

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROSTAT KANSERİ HASTALARINDA KAN VE İDRAR ÖRNEKLERİNDE
MİKRORNA DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevde HASANOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Nur ÖZTEN KANDAŞ

OCAK 2018

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROSTAT KANSERİ HASTALARINDA KAN VE İDRAR ÖRNEKLERİNDE
MİKRORNA DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Sevde HASANOĞLU
160305009**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Nur ÖZTEN KANDAŞ

OCAK 2018

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 160305009 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Sevede HASANOĞLU, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "Prostat Kanseri Hastalarında Kan ve İdrar Örneklerinde MikroRNA Düzeylerinin Karşılaştırılması" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Yrd.Doç.Dr. Nur ÖZTEN KANDAŞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof.Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç.Dr. Nagehan ERSOY TUNALI
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Teslim Tarihi : 11 Aralık 2017
Savunma Tarihi : 19 Ocak 2018



Kıymetli Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez çalışmam sürecinde benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Nur Özten Kandaş'a

Örnek toplamam konusunda desteklerini esirgemeyen Dr. Yunus Kayalı ve Msc. Eray Metin Güler'e

Tezimin her aşamasında laboratuvar imkanlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Ziya Doymaz ve aynı laboratuvarda desteklerini hep hissettiğim Msc. Elif Karaaslan, Msc. Merve Yazıcı, Msc. Nesibe Selma Çetin ve Mol. Bio.Filiz Güney'e

Deneysel çalışmalarda ve istatistiksel değerlendirmesinde yardımlarından ötürü Dr. Emrah Yücesan'a

Yüksek Lisansa başladığım günden bu yana desteklerini hep yanımda hissettiğim değerli arkadaşlarım Msc. Beyza Göncü ve Msc. Sezen Atasoy'a

Eğitim hayatım boyunca destekçim olan kıymetli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 9.2015/4 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Aralık 2017

Sevde HASANOĞLU
(Moleküler Biyolog)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Sevde HASANOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Prostat Bezi	3
2.2 Prostat Kanseri	3
2.2.1 Prostat kanseri epidemiyolojisi	3
2.2.2 Prostat kanseri tanısı	4
2.2.3 Prostat kanseri patolojisi	4
2.3 Epigenetik	6
2.3.1 Kodlanmayan RNA'lar	7
2.3.2 MikroRNA'lar	7
2.3.3 MikroRNA'ların biyogenezi.....	8
2.4 MikroRNA'lar ve Kanser	9
2.4.1 MikroRNA'lar ve prostat kanseri	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1 Malzemeler.....	13
3.2 Cihazlar	13
3.3 Çalışma Materyali	13
3.4 Total RNA İzolasyonu	14
3.4.1 İdrardan total RNA izolasyonu	14
3.4.2 Serumdan total RNA izolasyonu.....	15
3.4.3 Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve kalitesinin tayini	16
3.5 Mikroarray.....	16
3.6 cDNA Sentezi.....	16
3.6.1 Agaroz jel elektroforezi.....	17
3.6.2 %2'lik agaroz jel hazırlama	17
3.6.3 Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve kalitesinin tayini	17
3.7 Real Time PCR	17

3.8 İstatiksel Analiz.....	18
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	19
4.1 Serum ve İdrar Örneklerinden Total RNA İzolasyonu	19
4.2 Mikroarray Analiz Sonuçları	21
4.3 Serum ve İdrar Örneklerinde Ortak Olarak Bulunan MikroRNA'lar.....	28
4.4 Real Time PCR Bulguları	28
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR	35
EKLER.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	47



KISALTMALAR

Ago: Argonaute proteini
BPH: Selim Prostatik Hiperplazi
cDNA: Komplementer DNA
DRE: Dijital Rektal Muayene
gr: Gram
mA: Miliamper
miRNA: MikroRNA
ml: Mililitre
ncRNA: KodlanmayanRNA'lar
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIN: Prostatik İntraepitelyal Neoplazi
pre-miRNA: Prekürsör MikroRNA
pri-miRNA: Primer MikroRNA
PSA3: Prostat Kanser Antijen 3
RISC: İndüklenen Susturma Kompleksi
RNA: Ribonükleik Asit
snRNA: Küçük Nükleolar RNA
TBE: Tris-BorikAsit-Etilen Diamin Tetra Asetat
UV: Ultraviyole
V: Voltaj
µL: Mikrolitre

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: TarBase'e göre kanserle ilişkili olarak en iyi tanımlanmış miRNA'lar ve hedefleri.....	10
Tablo 3.1: cDNA sentezi karışım miktarları.....	16
Tablo 3.2: Real time PCR karışım miktarları.....	18
Tablo 3.3: Real time PCR reaksiyon aşamaları.....	18
Tablo 4.1: Hasta ve kontrol grubu idrar ve serum örneklerine ilişkin RNA saflık ve konsantrasyon değerleri.....	19
Tablo 4.2: İdrar örneklerinde tespit edilen miRNA'lar ve kontrol grubuna kıyasla ekspresyon değişimleri.....	21
Tablo 4.3: Serum örneklerinde tespit edilen miRNA'lar ve kontrol grubuna kıyasla ekspresyon değişimleri.....	25
Tablo 4.4: Serum ve idrar örneklerinde ortak olarak ekspresyonu değişen miRNA'lar.....	28

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Prostatik adenokarsinomların histopatolojik paternlerinin diyagram gösterimi	6
Şekil 2.2: miRNA biyogenezi.....	9
Şekil 4.1: İdrar örneklerinde hasta ve kontrol grubu için miRNA ekspresyonlarındaki değişimin Scatter Plot ile gösterimi.....	23
Şekil 4.2: İdrar örneklerinde eksprese olan miRNA'ların Heat Map Clustering analizi.....	24
Şekil 4.3: Serum örneklerinde hasta ve kontrol grubu için miRNA ekspresyonlarındaki değişimin Scatter Plot ile gösterimi.....	26
Şekil 4.4: Serum örneklerinde eksprese olan miRNA'ların Heat Map Clustering analizi.....	27
Şekil 4.5: Serumda miR320a'nın kontrol ve hasta grubundaki gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	28
Şekil 4.6: İdrarda miR320a'nın kontrol ve hasta grubundaki gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	29
Şekil 4.7: Serumda miR6750-5p'nin kontrol ve hasta grubundaki gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	31
Şekil 4.8: İdrarda miR6750-5p'nin kontrol ve hasta grubundaki gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	31

PROSTAT KANSERİ HASTALARINDA KAN VE İDRAR ÖRNEKLERİNDE MİKRORNA DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZET

Erkeklerde gelişmiş ülkelerde en sık saptanan kanser olan prostat kanseri aynı zamanda erkeklerde kansere bağlı ölüm nedenleri içinde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Prostat kanserini erken dönemde tespit edebilmek için dijital rektal muayene, serum prostat spesifik antijen (PSA) düzeyi, transrektal ultrasonografi ve transrektal ultrasonografi eşliğinde biyopsi kullanılan temel araçlardır. Günümüzde PSA'nın ölçümü, prostat kanseri tanısı ile ilişkilendirilebilen en yaygın göstergedir. Buna rağmen prostat kanseri tarama biyomolekülü olarak PSA testinin kullanımı için sınırlamalar vardır. Özgüllükleri düşük olduğu için prostat kanseri tanısını koymada özgüllüğü daha yüksek teknik arayışları devam etmektedir. MikroRNA'lar (miRNA) ortalama 22 nükleotit uzunluğunda küçük, protein kodlamayan düzenleyici RNA molekülleridir. Hayvan ve bitkilerde, protein kodlayan genlerin mRNA'sına bağlanarak bu genlerin transkripsiyon sonrası baskılanmasını direkt olarak etkileyerek gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Son yıllardaki çalışmalarda miRNA'ların gelişme, proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, tümör oluşumu, sinyal iletimi, organ gelişimi ve hematopoetik soy farklılaşması da dahil olmak üzere birçok kritik biyolojik süreçte önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Prostat kanserinde bazı miRNA'ların , proliferasyon, epitelial-mezenkimal geçiş ve androjen bağımsızlığı gelişimi gibi önemli rolleri olduğu bilinmektedir. miRNA'ların ayrıca, koruyucu bir eksozom içinde salgılandığı düşünülmektedir. Son zamanlarda yayınlanan bir çalışma ile idrar örneklerinde miRNA'nın varlığı kanıtlanmıştır. Aynı çalışma ile miRNA'ların prostat kanseri için idrarda biyomarker olarak kullanılan PSA'dan bile daha hassas bir marker olduğu gösterilmiştir. Literatüre göre prostat kanseri tanı ve tedavisinde miRNA'ların biyomarker olarak kullanılabilmesi önerilmektedir. Ancak spesifik olarak prostat kanseri hastalarının kan ve idrarlarındaki miRNA ekspresyon değişikliklerini karşılaştıran çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada prostat kanseri tanısı almış hastalar ve sağlıklı kontrollerden alınan kan ve idrar örneklerinden elde edilen total RNA üzerinden mikroarray yöntemiyle miRNA ekspresyon profilleri belirlenmiştir. Kan ve idrarda ortak olarak tespit edilen miR320a ve miR6750-5p'nin real time PCR ile ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Hastaların kan ve idrar örneklerinde, ortak olarak sağlıklı kontrol grubuna kıyasla miR320a ve miR6750-5p ekspresyonunda anlamlı bir artış belirlenmiştir. İlerleyen çalışmalarda hasta sayısının çoğaltılması ve bu miRNA'ların detaylı incelemeleri yapılmak üzere yolak analizine tabii tutulması düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mikroarray, miRNA profillemesi, Prostat kanseri

COMPARISON OF MICRORNA LEVELS IN BLOOD AND URINE SAMPLES IN PROSTATE CANCER PATIENTS

SUMMARY

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer in men in developed countries but also in the causes of cancer deaths in men and ranks second after lung cancer. Digital rectal examination, serum prostate-specific antigen (PSA) level, transrectal ultrasonography and transrectal ultrasound-guided biopsy are the basic tools for early detection of prostate cancer. Today, the measurement of PSA is the most common indication that can be associated with prostate cancer diagnosis. However, there are limitations to the use of the PSA test as a prostate cancer screening biomolecule. Because of their low specificity, the search for prostate cancer has a higher specificity in detecting prostate cancer. MicroRNA (miRNA) is a small non-coding, regulatory molecules containing about 22 nucleotides. In animals and plants, it plays an important role in regulation of gene expression by directly binding to the mRNA of protein-encoding genes and directly affecting post-transcriptional suppression of genes. Recent studies have shown that miRNAs play important roles in many critical biological processes including development, proliferation, differentiation, apoptosis, tumor formation, signal transduction, organ development and hematopoietic lineage differentiation. It is known that some miRNAs in prostate cancer play important roles such as, proliferation, epithelial-mesenchymal transition and androgen independence. MiRNAs are also thought to be secreted in a protective exosome. A recent study demonstrated that the presence of miRNA in urine samples. The same study showed that miRNAs are more sensitive markers than PCA, which is used as a biomarker in the urine for prostate cancer. According to the literature, miRNAs may be used as a biomarkers for diagnosis and treatment of prostate cancer. Nevertheless, studies that particularly compare miRNA expression changes in prostate cancer patients blood and urine samples are limited. In this study, miRNA expression profiles were determined by microarray method on total RNA from blood and urine specimens obtained from patients with prostate cancer and healthy controls. Expression levels of miR320a and miR6750-5p, which were detected commonly in blood and urine, were analyzed by real time PCR. A significant increase in expression of miR320a and miR6750-5p was determined in blood and urine samples of patients compared to healthy control group. Progressive studies are intended to increase the number of patients and detailed investigation of these miRNAs are considered for further pathway analysis.

