., KARJALAINEN- LINDSBERG, M. L., 2012. Microrna Profiling Predicts Survival in Anti-EGFR Treated Chemorefractory Metastatic Colorectal Cancer Patients with Wild-Type *KRAS* And *BRAF*, University of Arizona Tuscon, 545-551.

NELSON, P. T., BALDWIN, D. A., OBERHOLTZER, J. C., MOURELATOS, Z. A., 2004. Microarray-Based Method For Study İngmicro-RNA (Mirna) Expression. Journal of Neuro Pathology and Experimental Neurology, 63: 301-520.

NELSON, P. T., BALDWIN, D. A., SCEARCE, L. M., OBERHOLTZER, J. C., TOBIAS, J. W., MOURELATOS, Z., 2004.Microarray Based, High-Throughput Gene Expression Profiling of Micrornas. Nature Methods, 1: 61-155.

NUTTON, V., 1988. Cnidian Medicine, Pt 2, A Further Analysis of Level-A in the Pseudo-Hippocratic Treatisesde Natura Muliebri and Muliebribus 1-2- German - Grensemann, H. Classical Review, 38: 454.

OKYAY, P., 2013. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri Medikal Onkoloji Dergisi Kolorektal Kanser Özel Sayı, 6(3): 1-5.

PEHLIVAN, S., 2007.Tıpta Moleküler Genetik Tanı. Gaziantep Üniv. Tıp Fak, 1:172.

PRITCHARD, C. C., and GRADY, W. M., 2010. Colorectal Cancer Molecular Biology Moves İnto Clinical Practice. William M Grady, Fred Hutchinson Cancer Research Center, 60: 116-129.

RATHER L. J., 1957. Rudolph Virchow and Scientific Medicine. AMA Arch Intern Med, 100: 14-1007.

ROTHSCHILD, S. L., 2014. Tümör Supresör MikroRNA. Biomed central, 2-7.

RUSSELL, S., MEADOWS, L. A., RUSSELL R. R., 2009. Microarray Technology in Practice. Academic Press, 101s.

SARACLI, M. A., 2007. DNA CHIP Teknolojisi Ve Mikolojide Uygulama Alanları Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikoloji Bilim Dalı, Ankara, 181-184.

SATHANANTHAN, A. H., RATNASOORIYA, W. D., SILVA, A., RANDENIYA, P., 2006. Rediscovering Boveri's Centrosome in Ascaris İts İmpact on Human Fertility and Development. Reproductive Biomedicine Online,12: 70-254.

SAYDAM, F., DEĞİRMENCİ, I., ve GÜNEŞ, H. V., 2011. Mikro RNA'lar ve kanser. Dicle Medical Journal; 38(1): 20-113.

SCHENA, M., SHALON, D., RONALD, W., PATRICK, D., BROWN, O., 1995. Source Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray Author. Science, New Series, 467-470.

SCHETTER, A. J., OKAYAMA, H., HARRIS, C. C., 2012. "The Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer", Cancer J., 18: 244–252.

SEYDEL, G. S., 2007. Hemoglobinopatilerin Mikroarray Yöntemiyle Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 88s.

SEYDEL, G. S., ve AKSOY, K., 2009. Onkogen ve Tümör Supressör Gen Olan miR-NA'ların Özellikleri ve Kullanım Alanları, 18: 1.

SHI, X., TANG, C., ZHOU, D., ZHAO, H., LU, Z., 2010. Multiplex Detection of Cpg Methylation Using Microarray Combining with Target-Selection-Padlock Probe. Clinica Chimica Acta. 411: 1187-1194.

SIEGEL, R., NAISHADHAM, D., JEMAL, A., 2012.Cancer Statistics, Cancer J. Clin. 62: 10-29.

SIEGEL, R., NAISHADHAM, D., JEMAL, A., 2013. Cancer Statistics, 2013. CA: A Cancer Journalfor Clinicians, 63: 11-30.