Keywords: Microarray, miRNA profiling, Prostate cancer

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Erkeklerde gelişmiş ülkelerde en sık saptanan kanser olan prostat kanseri aynı zamanda erkeklerde kansere bağlı ölüm nedenleri içinde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2005-2009 yılları arasındaki prostat kanseri insidansı 151.4/100.000'tür. 2013 yılı için 238.590 kişinin yeni prostat kanser tanısı aldığı tahmin edilirken, 29.720 kişinin de prostat kanseri nedeni ile öldüğü tahmin edilmektedir. Prostat kanseri görülme insidansı yaşla birlikte artmaktadır [1]. Günümüzde prostat kanserini erken dönemde tespit edebilmek için parmakla rektal muayene (PRM), PSA düzeyi, transrektal ultrasonografi (TRUS) ve transrektal ultrasonografi eşliğinde biyopsi (TRUS-Bx) kullanılan temel araçlardır. *U.S. Preventive Services Task Force* (USPSTF)'nin kanıtlarına göre PSA düzeyinin %80 oranında yanlış pozitif sonuç verme olasılığı bulunmaktadır. Bu sebeplerden ötürü özgüllükleri düşük olduğu için prostat kanseri tanısını koymada özgüllüğü daha yüksek teknikleri arayışları devam etmektedir [2].

miRNA ortalama 22 nükleotit uzunluğunda küçük, protein kodlamayan düzenleyici RNA molekülleridir. Hayvan ve bitkilerde, protein kodlayan genlerin mRNA'sına bağlanarak transkripsiyon sonrası baskılanmasını direkt olarak etkileyerek gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. Hayvan ve bitkilerde, protein kodlayan genlerin mRNA'sına bağlanarak transkripsiyon sonrası baskılanmasını direkt olarak etkileyerek gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar [3, 4]. Hedef genleri baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi süreçlerde önemli rol oynarlar. miRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan *Drosha* ve kofaktörü *Pasha* kompleksi tarafından yaklaşık 70 nükleotit uzunluğunda olan

prekürsör mikroRNA (pre-miRNA)'ya dönüştürülür. Bir nüklear taşıma reseptörü olan *Exportin 5* pre-miRNA'yı *exportin-GTPase RAN* sistemi yoluyla çekirdeğin dışına gönderir. Sonrasında pre-miRNAlar sitoplazmada RNAz III enzim ailesinden *Dicer* adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA dupleksine çevrilir. *Dicer*, aynı zamanda RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RISC) oluşumunu başlatır. *Dicer*, pre-miRNA'nın sap ilmiğini kestikten sonra, miRNA-miRNA dupleksinden sadece biri RISC kompleksine dahil olur. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNaz olan Argonat'ın etkisiyle bu iki iplikten 5'ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. RISC kompleksinin substratı olarak işlenir. miRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya Argonat proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar [5, 6].

miRNA'lar kanser de dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumlarla ilişkili olarak serum, plazma, tükürük ve idrarda tespit edilmiştir. Çeşitli vücut sıvılarında miRNA'ların varlığı non-invaziv bir şekilde kanser hakkında bilgi edinmek için potansiyel bir yaklaşım olabilmektedir. Prostat kanserinde bazı miRNA'ların apoptozdan kaçma, proliferasyon, epitelyum-mezenkimal geçiş ve androjen bağımsızlığı gelişimi gibi önemli rolleri olduğu bilinmektedir [7]. miRNA'ların aynı zamanda, koruyucu bir eksozom içinde salgılandığı önerilmiş ve son zamanlarda yayınlanan bir çalışma ile de idrar örneklerinde miRNA kantifikasyonu kanıtlanmıştır. Aynı çalışma ile miRNA'ların prostat kanseri için idrarda biyomarker olarak kullanılan PSA'dan bile daha hassas bir marker olduğu gösterilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda ile de prostat kanseri tanı ve tedavisinde miRNA'ların biyomarker olarak kullanılabilmesi önerilmektedir [8]. Buna rağmen spesifik olarak prostat kanseri hastalarının kan ve idrarlarındaki miRNA ekspresyon değişikliklerini inceleyip karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile prostat kanseri hastaları ve sağlıklı kontrollerden alınan kan ve idrardaki miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması ile eşlenen miRNA'ların prostat kanseri için diagnostik bir marker olarak araştırılması hedeflenmektedir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Prostat Bezi

Prostat, erkek üreme sisteminde mesanenin hemen altında ve rektumun önünde bulunan bir bezdir. Ceviz büyüklüğündeki bu bez üretranın bir bölümünü çevrelemekte ve spermanın bir parçası olan sıvı üretmektedir [9]. Prostat bezi, ilerleyen yaşlardaki erkeklerde 40 grama kadar büyüyebilmektedir [10].

Erkek bireylerde yaş ilerledikçe prostat büyüyerek üretra veya mesaneyi bloke edebilir. Selim prostatik hiperplazi (BPH) olarak adlandırılan bu durum idrar yapımında ve cinsel problemlerde sorunlara neden olabilir. Kanseri olmasa da ameliyat gerekli olabilmektedir [9]. Prostat kanseri, anormal sperm salgılayan prostat bezi hücrelerinin kontrolsüz olarak gelişmesi ve proliferasyonu ile başlamaktadır. Tedavi edilmediği takdirde özellikle lenf düğümleri, kemikler ve vücudun diğer bölgelerine metastaz yapabilmektedir. Çoğu hasta erken evrelerde asemptomatik kalmakla birlikte hastalığın ilerleyen evrelerinde disüri, hematurî, hematospermi, bacaklarda ve pelvik bölgedeki ağrı ve şişme gibi çeşitli üriner semptomlar görülmektedir [9, 11, 12]. BPH veya prostattaki diğer problemlerin semptomları prostat kanseri semptomlarına benzeyebilmektedir [9].

2.2 Prostat Kanseri

2.2.1 Prostat kanseri epidemiyolojisi

Gelişmiş ülkelerde en sık saptanan kanser olan prostat kanseri aynı zamanda erkeklerde kansere bağlı ölüm nedenleri içinde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır [1]. 2012 yılında yaklaşık 1.1 milyon kişiye prostat kanseri tanısı konmuş ve olguların yaklaşık % 70'i gelişmiş bölgelerde ortaya çıkmıştır [13]. Prostat kanseri insidansı ve prevalansı dünyadaki farklı bölgeler arasında değişmekle birlikte, Kuzey Amerika'da en yüksek ve Güney Asya'da en düşüktür. Yeni Zelanda ve Avustralya'da yaşa göre en yüksek insidans oranı 100.000'de 111.6 ve en düşük oran 100.000'de 3.7 iken Güney Asya'da 4.5 düzeyinde görülmektedir [14-16].

Prostat kanserinin ABD'de yaklaşık 2.8 milyon erkekte tespit edildiği ve görülme sıklığının zaman içerisinde de arttığı kaydedilmiştir [17, 18]. 2015 verilerine göre Türkiye'de yaşa göre düzenlenmiş prostat kanseri insidans hızı 100.000'de 35 vakadır [19].

2.2.2 Prostat kanseri tanısı

Prostat kanserini teşhis etmeye yönelik ana tarama yöntemleri; dijital rektal muayene (DRE), serum prostat spesifik antijen (PSA) seviyesi ölçümü ve transrektal ultrason eşliğinde biyopsidir. DRE'de gözlenen şüphe, tüm hastaların yaklaşık %18'inde PSA düzeyinden bağımsız olarak prostat kanserini tek başına gösterir. Ayrıca 2ng/ml'ye kadar PSA seviyesine sahip olan hastalarda, DRE'de gözlenen şüphenin pozitif prediktif değeri %5-30'dur [18, 20]. Prostat kanseri morfolojik özelliklerine göre Gleason skorumla sistemi kullanılarak sınıflandırılır [21, 22].

Günümüzde PSA'nın ölçümü, prostat kanseri tanısı ile ilişkilendirilebilen en yaygın göstergedir [18, 20]. Buna rağmen prostat kanseri tarama biyomolekülü olarak PSA testinin kullanımı için bazı sınırlamalar vardır [23, 24]. PSA özellikle prostat dokusunda eksprese edilmesine rağmen, prostat kanserinde spesifik olarak ifade edilmemektedir. PSA serumda selim prostat hiperplazisi (BPH), prostatit, enfeksiyonlar, travma ve üriner retansiyon gibi çeşitli koşullarda da yüksek seviyelerde görülmektedir. PSA taramasında yükselmiş PSA düzeyine (>4.0 ng/ mL) dayanılarak prostat biyopsisi yapılan bireylerin yalnızca % 25'inde prostat kanseri tespit edilmiştir [23-26]. Sonuç olarak PSA taramasının pozitif prediktif değeri yaklaşık %25-40 olarak değerlendirilmektedir [24, 27].

2.2.3 Prostat kanseri patolojisi

Prostat mesanenin hemen altında bulunan küçük bir bezdir. Prostat kanseri tipik olarak semptomlara neden olmaz. Fakat bazı ileri evre kanserlerde mesanedeki idrar akışı engellenebilir, komşu seminal veziküller istila edilip metastaza yol açılabilir. Primer prostat kanserinde prostat bezinin normal glandüler yapısında bozulma meydana gelir [21, 22]. Prostat kanserine benzer şekilde, prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) ve BPH'de de hücre proliferasyonunda anormal bir artış gözlenmektedir. Lokalize prostat kanseri, normal prostatik epitel dokusuna kıyasla yaklaşık 7 kat artan hücre proliferasyon hızına sahiptir [28, 29].

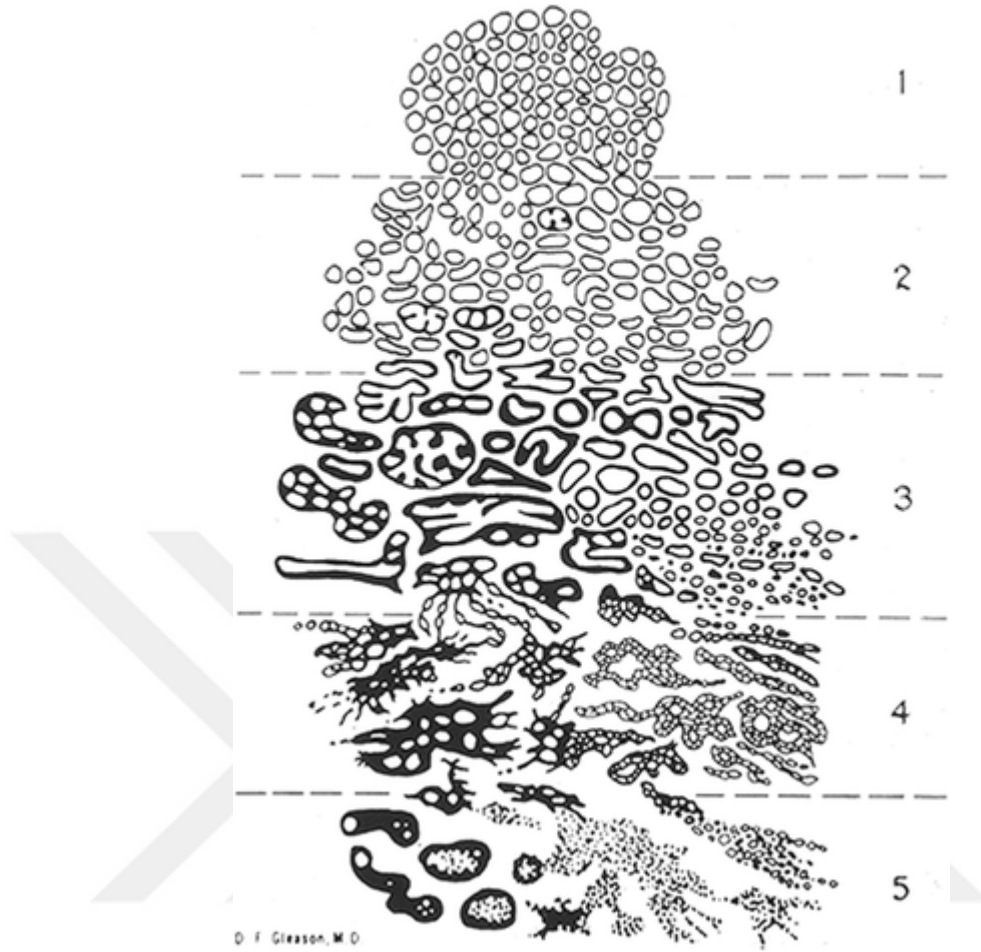
Klinik örnekler ve hayvan çalışmalarının histopatolojik analizi ile; bulaşıcı ajanlar, ırk, yaş ve diğer faktörlerin prostat epitel hücrelerinde zarar veren değişiklikler yarattığı ve bu zararlar prostat dokusunda inflamatuvar yanıt geliştiği gösterilmiştir [30]. İnflamatuvar yanıtın zaman içerisinde mutasyon gelişimini indüklediği ve bu mutasyonların artan hücre proliferasyonu ile birlikte prostat kanserinin gelişimi için etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Bu faktörler, preoplastik lezyonların oluşmasına sebep olup maligniteyi ilerletip sonuç olarak metastazlara neden olabilmektedir [30-33].

Prostat adenokarsinoma tanısında kullanılan Gleason derecelendirme sistemi, 1960'lı yıllardan 1970'li yıllara dayanan 2.900'den fazla hastanın dahil edildiği bir çalışmanın sonucunda ortaya çıkmıştır. Donald Gleason, prostat adenokarsinomasının histolojik büyüme paternlerini (grade) ayrıntılı olarak özetlemiş, evreleme ve prognoz gibi klinik verilerle korelasyon analizi yapmıştır. Sınıflandırma kolaylığı için beş prognostik model Dr. Gleason tarafından çizilen basit bir diyagramla gösterilmiştir [21, 34].

Gleason 1, en iyi ayırt edilen ve en uygun prognoz ile korelasyon göstermektedir. Gleason 5 ise en az ayırt edilen ve zayıf prognoz ile korelasyon göstermektedir. Birçok prostat adenokarsinomunda iki veya daha fazla Gleason paterni bulunmasından dolayı prostat adenokarsinomasının biyolojik davranışıyla daha iyi ilişkili olduğu gösterilen Gleason skoru geliştirilmiştir. Birincil ve ikincil paternlerin toplamı, Gleason skorunu vermektedir (Şekil 1) [35].

İğne biyopsilerinde artık 1 ve 2 numaralı gleason paternleri atanmamaktadır. Bunun nedeni ise zayıf çoğalabilirlik ve radikal prostatektomi derecesi ile kötü korelasyonun olmasıdır [34, 36]. Gleason 3 paterni dallanma benzeri çeşitli boyutlardaki ayrı bezlerden oluşur [34, 37]. Gleason 4 paterni, zayıf biçimde oluşturulmuş kaynaşmış kribriform bezleri içerir [34, 38]. Gleason 5 paterni ise tümör tabakaları, tek tek hücreler ve hücrenin kordonlarından oluşur [34, 39].

PROSTATIC ADENOCARCINOMA (Histological Patterns)



Şekil 2.1 :Prostatik adenokarsinomların histolojik paternlerinin diyagram gösterimi

2.3 Epigenetik

Epigenetik terimi ilk kez 1942 yılında Conrad Waddington tarafından ortaya atılmıştır [40]. Epigenetik, protein translasyonundan önce DNA sekansında kodlanmış bilgilerin transkripsiyonunu RNA'ya modüle eden düzenleyici işlemler olarak adlandırılır [41]. DNA ökaryotik çekirdekte, nükleozom ile bir kromatin yapısına sıkıştırılır. Histon oktamer çekirdek histonunun iki elementini (H3, H4, H2A ve H2B) içerir [42, 43]. DNA'nın kromatin içine paketlenmesi, DNA'yı kalıp olarak kullanan faktörlere potansiyel bir engel oluşturur [43].

Her bir normal somatik hücre, yaklaşık üç milyar baz çiftinden oluşan aynı genomu içermektedir. Çok sayıda epigenetik modifikasyon, belirli bir hücre tipindeki ve gelişim aşamasındaki genlerin transkripsiyonel mekanizmalara erişimini düzenler.

DNA metilasyon paternleri ve histon modifikasyonları biçimindeki epigenetik düzenlemeler gen regülasyonunu düzenler [40, 44]. DNA'nın en belirgin epigenetik modifikasyonu, başta CpG dinükleotidler bağlamında sitozinin karbon 5' pozisyonunda meydana gelen metilasyondur. Genomun kodlanmayan bölgeleri genellikle genom instabilitesine neden olurken, çoğu CpG adası ve promotör bölgesi demetilasyona uğrar. Farklılaşma, gelişim veya hastalık süreçleri sırasında destekleyici metilasyon transkripsiyonel susturma ile ilişkilendirilir [40, 45, 46]. Gen ekspresyonunun epigenetik mekanizmalarını ve kromatin yapısını düzenleyen esas olarak üç değişiklik vardır. Bunlar; DNA metilasyonu, histon kovalent modifikasyonu ve miRNA'lardır [43].

2.3.1 Kodlanmayan RNA'lar

Transkribe olan RNA'ların yalnızca % 2'si protein kodlamakta, geriye kalan protein kodlamayanlar ise kodlanmayan RNA'lar (ncRNA'lar) olarak adlandırılmaktadırlar [47, 48]. NcRNA'lar geçerli bir açık okuma çerçevesine sahip olmamakla birlikte protein kodlama kapasitesi de bulunmamaktadır [49-52]. Kısa ncRNA'lar ve daha uzun ncRNA'lar olmak üzere iki grupta toplanırlar. Kısa ncRNA'lar 200 nükleotit olup, bu grupta piwi ile etkileşen RNA'lar, küçük nükleolar RNA'lar (snRNA), miRNA'lar ve diğerleri bulunmaktadır [48, 53]. 200 nükleotitten daha uzun olanlar ise lncRNA olarak adlandırılır [52, 54, 55]. Bu grupta ise; intergenik ncRNA'lar, uzun intronik ncRNA'lar ve psödogen RNA'lar olmak üzere çok çeşitli ncRNA'lar bulunmaktadır [52, 54].

2.3.2 MikroRNA'lar

miRNA'lar, uzunlukları 19 ile 25 nükleotid arasında değişen, transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu düzenleyen, korunmuş, küçük kodlanmayan RNA'ların bir sınıfıdır [56, 57]. İlk miRNA lin-4, *C. elegans*'da 1993 yılında Victor Ambros ve Gary Ruvkun tarafından keşfedilmiştir [58, 59]. Hedef mRNA'nın 3' kodlamayan bölgesine bağlanarak birden çok hedef genin ekspresyonunu inhibe ederler [60, 61]. Günümüzde, insanlarda 2500'den fazla tipte miRNA tespit edilmiştir [61, 62]. Son yıllardaki çalışmalarda miRNA'ların gelişme, proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, tümör oluşumu, sinyal iletimi, organ gelişimi ve hematopoetik soy farklılaşması da dahil olmak üzere birçok kritik biyolojik süreçte önemli rol oynadıkları gösterilmiştir [3, 63].

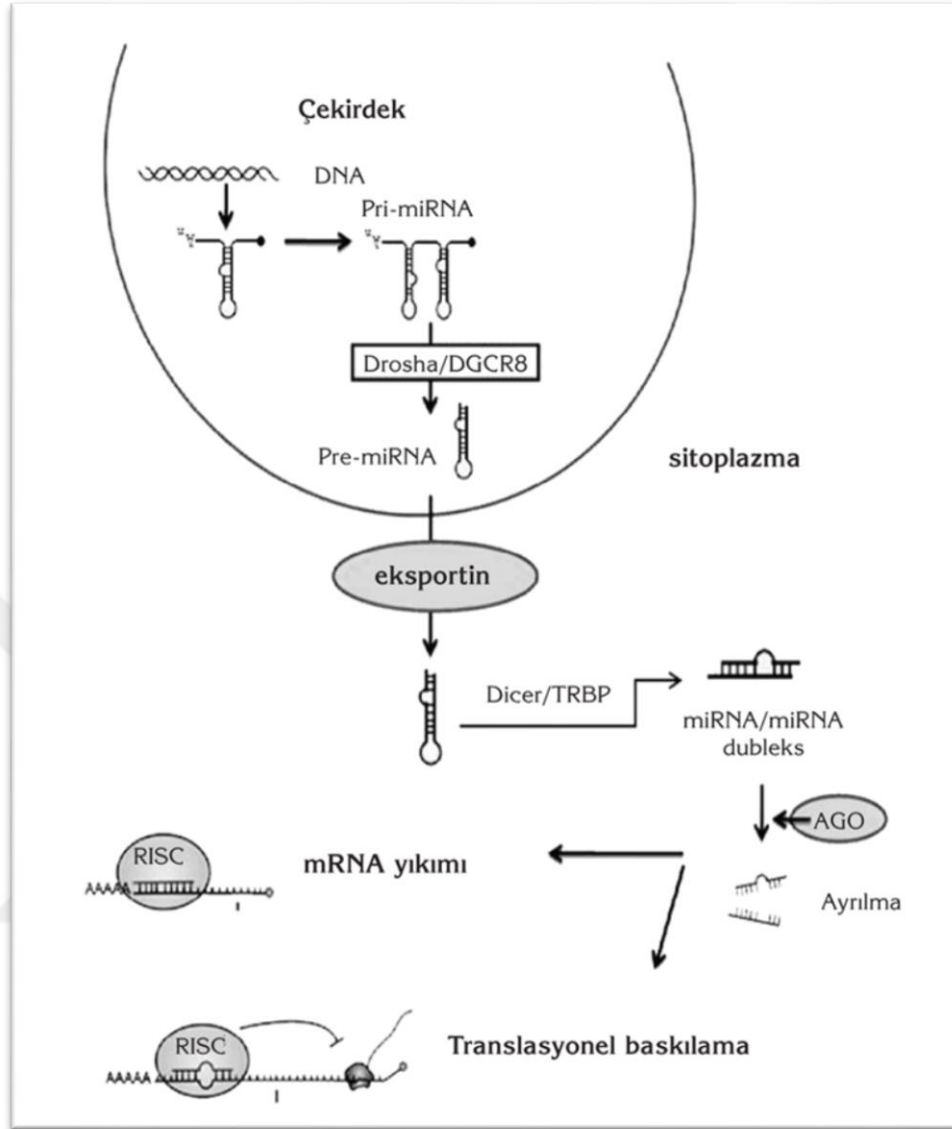
2.3.3 MikroRNA'ların biyogenezi

miRNA'ların biyogenezi çok aşamalı bir süreç olup çok sayıda protein ve enzim tarafından düzenlenir [64, 65]. miRNA'lar ilk olarak RNA polimeraz II enzimi ile transkribe edilerek pri-miRNA'ya dönüştürülür. Pri-miRNA'lar 5 'şapka yapısı ve 3' poli A kuyruğu içeren *hairpin* (saç tokası) yapısındadır [58, 66].

Pri-miRNA, RNase III enzimi olan *Drosha* ve RNA bağlayıcı protein Di George kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8) tarafından yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA'ya işlenir [63, 67]. *Exportin 5* pre-miRNA'yı *exportin-GTPase RAN* sistemi yoluyla çekirdeğin dışına gönderir [68, 69]. Bir sitoplazmik RNase III enzimi olan *Dicer1* tarafından da parçalanarak 22 nükleotidlik çift sarmallı dubleks oluşturulur. Bu dubleks daha sonra *Argonaute* proteini (Ago) ile RISC oluşturur [69, 70].

Oluşan iki ayrı dupleks miRNA'nın sadece bir zinciri RISC kompleksine yüklenirken, diğer zincir çoğunlukla degrade olarak düşünülmektedir. RISC'ye bağlanan zincir, tamamlayıcı baz eşleşmesiyle hedef mRNA'larla bağlanmaktadır. Tamamlayıcı baz eşleşmesinde hata oluşmamış ise sistem mRNA'nın degradasyonu ile translasyon engellenir. Bu süreçte GW182 proteini, Ago proteinleri ile etkileşime girerek translasyonel inhibisyonu ve mRNA bozulmasını sağlar (Şekil 2.2) [70-72].

Genellikle hedef mRNA'ların 3'UTR'sine bağlanan miRNA'lar, birkaç farklı mRNA'yı hedef alabilirler. Aynı zamanda herhangi bir mRNA, farklı miRNA'lar için birden fazla bağlanma yerine sahip olabilmektedir [3, 69].



Şekil 2.2: miRNA biyogenezini. (DGCR8: Di George sendromu kritik bölge 8, TRBP: Transaktive edici yanıt oluşturan RNA bağlanma proteini, AGO: Argonaute, RISC: İndüklenmiş RNA susturma kompleksi.)