SLABY, O., SVOBODA, M., FABIAN, P., SMERDOVA, T., KNOFLICKOVA, D., BEDNARIKOVA, M., 2008. Altered Expression Of Mir-21, Mir-31, Mir-143 and Mir-145 Srelated To Clinico Pathologic Features of Colorectal Cancer. Oncology, 72: 397-402.

STEPHEN, H., and STOUGHTON, R. B., 2002. The Magic of Microarrays. Scientific American, 34-41.

THOMAS, J., OHTSUKA, M., PICHLER, M., LING, H., 2015. MicroRNAs: Clinical Relavace in Colorectal Cancer. İnternational Journal of Moleculer Sciences, 28063–28076.

THOMSON, J. M., PARKER, J., PEROU, C. M., HAMMOND, S. M., 2004. Acustom Microarray Platform Foranalysis Of Microrna Gene Expression. Nature Methods, 1: 47-53.

TUNCER, M., 2007. Kanserin Ülkemiz ve Dünyadaki Önemi, Hastalık Yükü ve Kanser Kontrol Politikaları. Türkiye'de Kanser Kontrolü içinde Ed: Tuncer M., Sağlık Bakanlığı, Ankara, 5-7.

TUNCER, M. E., 2014. Dizilim Verisinden Mikrorna Fonksiyon Tahmini. Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 112s.

WEINER, D. M., 2003. Microarray Technologies in Target Validation and Drug Discovery. Microarray Methods and Applications, 4(3): 251–256.

WESTERMEIR, R., 1997. Electrophoresis in Practice: A Guide to Methonds

YAROĞLU, H., GÖRÜR, A., AYAZ, L., FİDANCI, S., AKBAYIR, S., ÜNAL, N., KAPLAN, E., SERİN, M. S., BUĞDAYCI, R., ATEŞ, N., GÜMÜŞ, L.T., 2011. Mersin İlindeki Sağlıklı Bireylerde mikroRNA Ekspresyon profili. Mersin Üniv. Sağlık Bilim Derg.4(3): 25-29.

ZAMANİ, A. G., ve ZAMANİ, A., 2013. Mikrorna'lar Ve Akciğer Kanseri, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Türkiye Türk Toraks Dergi, 61(1): 57-62.

ZHANG, B., PAN X., COBB G. P., ANDERSON, T. A., 2006. MicroRNAs as Ongogenes and Tumor Suppressors. Dev Biol, 289: 3–16.

ZHANG, H., KOLB, F. A., BRONDANI, V., BILLY, E., FILIPOWICZ, W., 2002. Dicer Preferentially Cleavesds RNAs at Their Temrini With Out A Requirementfor ATP. EMBO J, 21: 5875-5885.

ZHOU, Y., DANG, J., CHANG, K. Y., YAU, E., AZA-BLANC, P., MOSCAT J., RANA, T. M., 2016. Mir-1298 İnhibits Mutant KRAS-Driven Tumor Growth by Repressing FAK and LAMB3. Cancer Research, 76(19): 5777–5787.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad Soyad **:** Emine TEKER

Uyruğu **:** T.C.

Doğum Yeri ve Tarihi **:** 22.09.1989

Telefon **:** 05425609546

E- mail **:** eminetkr63@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı İlçe/İl**		**Bitirme Yılı**
Lise	:	Kız Lisesi	Eyyübiye/ŞANLIURFA	2009
Üniversite	:	HarranÜnv, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	Haliliye/ŞANLIURFA	2014
Yüksek Lisan	:	HarranÜnv, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı	Haliliye/ŞANLIURFA	2018

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl:	**Kurum:**	**Görevi:**
2017-	Harran Üni. Tıp Fak. Araş. ve Uyg. Hastanesi	Uzm. Biyolog

UZMANLIK ALANI **:** Fen, Moleküler Biyoloji ve Genetik

YABANCI DİLLER **:** İngilizce