2.4 MiRNA'lar ve Kanser

Kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkta, miRNA ekspresyon düzeylerinin yaygın şekilde değiştiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır [73, 74]. Kanserde miRNA'lar ilk kez 2002 yılında, kronik lenfositik lösemide (KLL) miR-15 ve miR-16 kümesi tanımlanarak bildirilmiştir. KLL'deki miRNA delesyonunun, kısmen miR-15/16 anti-apoptotik hedef B hücreli lenfoma 2'nin (BCL2) yüksek ekspresyonuna izin vererek gerçekleştirdiği gösterilmiştir [75, 76].

miRNA'nın anormal ekspresyonu için farklı mekanizmalar gösterilmiştir. Bunlardan bazıları; genetik değişiklikler ve tek nükleotid polimorfizm (SNP), epigenetik susturma ve miRNA biyogenez yolağındaki defektlerdir [74]. Her tümör tipinde, tümörü normal dokulardan ve diğer kanser türlerinden ayıran farklı bir miRNA işareti bulunmaktadır [73, 76]. Kansere bağlı genlerin ekspresyonu gibi miRNA ekspresyonu da, kromozomal amplifikasyon/delesyon, promotör metilasyonu ve transkripsiyon faktörü aktivasyonu ile değişebilmektedir. Kanserle ilişkili olarak en iyi tanımlanmış miRNA'lar ve hedefleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Hedef mRNA'nın 3' UTR'sindeki bağlanma bölgesi varyasyonları kanser hücrelerinin ortak bir özelliğidir [76, 77].

Tablo 2.1: *TarBase*'e göre kanserle ilişkili olarak en iyi tanımlanmış miRNA'lar ve hedefleri.

miRNA	Mekanizma	Hedef Genler
miR-17~92	Onkogen/ Tümör Supresör Gen	E2F1, HBP1, CDKN1A, NCOA3, ERa, PTEN, MECP2, HOXA5, VPS4B, MYCN, RAB14, DPYSL2, TGFBR2, TSG101, ARHGAP12, BACE1,
miR-21	Onkogen	PDCD4, PTEN, RECK, PPARa, TIMP3, FasL, TGFBR2, SERINB5, CDK2AP1, TPM1
miR-221/222	Onkogen	CDKN1B, KIT, PPP2R2A, p27kip1, CDKN1C, ERa, KIT, DDIT4, BNIP3L, ZEB2, TBK1, CREBZF
let-7	Tümör Supresör Gen	NIRF, NF2, CASP3, TRIM71
miR-15/16	Tümör Supresör Gen	BACE1, DMTF1, C22orf5, BCL2, ARL2, CCNT2, TPPP3, VEGFA, RARS, FGF2, ZNF622, DNAJB4, PURA, SHOC2, LUZP1, FNDC3B, ITGA2, ATG9A, CA12, TMEM43, YIF1B, TMEM189, VTI1B, RTN4
miR-17~92	Onkogen/ Tümör Supresör Gen	E2F1, HBP1, CDKN1A, NCOA3, ERa, PTEN, MECP2, HOXA5, VPS4B, MYCN, RAB14, DPYSL2, TGFBR2, TSG101, ARHGAP12, BACE1,
miR-21	Onkogen	PDCD4, PTEN, RECK, PPARa, TIMP3, FasL, TGFBR2, SERINB5, CDK2AP1, TPM1
miR-221/222	Onkogen	CDKN1B, KIT, PPP2R2A, p27kip1, CDKN1C, ERa, KIT, DDIT4, BNIP3L, ZEB2, TBK1, CREBZF, MYBL1, DKK2
let-7	Tümör Supresör Gen	NIRF, NF2, CASP3, TRIM71
miR-15/16	Tümör Supresör Gen	BACE1, DMTF1, C22orf5, BCL2, ARL2, CCNT2, TPPP3, VEGFA, RARS, FGF2, ZNF622, DNAJB4, PURA, SHOC2, LUZP1, FNDC3B, ITGA2, ATG9A, CA12, TMEM43, YIF1B, TMEM189, VTI1B, RTN4

Bir miRNA'nın ekspresyonuna ve hedeflerine bağılı olarak, onkogenikmiRNA veya tümör baskılayıcı miRNA olarak sınıflandırılabilir. Onkogenik miRNA'lara onkomirler de denilmektedir. Onkomirler kanserde disregüle olmuş miRNA'lardır. Onkogenik miRNAlar, kanserde genellikle aşırı derecede eksprese edilerek anti proliferatif, hücre farklılaşması ve proapoptotik genleri hedef alırlar. Tümör baskılayıcı miRNA'lar ise genellikle normal doku, hücre döngüsü ve proliferatif genlere kıyasla kanserlerde düşük seviyelerde ifade edilir [58, 78]. miRNA'ların birçoğu tümör baskılayıcıların veya onkogenlerinin ekspresyonunu inhibe ederek kanser fenotipine katkıda bulunmaktadır. Onkomirler inhibe edilir veya tümör baskılayıcı miRNA'lar uyarılırlarsa, kanser türüne ve spesifik miRNA'ya bağılı olarak kanser hücresi proliferasyonu, metastaz veya sağkalım önemli ölçüde azaltılabilir [79, 80]. Bazı tümörlerde birçok miRNA, onkojenik olabilirken diğer kanserlerde tümör baskılayıcı olabilmektedir. miRNA'nın hücrel büyüme üzerindeki etkisi, tümör büyümesini yönlendiren veya bastıran transkriptlerin sentezlenmesine bağılıdır. Bunun en iyi örneğı, meme kanserinde tümör büyümesini teşvik eden, ancak akciğer kanserinde tümör büyümesini baskılayan miR-146a'dır [58].

Oligonükleotid miRNA'nın mikroarray analizi, çok sayıda kansere spesifik hücre tipinde yüzlerce miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi için en yaygın kullanılan tekniktir [74, 81]. miRNAprofili kullanan çalışmalar, aynı dokuda normal hücrelerinkine kıyasla kanser hücrelerinde önemli ölçüde farklı miRNA profilleri olduğunu göstermiştir. Ayrıca *Hierarchical clustering* (hiyerarşik kümeleme) analizleri, miRNA imza (*signature*) profillemesinin, tümör dokusu örneklerinin belirli bir orijin halinde gruplanmasını sağladığını göstermiştir [74].

2.4.1 miRNA'lar ve prostat kanseri

Birçok çalışma, miRNA ekspresyon sinyallerini analiz ederek belirlenen miRNA'nın up veya downregülasyonunun prostat kanseri patogeneziyle ilişkili olduğunu göstermiştir [82, 83]. Prostat kanserinde miRNA sentezlenmesine ilişkin çok sayıda çalışmada çelişkili sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bazı çalışmalarda miRNA'ların tümörlerde downregüle olduğu belirtilirken diğer çalışmalarda ise tümörde miRNA'ların genel olarak upregüle olduğu gösterilmektedir [18, 73].

Genel olarak hem prostat kanserinde, hem de kanser gelişiminde miRNA'nın karmaşıklığının büyük bir kısmı tamamen açıklığa kavuşturulmamasına rağmen, prostat kanserinde birkaç kilit onkojenik yolda miRNA'nın önemi gösterilmiştir.

Özellikle prostat kanserinde, androjen reseptör sinyal yolağı ile miRNA'ların düzenlenmesi ve miRNA'ların bu yolak üzerindeki etkisi ilgi çekmektedir. PTEN/AKT sinyal yolakları gibi prostat kanserinde miRNA'ların diğere anahtar sinyal yolaklarıyla etkileşimi de tartışılmaktadır [84, 85].Yapılan çalışmalar, tümör dokularında farklı olarak eksprese edilen miRNA'ların plazma, serum veya idrar gibi vücut sıvılarında prostat kanseri için tanımlayıcı, prognostik ve terapötik biyomarker olarak işlev gördüğünü ortaya koymaktadır [83].



3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Malzemeler

Urine Total RNA Purification Maxi Kit (Norgen), glikojen (Thermo), *miScript II RT Kit* (Qiagen), Tris baz (Sigma-Aldrich), Borik Asit (Sigma-Aldrich), EDTA (Sigma-Aldrich), Etidyum Bromür (Sigma-Aldrich), *Gel Loading Buffer* (Sigma-Aldrich), *miScript SYBR Green PCR Kit* (Qiagen) ve *miScript Primer Assay* (Qiagen) ticari olarak satın alınarak kullanıldı.

3.2 Cihazlar

Nanodrop

İzole edilen tüm RNA örneklerinin konsantrasyon ve kalite tayinleri için kullanıldı.

PCR Cihazı

Total RNA örneklerinden cDNA sentezini gerçekleştirmek için kullanıldı.

Jel Görüntüleme Sistemi

cDNA'ların kontrolü için gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezinde jelin görüntülenmesi için kullanıldı.

Real Time PCR

Örneklerden belirlenen miRNA'ların tespiti için real time PCR uygulamasında kullanıldı.

3.3 Çalışma Materyali

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı'nda, prostat kanseri tanısı konmuş 8 hastadan ve kontrol grubu olarak da herhangi bir kanser şüphesi bulunmayan 30 sağlıklı bireyden alınan kan ve idrar örnekleri çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Tüm bu çalışma materyalleri 09.12.2015 tarihli 16926 sayılı etik kurulu kararınca toplanmıştır.

Gönüllülerin araştırmaya dâhil edilme kriterleri (hasta grubu);

- Hasta patolojik olarak, kesin prostat kanseri tanısı almış olmalı
- Hastanın başka sistemik hastalığının olmaması
- Eşlik eden başka bir kanserinin olmaması

Gönüllülerin araştırmaya dâhil edilme kriterleri (kontrol grubu);

- Prostat kanseri tanısı almamış bireyler
- Bireyin sistemik hastalığının olmaması
- Bireyin kanser geçmişinin olmaması

3.4 Total RNA İzolasyonu

3.4.1 İdrardan total RNA izolasyonu

Hasta ve kontrol grubundan taze olarak steril idrar numune kaplarına toplanan 50 ml idrar örneği steril falkonlara alınarak 3000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant tüpte 5 ml kalacak şekilde atılmıştır. Pelet 5 ml süpernatantiinde özdürölerek idrar örneğindeki hücre miktarı lizis aşaması için arttırılmıştır. Bu aşamadan sonra ticari kit kullanılarak üreticinin talimatlarına uygun olarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon protokolü aşağıdaki gibidir;

1. 5ml idrar örneğine 0.35 ml *Slurry C3* ve 4.65 ml *LysisBuffer A* eklenmiş ardından 15 saniye boyunca vorteks yapılarak hücreler lizise uğratılmıştır.
2. Lizata 5 ml %96-100’lük etanol eklenmiş ardından 10 saniye boyunca vorteks yapılmıştır.
3. 2000 g’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
4. 500 µl *Wash Solution A* eklenerek peletpipetajyapılarak özdürölmüş ardından *Mini Filter Spin* kolonlara aktarılmıştır. 14.000 g’de 1 dakikaboyunca santrifüj edilerek toplama tüpünde kalan kısım atılmıştır.
5. Kolona 500 µl *Wash Solution A* eklenerek 14.000 g’de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiş toplama tüpünde kalan kısım atılmıştır. Bu aşama iki defa tekrar edilmiştir.
6. Kolona 500 µl %96-100’lük etanol eklenerek 14.000 g’de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiş toplama tüpünde kalan kısım atılmıştır.
7. Kolon boş bir şekilde 14.000 g’de 3 dakika boyunca santrifüj edilmiş toplama tüpünde kalan kısım atılmıştır.

8. Kolon kapağı açık ve yatay bir şekilde 60°C'de 3 dakika ısı bloğunda inkübe edilmiştir.
9. Kolon *Elution* tüplere transfer edilmiş 50 µl *Elution Solution A* eklenmiştir. Kolon ilk olarak 200 g' de 2 dakika boyunca ardından ise 14.000 g'de 3 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
10. Elde edilen total RNA örneği -80°C'lik dondurucuya kaldırılmıştır.

3.4.2 Serumdan total RNA izolasyonu

Serumdan RNA izolasyonu trizol metoduyla yapılmıştır. İzolasyon protokolü aşağıdaki gibidir;

1. Hasta ve kontrol grubundan alınan 5 ml'lik kan örnekleri EDTA'lı tüplerde toplanmış 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serum kısmı 2 ml'lik steril tüplere alınmıştır.
2. 500 µl serum örneği yeni bir steril 2ml'lik tüpe alınarak üzerine 1ml Trizol eklenmiştir.
3. Her örneğe 1 µl *nuclease-free* glikojen(1µg/uL) eklenerek 20 saniye vorteks yapılmış ardından oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
4. Tüplere 200 µl kloroform eklenmiş tüpler ters düz edilerek 20 saniye boyunca karıştırılmıştır.
5. 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. 12.000 g'de 15 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edilmiştir.
7. Bu aşamada 3 faz görünümü elde edilmiş ve RNA'yı içeren şeffaf görümlü üst fazdan 800µl alınarak yeni bir 2ml'lik tüpe aktarılmıştır.
8. Her tüpe 600 µl olacak şekilde iki kez olmak koşuluyla toplamda 1.2 ml izopropanol eklenmiş ve 5 saniye boyunca vorteks yapılmıştır.
9. 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. 12.000 g'de 8 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edilmiştir.
11. Süpernatant pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde alınarak atılmıştır.
12. Her tüpe 1 ml %75'lik etanol eklenerek 5 defa ters düz edilmiştir.
13. 7500 g'de 5 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
14. Süpernatant pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde alınarak atılmıştır.
15. Tüpler kapağı açık şekilde oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
16. Her tüpe 20 µl *nuclease-free* su eklenerek pelet çözdürülmüştür.

17. Elde edilen total RNA örneği -80°C'lik dondurucuya kaldırılmıştır.

3.4.3 Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve kalitesinin tayini

İzole edilen tüm RNA örneklerinden 2 µl alınarak konsantrasyonları ve kalite tayinleri spektrofotometre cihazı kullanılarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçülmüştür.

3.5 Mikroarray

Kontrol ve hasta grubu kan ile idrarlarından elde edilen RNA'larkendi grupları içinde birleştirilerek (toplamda 4 örnek) total RNA'ların konsantrasyonları 100-500 ng arasında olacak şekilde kuru buz içinde yetkili firmaya mikroarray analizi için gönderilmiştir. Firma bünyesinde GeneChip® miRNA4.0Array.-Affymetrix, 90241 ile mikroarray analizi gerçekleştirilmiştir.

3.6 cDNA Sentezi

Total RNA'lardan cDNA sentezi, ticari kit kullanılarak üreticinin talimatlarına uygun olarak yapılmıştır. Her bir örnek için Tablo 3.1'de verildiği gibi karışım hazırlanmıştır. Sentez protokolü aşağıdaki gibidir;

Tablo 3.1: cDNA sentezi karışım miktarları.

Karışım	Miktar
<i>5x miScriptHiFlexBuffer</i>	4 µl
<i>10x NucleicsMix</i>	2 µl
<i>RNase-freewater</i>	Değişken
<i>miScriptReverseTranscriptaseMix</i>	2 µl
<i>Template RNA (1µg)</i>	Değişken
Toplam Hacim	20 µl

1. Tüm karışım işlemleri buz üstünde yapılmıştır.
2. Bu 20 µl'lik karışım hazırlandıktan sonra örnekler PCR cihazında 37°C'de 60 dakika ardından 95°C'de 5 dakika boyunca bekletilmiştir.
3. Elde edilen cDNA'lar agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilerek-20°C'lik dondurucuya kaldırılmıştır.

3.6.1 Agaroz jel elektroforezi

3.6.1.1 10X'lik tris-borik asit-etilen daimin tetra asetat hazırlanması

Tris bazdan 121.1 gr, borik asitten 61.8 gr ve 0,02 M EDTA'dan 7.4 gr tartılarak bir şişeye alınmış ve üzerine 500ml ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözdürülerek 10X'lik Tris-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetat (TBE) hazırlanmıştır.

3.6.1.2 %2'lik agaroz jel hazırlanması

Hazırlanan 10XTBE tamponu 1X'e düşürülmüştür. 2 gr agaroz tartılıp bir erlene alınmış ve 1XTBE ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Mikrodalgada 2,5 dakika boyunca ısıtılıp kaynatılan çözeltiliye 1 µl EtBr ilave edilerek hazırlanan jel yatağına dökülmüştür. Dökülen çözeltiliye yükleme kuyucuklarını oluşturmak için tarak yerleştirilerek donmaya bırakılmıştır. Donmuş jelden tarak dikkatlice çıkarılarak jel 1X TBE içeren yükleme tankına yerleştirilmiştir.

3.6.1.3 Örneklerin agaroz jel'e yüklenmesi

cDNA sentez ürününden 1,5 µl alınıp 10 µl *nuclease-free* su ile tamamlanmış ve yükleme tamponundan 1 µl alınarak karıştırılan 11 µl'lik örnekler jele sırasıyla yüklenmiştir. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak 500 mA 80 V'a ayarlanan güç kaynağına bağlanmış ve 40 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürütülen agaroz jel UV ışık altında görüntüleme cihazında incelenmiştir.

3.7 Real Time PCR

8 hasta ve 8 kontrolün idrar ve kan örnekleri olmak üzere toplamda 32 örnek için cDNA'lerden ticari kit kullanılarak üreticinin talimatlarına uygun olarak real time PCR yapılmıştır. PCR için hazırlanan karışım miktarları Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Referans gen RNU6-2 ile miR320-a ve miR6750-5p primerleri için *miScript Primer Assay* kullanılmıştır. Real time PCR reaksiyon aşamaları Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Real time PCR karışım miktarları.

Karışım	Miktar
2x <i>QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix</i>	12,5 µl
10x <i>miScript Universal Primer</i>	2,5 µl
10x <i>miScript Primer Assay</i>	2,5 µl
<i>RNase-free water</i>	5,5 µl
<i>Template cDNA</i>	2 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tablo 3.3: Real Time PCR reaksiyon aşamaları.

Reaksiyon Aşamaları	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	95 ⁰ C	15 dk
Denatürasyon	94 ⁰ C	15 sn
Bağlanma	Değişken	30 sn
Uzama	70 ⁰ C	30 sn
Döngü Sayısı	40 Döngü	

Bağlanma sıcaklıkları referans gen RNU6-2 için 56⁰C, miR320a için 58⁰C ve miR6750-5p için ise 55⁰C olarak belirlenmiştir.

3.8 İstatiksel Analiz

Hasta ve kontrol grubuna ait miR320a ve miR6750-5p hedef genleri ile referans gen RNU6-2 için Ct değerleri belirlenmiştir. Genlerin artış ve azalış oranları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Hastalar ve kontrol grubuna ait miR320a ve miR6750-5p için gen ekspresyon değişimlerinin kıyaslaması *Mann Whitney U* testi ile yapılmıştır. Anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir. İstatiksel analizler *GraphPad Prism 7* ile gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı'nda, prostat kanseri tanısı almış 8 olgunun yaş ortalaması 62 olup, PSA değerleri ortalaması 207 ng/ml'dir. Çalışmaya dahil edilen prostat kanseri şüphesi bulunmayan 30 erkek bireyin yaş ortalaması 38 olup, PSA değerleri ortalaması 0,77 ng/ml'dir.

4.1 Serum ve İdrar Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

Prostat kanseri tanısı almış 8 hastadan ve kontrol grubu olarak da prostat kanser şüphesi bulunmayan 30 bireyden alınan serum ve idrar örneklerinden elde edilen total RNA'lara ilişkin saflık ve konsantrasyon değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Hasta ve kontrol grubu idrar ve serum örneklerine ilişkin RNA saflık ve konsantrasyon değerleri. (Kİ: Kontrol İdrar, KS: Kontrol Serum, Hİ: Hasta İdrar, HS: Hasta Serum)

Çalışma Materyalleri	260/280 Oranı	Konsantrasyon (ng/µl)
Kİ1	1,16	31,3
Kİ2	1,31	62,8
Kİ3	1,64	49,3
Kİ4	1,30	19,1
Kİ6	0,92	89,4
Kİ7	1,47	5,0
Kİ8	1,23	13,5
Kİ9	1,55	30,7
Kİ10	1,28	10,2
Kİ11	1,23	18,5
Kİ12	1,11	56,3
Kİ13	0,92	86,2
Kİ14	1,38	21,6
Kİ16	0,94	105,6
Kİ17	1,15	23,2
Kİ18	1,25	20,9
Kİ19	1,20	27,2
Kİ22	1,22	20,1
Kİ33	1,24	32,4
Kİ37	1,30	30,1

Tablo 4.1 (Devam): Hasta ve kontrol grubu idrar ve serum örneklerine ilişkin RNA saflık ve konsantrasyon değerleri. (Kİ: Kontrol İdrar, KS: Kontrol Serum, Hİ: Hasta İdrar, HS: Hasta Serum)

Çalışma Materyalleri	260/280 Oranı	Konsantrasyon (ng/µl)
Kİ38	1,32	30,2
Kİ39	1,11	29,1
Kİ40	1,13	35,3
Kİ41	1,18	31,5
KS1	1,41	822,5
KS2	1,65	392,5
KS3	1,44	127,5
KS4	1,51	585,6
KS6	1,33	273,5
KS7	1,48	422,9
KS8	1,42	507,7
KS9	1,31	675,5
KS10	1,40	206,0
KS11	1,43	488,0
KS12	1,64	1107
KS13	1,30	1233
KS14	1,27	786,8
KS15	1,10	891,5
KS16	1,06	1424
KS17	1,04	628,3
KS18	1,22	553,1
KS19	1,46	566,5
KS21	1,54	625,4
KS22	1,41	901
KS23	1,51	595,1
KS32	1,79	298,4
KS33	1,44	294,6
KS34	1,51	638,4
KS37	1,59	274,6
KS38	1,38	405,3
KS39	1,42	158,6
KS40	1,51	709,5
KS41	1,52	502,8
Hİ1	1,86	126,2
Hİ2	1,71	49,3
Hİ3	2,13	107,6
Hİ4	1,79	67,7
Hİ5	1,15	14,4
Hİ6	1,41	22,7
Hİ7	1,37	19,5
Hİ8	1,41	17,6
HS1	1,35	290,9
HS2	1,41	572,4
HS3	1,31	448,6
HS4	0,79	385,3
HS5	1,41	594,1
HS6	1,16	459,5
HS7	1,14	301,0
HS8	1,37	648,4

4.2 Mikroarray Analiz Sonuçları

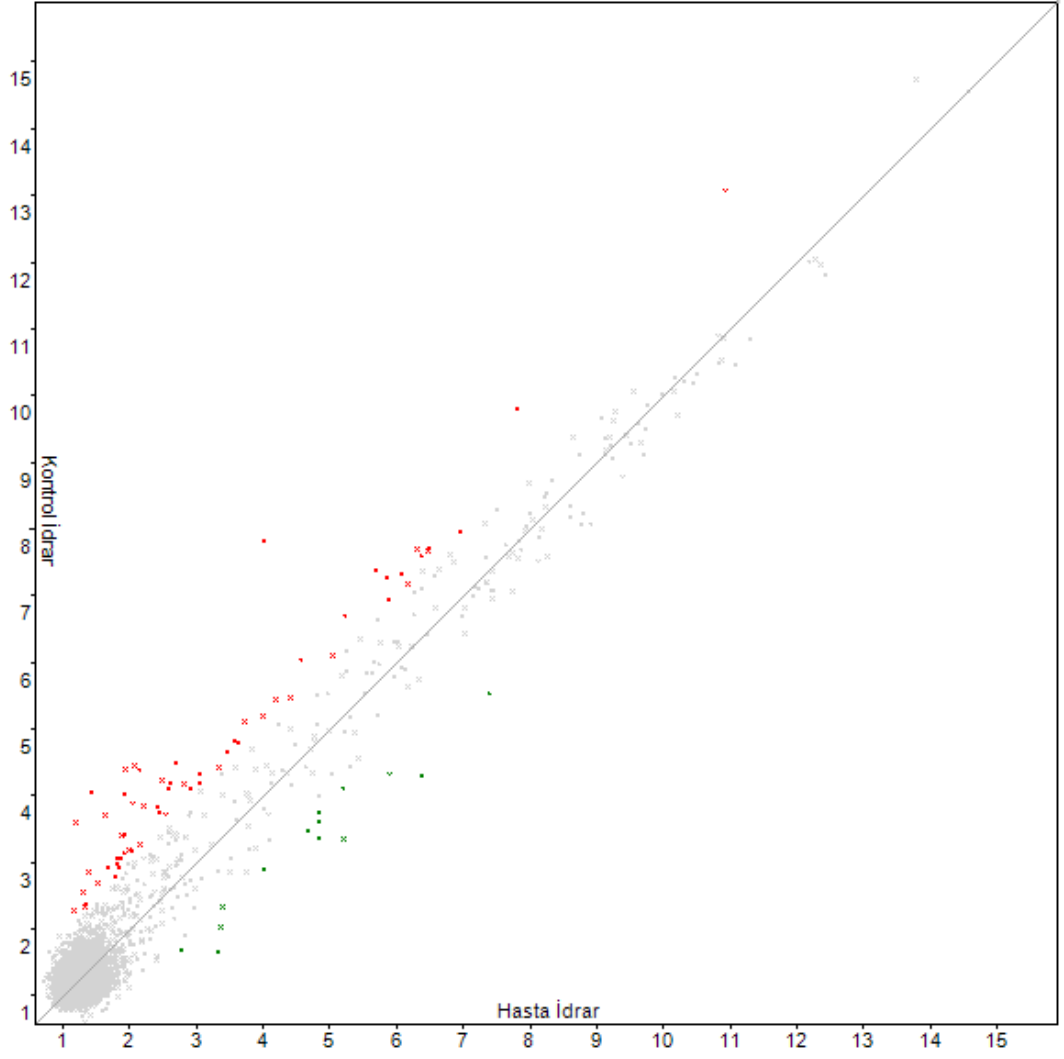
İdrar örneklerinde *GeneChip® miRNA4.0Array.-Affymetrix* ile tespit edilen miRNA'lar ve kontrol grubuna kıyasla ekspresyon değişimleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Aynı örneklere ait *Scatter Plot* sonucu Şekil 4.1'de *Heat Map Clustering* analizi ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: İdrar örneklerinde tespit edilen miRNA'lar ve kontrol grubuna kıyasla ekspresyon değişimleri.

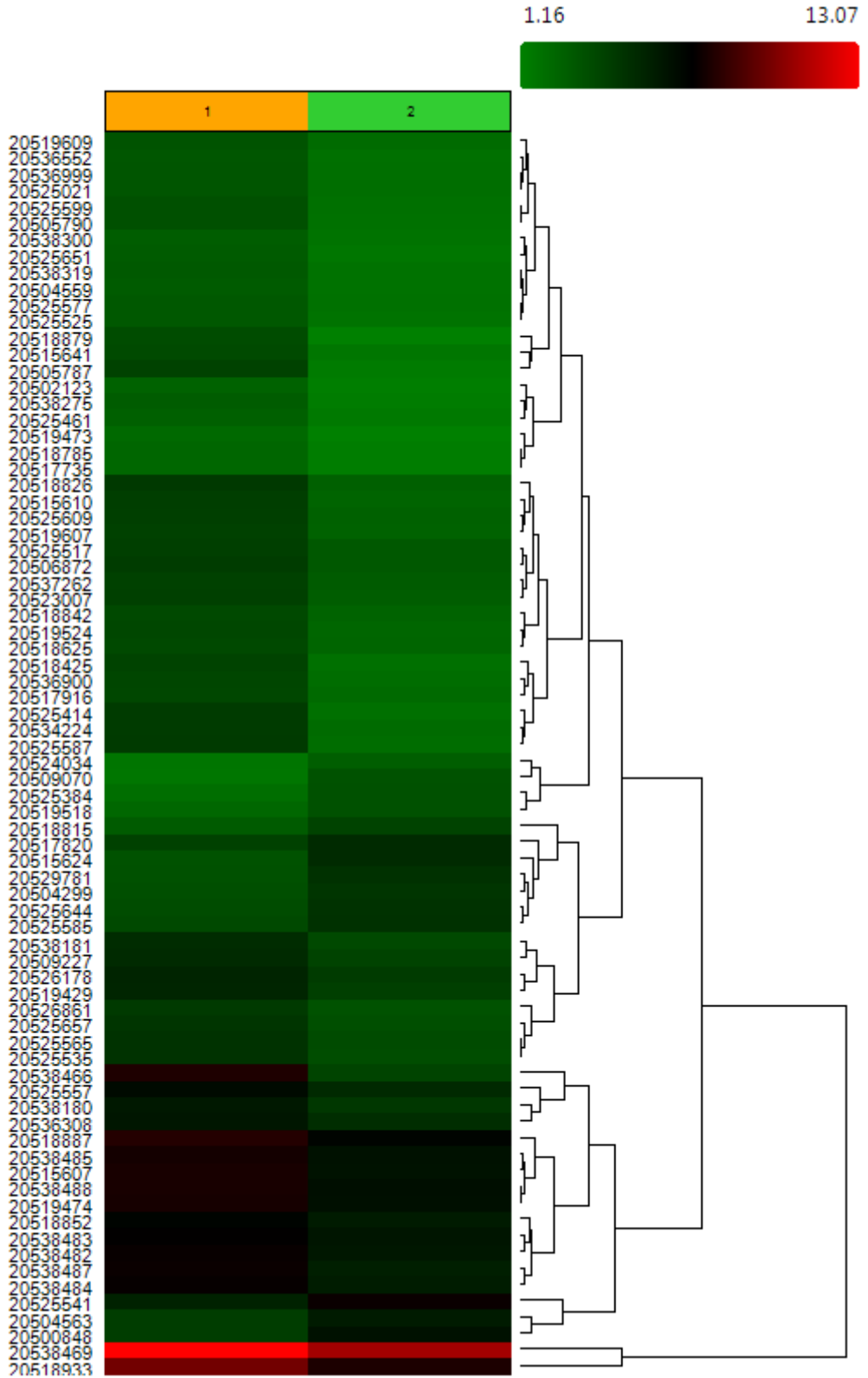
miRNA Transkripti	Erişim Kodu	Kat Değişimi
hsa-miR-744-5p	MIMAT0004945	6,21
hsa-miR-6726-5p	MIMAT0027353	5,49
hsa-miR-4485	MIMAT0019019	5,34
hsa-miR-6813-5p	MIMAT0027526	5,24
hsa-miR-3180	MIMAT0018178	4,33
hsa-miR-3197	MIMAT0015082	4,24
hsa-miR-4532	MIMAT0019071	3,99
hsa-mir-4674	MI0017305	3,57
hsa-miR-4449	MIMAT0018968	3,52
hsa-miR-3180-3p	MIMAT0015058	3,39
hsa-miR-3663-3p	MIMAT0018085	3,14
hsa-miR-6824-5p	MIMAT0027548	3,01
hsa-miR-885-3p	MIMAT0004948	2,91
hsa-miR-4749-5p	MIMAT0019885	2,9
hsa-miR-6819-5p	MIMAT0027538	2,84
hsa-miR-4706	MIMAT0019806	2,66
hsa-miR-3178	MIMAT0015055	2,6
hsa-miR-6075	MIMAT0023700	2,57
hsa-miR-3937	MIMAT0018352	2,47
hsa-miR-1275	MIMAT0005929	2,42
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	2,4
hsa-miR-6787-5p	MIMAT0027474	2,4
hsa-miR-6845-5p	MIMAT0027590	2,39
hsa-miR-4649-5p	MIMAT0019711	2,38
hsa-miR-6782-5p	MIMAT0027464	2,37
hsa-mir-3648	MI0016048	2,36
hsa-miR-4674	MIMAT0019756	2,32
hsa-mir-4758	MI0017399	2,31
hsa-miR-6808-5p	MIMAT0027516	2,3
hsa-mir-6090	MI0020367	2,3
hsa-miR-1909-3p	MIMAT0007883	2,29
hsa-miR-6848-5p	MIMAT0027596	2,29
hsa-miR-378h	MIMAT0018984	2,27
hsa-miR-6802-5p	MIMAT0027504	2,24
hsa-miR-6750-5p	MIMAT0027400	2,23
hsa-mir-4466	MI0016817	2,23
hsa-miR-6510-5p	MIMAT0025476	2,21
hsa-miR-6778-5p	MIMAT0027456	2,2
hsa-miR-4750-5p	MIMAT0019887	2,16

Tablo 4.2 (Devam): İdrar örneklerinde tespit edilen miRNA'lar ve kontrol grubuna kıyasla ekspresyon değişimleri.

miRNA Transkripti	Erişim Kodu	Kat Değişimi
hsa-miR-4673	MIMAT0019755	2,15
hsa-miR-7150	MIMAT0028211	2,14
hsa-miR-1224-5p	MIMAT0005458	2,13
hsa-miR-4467	MIMAT0018994	2,09
hsa-miR-7110-5p	MIMAT0028117	2,09
hsa-mir-320e	MI0014234	2,08
hsa-miR-4417	MIMAT0018929	2,05
hsa-miR-4274	MIMAT0016906	2,02
hsa-miR-4492	MIMAT0019027	2,02
hsa-miR-4701-3p	MIMAT0019799	-2,08
hsa-miR-6812-5p	MIMAT0027524	-2,12
hsa-miR-6124	MIMAT0024597	-2,13
hsa-miR-3613-5p	MIMAT0017990	-2,15
hsa-miR-4440	MIMAT0018958	-2,16
hsa-miR-575	MIMAT0003240	-2,28
hsa-miR-6840-3p	MIMAT0027583	-2,31
hsa-miR-6716-3p	MIMAT0025845	-2,52
hsa-miR-8071	MIMAT0030998	-2,76
hsa-miR-320c	MIMAT0005793	-2,99



Şekil 4.1: İdrar örneklerindeki hasta ve kontrol grubu için miRNA ekspresyonlarındaki değişimin *Scatter Plot* ile gösterimi.

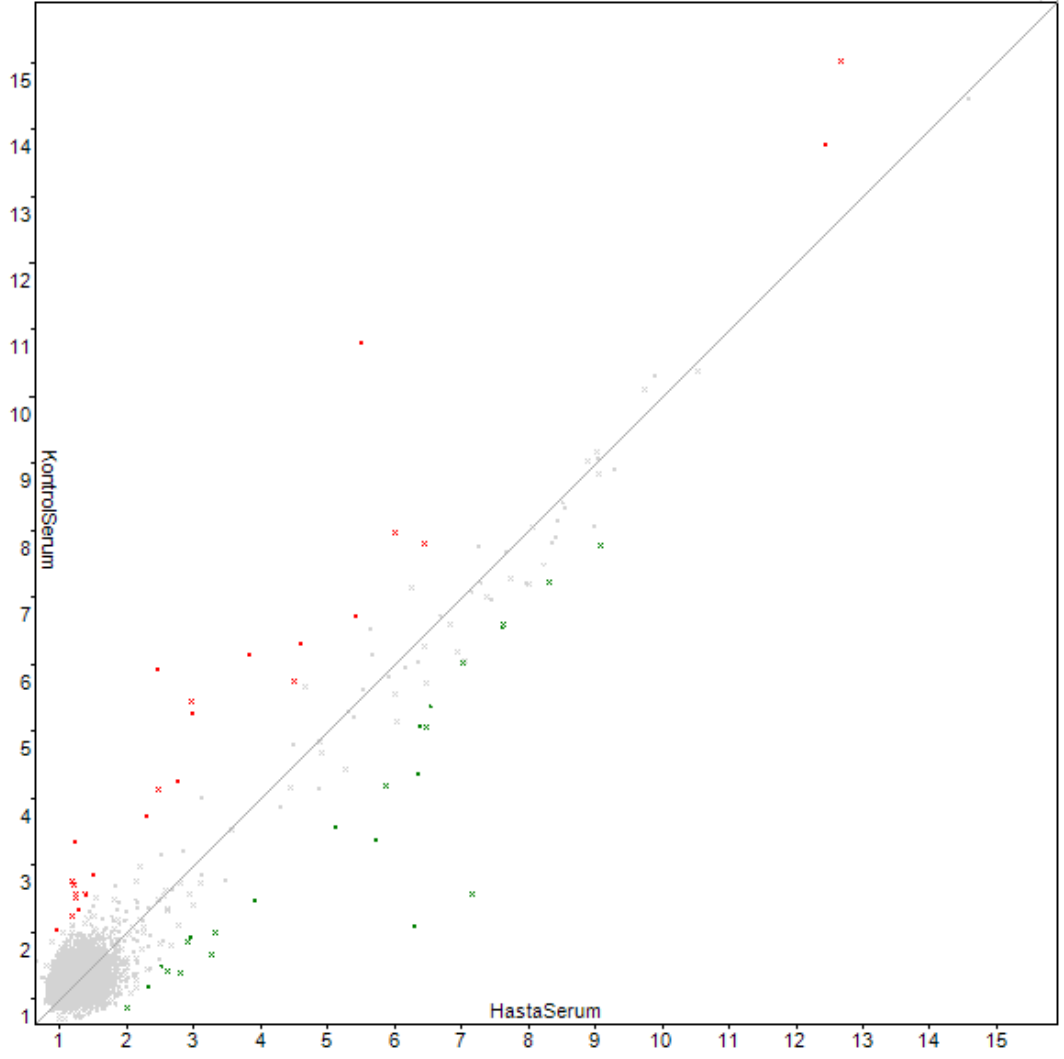


Şekil 4.2: İdrar örneklerinde eksprese olan miRNA'ların *Heat Map Clustering* analizi. Haritadaki renklerin dağılımı iki grup arasındaki miRNA örneklerini ifade etmektedir. Kırmızı renk ve parlaklık derecesi upregüle olan miRNA örneklerini göstermektedir. Yeşil renk ve parlaklık derecesi downregüle olan miRNA örneklerini göstermektedir.

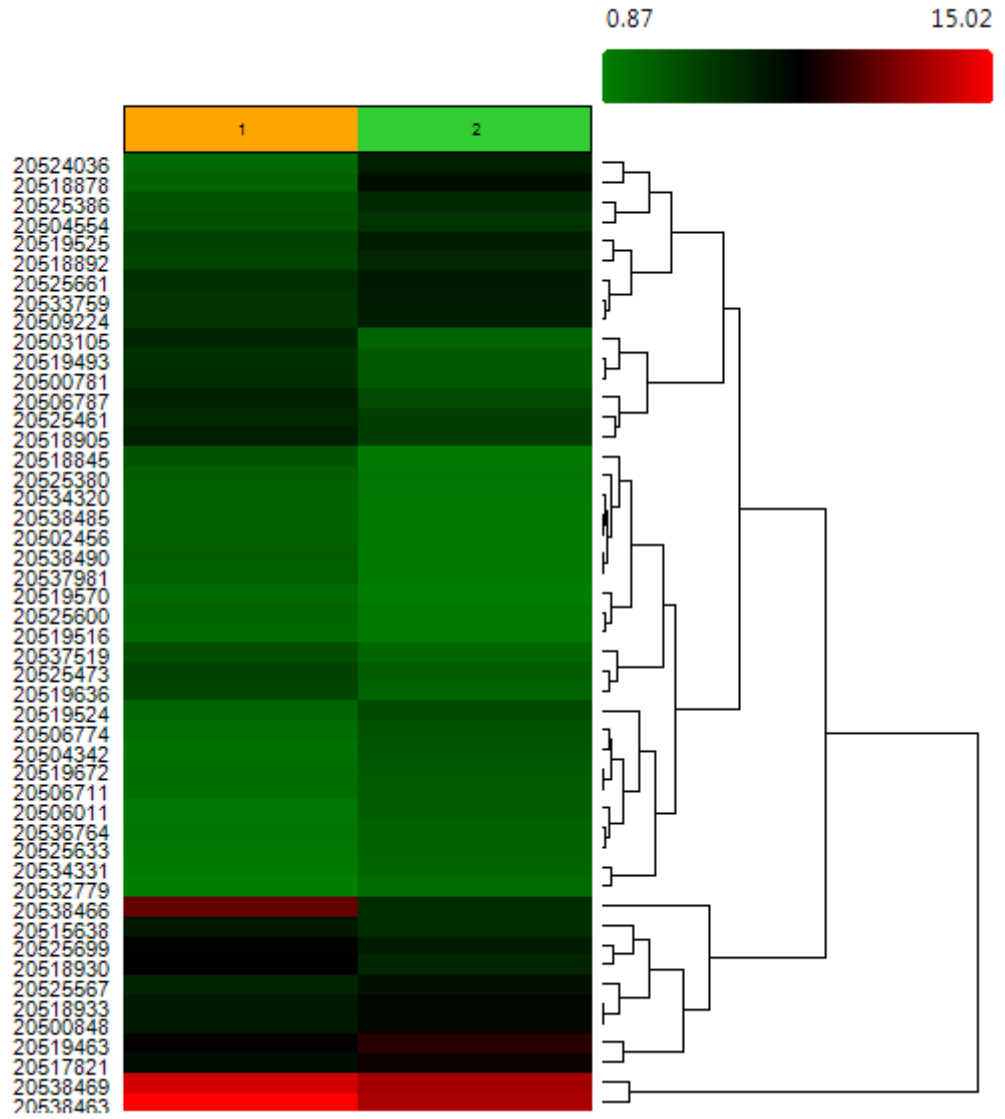
Serum örneklerinde GeneChip® miRNA4.0Array.-Affymetrix ile tespit edilen miRNA'lar ve kontrol grubuna kıyasla ekspresyon değişimleri Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Aynı örneklere ait *Scatter Plot* sonucu Şekil 4.3'te *Heat Map Clustering* analizi ise Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Serum örneklerinde tespit edilen miRNA'lar ve kontrol grubuna kıyasla ekspresyon değişimleri.

miRNA	Erişim Kodu	Kat Değişimi
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	11,02
hsa-miR-149-3p	MIMAT0004609	5,57
hsa-miR-1237-5p	MIMAT0022946	4,94
hsa-miR-4687-3p	MIMAT0019775	4,84
hsa-miR-4463	MIMAT0018987	4,38
hsa-miR-4529-3p	MIMAT0019068	3,93
hsa-miR-4508	MIMAT0019045	3,28
hsa-miR-4763-3p	MIMAT0019913	3,15
hsa-mir-7706	MI0025242	2,82
hsa-miR-6756-5p	MIMAT0027412	2,8
hsa-mir-6776	MI0022621	2,72
hsa-miR-6715a-3p	MIMAT0025841	2,55
hsa-miR-6869-5p	MIMAT0027638	2,55
hsa-miR-3196	MIMAT0015080	2,48
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	2,43
hsa-miR-6750-5p	MIMAT0027400	2,37
hsa-miR-4728-5p	MIMAT0019849	2,13
hsa-miR-4700-3p	MIMAT0019797	2,09
hsa-miR-6819-3p	MIMAT0027539	2,06
hsa-miR-6803-5p	MIMAT0027506	-2,01
hsa-miR-4785	MIMAT0019949	-2,03
hsa-miR-320a	MIMAT0000510	-2,05
hsa-miR-4532	MIMAT0019071	-2,05
hsa-mir-4490	MI0016852	-2,06
hsa-miR-1180-5p	MIMAT0026735	-2,08
hsa-miR-3613-3p	MIMAT0017991	-2,09
hsa-miR-6850-5p	MIMAT0027600	-2,22
hsa-miR-6780b-5p	MIMAT0027572	-2,28
hsa-miR-4668-5p	MIMAT0019745	-2,45
hsa-miR-1908-5p	MIMAT0007881	-2,48
hsa-miR-1228-5p	MIMAT0005582	-2,52
hsa-miR-940	MIMAT0004983	-2,65
hsa-miR-4706	MIMAT0019806	-2,72
hsa-miR-668-5p	MIMAT0026636	-2,95
hsa-miR-602	MIMAT0003270	-3
hsa-miR-4707-5p	MIMAT0019807	-3,96
hsa-miR-6511b-5p	MIMAT0025847	-5,07
hsa-miR-6126	MIMAT0024599	-18,39
hsa-miR-4484	MIMAT0019018	-23,97



Şekil 4.3: Serum örneklerindeki hasta ve kontrol grubu için miRNA ekspresyonlarındaki değişimin *Scatter Plot* ile gösterimi.



Şekil 4.4: Serum örneklerinde eksprese olan miRNA'ların *Heat Map Clustering* analizi. Haritadaki renklerin dağılımı iki grup arasındaki miRNA örneklerini ifade etmektedir. Kırmızı renk ve parlaklık derecesi upregüle olan miRNA örneklerini göstermektedir. Yeşil renk ve parlaklık derecesi downregüle olan miRNA örneklerini göstermektedir.

4.3 Serum ve İdrar Örneklerinde Ortak Olarak Bulunan MikroRNA'lar

Serum ve idrarda ortak olarak tespit edilen miRNA'ların kontrol grubuna kıyasla ekspresyon değişimleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

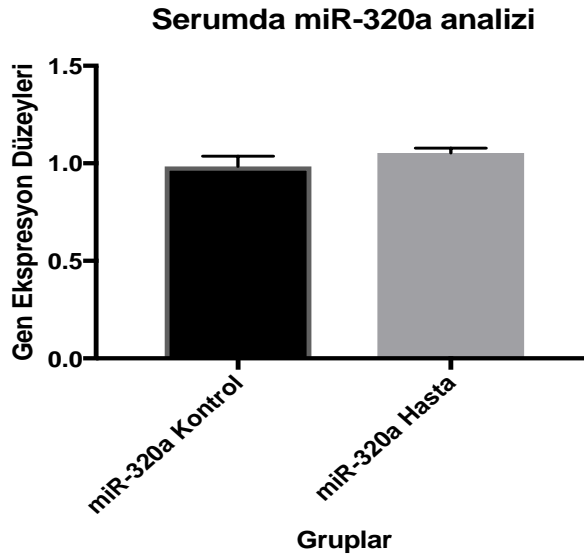
Tablo 4.4: Serum ve idrar örneklerinde ortak olarak ekspresyonu değişen miRNA'lar.

miRNA	Erişim Kodu	Kat Değişimi (İdrar)	Kat Değişimi(Serum)
hsa-miR-4532	MIMAT0019071	3,99	-2,05
hsa-miR-6750-5p	MIMAT0027400	2,23	2,37
hsa-miR-4706	MIMAT0019806	2,66	-2,72
hsa-miR-320a	MIMAT0000510	-4,2	-2,05

Mikroarray analiz sonucuna göre hastalara ait idrar ve serum örneklerinde ortak olarak ekspresyonu değişen 4 miRNA'dan idrarda ve serumda aynı anda downregüle ve upregüle olan miR320a ile miR6750-5p ileriki analizler için seçilmiştir.

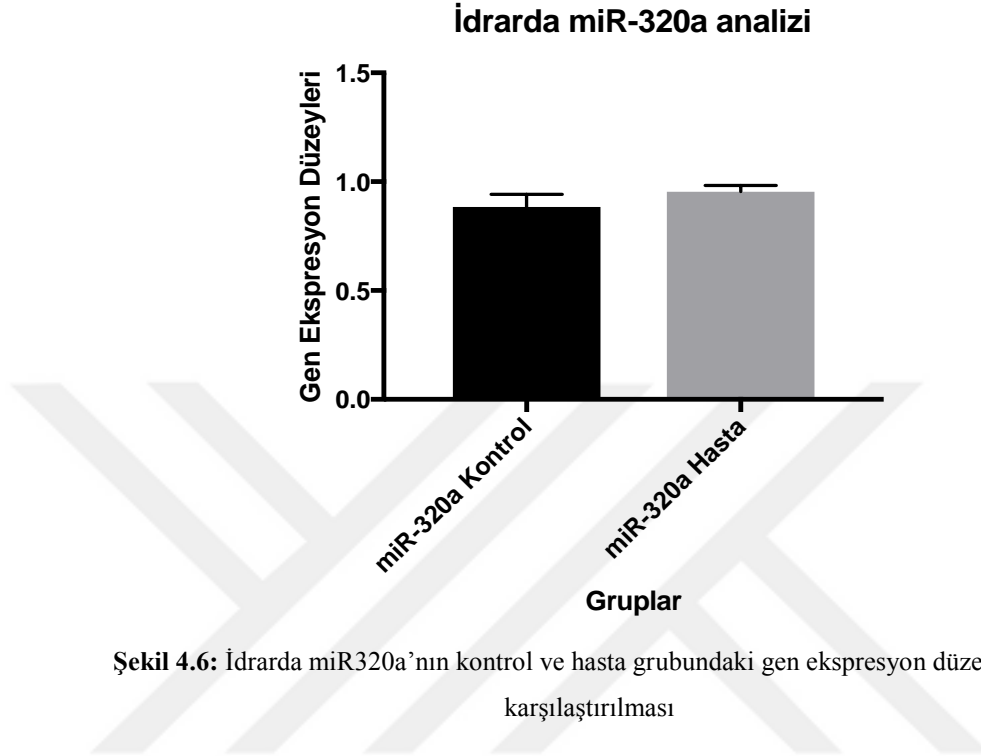
4.4 Real Time PCR Bulguları

Referans gen RNU6-2 kullanılarak miR320a için real time PCR analizi sonucu serum örnekleri için p değeri 0,0317 olarak belirlenerek istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Serumda miR320a'nın kontrol ve hasta grubundaki gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

Referans gen RNU6-2 kullanılarak miR320a için real time PCR analizi sonucu idrar örnekleri için p değeri 0,0106 olarak belirlenerek istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.6).

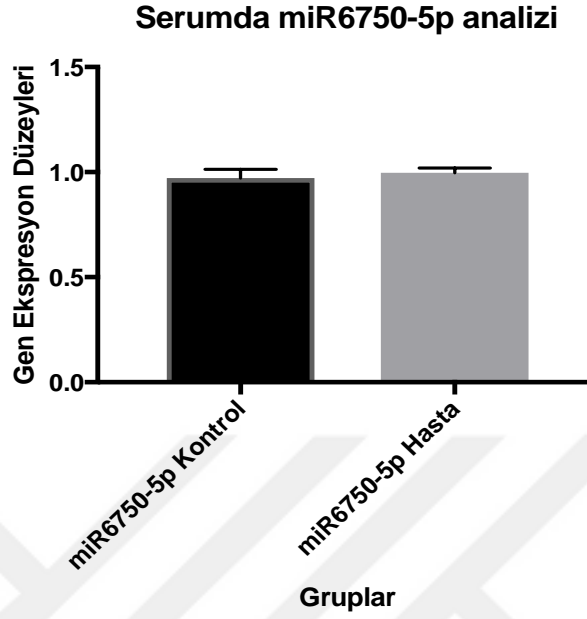


Bu çalışmada, prostat kanseri hastalarına ait serum ve idrar örneklerini sağlıklı kontrol grubuyla kıyasladığımızda miR320a'nın ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğunu ve prostat kanseri hastalarında miR320a'nın upregüle olduğunu göstermiş bulunmaktayız. miR320a'nın serum ve idrar örneklerinde ortak olarak ekspresyon artışı göstermiş olduğumuz bu çalışmamızı destekler nitelikteki en kapsamlı çalışma Porkka ve arkadaşlarının 2007 yılında prostat kanseri dokusu ve BPH dokusu ile yapmış oldukları çalışmadır. Bu çalışmada 37'si downregüle, 14'ü upregüle olan toplamda 51 farklı miRNA tespit edilmiş ve 8 prostat karsinom örneği BPH örnekleri ile kıyaslandığında miR320 ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu ($p=0,0028$), miR320'nin karsinomlarda upregüle olduğu gösterilmiştir [86]. Çalışmamızda prostat kanseri hastalarının serum ve idrar örneklerinde ortak olarak ekspresyon artışı tespit ettiğimiz miR320a'nın Porkka ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada doku örneklerinde de ekspresyon artışının tespit edilmesi bizim sonuçlarımızla korelasyon göstermektedir. Diğer yandan farklı kanser türlerinde de

miR320a'nın ekspresyon artışı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bunun en önemli örneği Ristou ve arkadaşlarının 2014 yılında 35 kolorektal kanseri hastasının cerrahi öncesi ve sonrası plazma örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası alınan plazma örneklerinde 9 farklı miRNA tespit edilmiş olup, cerrahi öncesinde upregüle olan miR320a'nın cerrahi sonrasındaki süreçte ise ekspresyonunda azalma olduğu gösterilmiştir [87]. Bu çalışmaya ek olarak Ferracin ve arkadaşlarının 2015 yılında melanoma, meme, akciğer, kolorektal ve tiroid kanseri hastaları ve sağlıklı kontrollerin plazma ve serum örneklerinde yaptıkları çalışmada ekspresyon seviyelerinde değişiklik gözlenen 9 farklı miRNA tespit edilmiştir. Tespit edilen bu miRNA'lardan miR320a'nın melanomalı bireylerde sağlıklı kontrollere kıyasla ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir [88]. Ferracin ve arkadaşlarının bu çalışması ile de miR320a'nın melanomada upregüle olması çalışmamızı destekler niteliktedir.

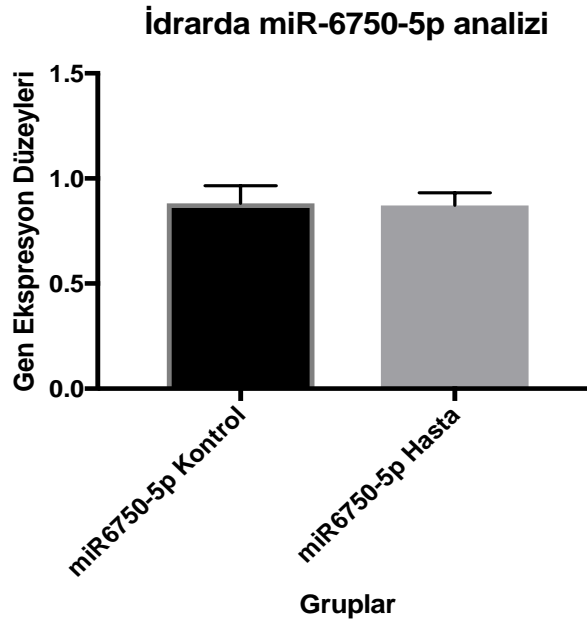
Çalışmamızda prostat kanseri hastalarından elde edilen kan ve idrar örneklerinde ekspresyon artışı gösteren miR320a'nın farklı çalışmalarda ekspresyon seviyesinde azalma olduğu saptanmıştır. 2016 yılında Okato ve arkadaşları 15 normal prostat dokusu, 15 prostat kanseri dokusu ve 8 kastrasyona dirençli prostat kanseri dokusuyla yaptıkları çalışmada miR320a ekspresyonu değişikliklerini incelemişlerdir. Buna göre, normal prostat dokusuna kıyasla prostat kanseri dokusunda miR320a ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ve miR320a'nın hedefi olan lizozomal ilişkili protein 1 (LAMP1)'in susturulmasıyla prostat kanseri hücre hattında hücre proliferasyonu, hücre göçü ve istilasının önemli ölçüde inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu çalışma ile miR320a'nın tümör supresör olarak görev yapabileceği önerilmektedir [89]. Tümör supresör olarak görev alan miR320a'nın gösterildiği diğer çalışma ise Ge ve arkadaşlarının 2017 yılında mide kanseri primer tümörlerinde sağlıklı kontrollere kıyasla miR320a'nın ekspresyonunda anlamlı bir azalma olduğunu gösterdikleri çalışmadır. MiR320a hedefi olan *metallopeptidase domain 10* (ADAM10)'nun attenüe edilmesi sonucu hücre proliferasyonunda azalma olduğunu ve miR320a'nın mide kanserinde tümör baskılayıcı olduğunu belirtmişlerdir [90].

Referans gen RNU6-2 kullanılarak miR6750-5p için real time PCR analizi sonucu serum örnekleri için p değeri 0,3175 olarak belirlenerek istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.7).



Şekil4.7: Serumda miR6750-5p'nin kontrol ve hasta grubundaki gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

Referans gen RNU6-2 kullanılarak miR6750-5p için real time PCR analizi sonucu idrar örnekleri için p değeri 0,9591 olarak belirlenerek istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: İdrarda miR6750-5p'nin kontrol ve hasta grubundaki gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

Bu tez çalışmasında miR320a haricinde serum ve idrar örneklerinde ortak olarak ekspresyon değişimi gözlenen miR6750-5p'nin ekspresyon düzeyleri de incelenmiştir. İstatiksel olarak anlamlı bulunmamasına karşın prostat kanseri hastalarına ait serum ve idrar örneklerinde kontrol grubuna kıyasla miR6750-5p ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Bizim bilgilerimize göre literatürde prostat kanserinde miR6750-5p'yi içeren bir çalışma bulunmamasına karşın, diğer kanserlerde ise 2017 yılında Ma ve arkadaşlarının küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarında yapmış oldukları sadece bir çalışma bulunmaktadır. A549/GR hücre hattında yapmış oldukları bu çalışmada IGF-1R (*insulin-like growth factor 1 reseptor*) geninin susturulmasıyla 13'ü upregüle, 59'u downregüle olan toplamda 72 farklı miRNA tespit etmişlerdir ve miR6750-5p'nin downregüle olduğu gösterilmiştir [91].

Karsinoma örneklerinde miRNA'ların farklı ekspre edilmesi, mekanik olarak kanser gelişiminde rol oynayabileceklerini düşündürmektedir. Prostat kanserinde bireysel miRNA'ların rolünü aydınlatmak için farklı olarak ifade edilen miRNA'lar tarafından düzenlenen genler ve yolaklar üzerinde çalışılmaktadır [86]. Yapılan çalışmalar, tümör dokularında farklı olarak eksprese edilen miRNA'ların plazma, serum veya idrar gibi vücut sıvılarında prostat kanseri için tanımlayıcı, prognostik ve terapötik biyomarker olarak işlev gördüğünü ortaya koymaktadır [83].

Çalışma verilerine bakıldığında mikroarray sonuçları ile yapmış olduğumuz real time pcr sonuçlarımız korelasyon göstermemektedir. Mikroarrayde hasta ve kontrol grubuna ait örnekler kendi grupları içinde *pool* yapılarak analiz edilmiş, real time pcr'da ise her birey için ayrı ayrı analiz yapılmıştır. Bu sebeplerden ötürü çalışma sonuçlarımız real time pcr bulguları üzerinden değerlendirilmiş olup, mikroarray sadece kan ve idrarda ortak olan miRNA'ların tespiti için kullanılmıştır.

Çalışmamızda prostat kanserinde serum ve idrar örneklerinde kontrol grubuna kıyasla miR320a ve miR6750-5p'nin ekspresyon seviyesinde artış tespit edilmiş, bu durum bu miRNA'ların onkogenik miRNA olarak işlev yapabildiğini düşündürmektedir. Literatürde ekspresyon düzeyinde artış gözlemlediğimiz miR320a ve miR6750-5p ile ilgili karşıt çalışmalar bulunmaktadır. Ancak kanser türlerinde miRNA'ların ekspresyon değişikliklerinin farklılığı, miRNA'ların dokuya spesifik olması nedeniyle köken olarak birbirinden ayrı hücrelerden kaynaklı kanserlerde farklı miRNA'ların upregüle veya downregüle olması öne sürülmektedir [86]. miRNA'nın hücrel büyüme üzerindeki etkisi, tümör büyümesini yönlendiren veya

bastıran transkriptlerin sentezlenmesine bağlıdır. Bundan yola çıkararak birçok miRNA'nın çeşitli kanserlerde, onkogenik etkisi görülürken diğer kanserlerde tümör baskılayıcı etkisi görülebilmektedir [58].

Çalışmamızda prostat kanserinde, ortak olarak serumda ve idrarda kontrol grubuna kıyasla hasta örneklerinde miR320a ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiş, miR6750-5p'de ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına karşın hasta örneklerinde ekspresyon düzeyinde artış gözlenmiştir. Sonuçlarımız, prostat kanserinde serumda ve idrarda ekspresyonu değişen ortak miRNA'ları ortaya çıkar mıştır. Bu alışma prostat kanseri tanısında önemli olabilecek aday biyomarker miRNA'ların tespit edilmesi için bir n çalışma niteliğindedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Prostat kanseri hasta ve sağlıklı kontrollere ait serum ve idrar örneklerinden miRNA mikroarray taraması yapılmış, ekspresyon değişimi gözlenen serumda 40 farklı, idrarda ise 63 farklı miRNA tespit edilmiştir. Tespit edilen miRNA'lardan serum ve idrarda ortak olarak ekspresyon değişimi gözlenen 4 farklı miRNA tespit edilmiştir. Belirlenen miRNA'lar arasından serum ve idrar örneklerinde ortak olarak ekspresyonu artan ve azalan miR320a ve miR6750-5p seçilerek real time PCR yapılmıştır. Referans gen olarak RNU6-2 kullanılarak gerçekleştirdiğimiz real time PCR sonuçlarımıza göre, miR320a ekspresyonunda istatistiksel olarak hasta örneklerinde anlamlı bir artış gözlenmiş, miR6750-5p'de ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına karşın hasta örneklerinde ekspresyon düzeyinde artış gözlenmiştir.

Yapmış olduğumuz bu tez çalışması ile prostat kanserinde idrar ve serum örneklerinde ekspresyon değişimi gözlenen miRNA'ları tespit ederek miRNA'ların prostat kanseri tanısında biyomarker olarak kullanılması yönünde bir ön veri oluşturmuş bulunmaktayız. Çalışmada kullanılan örnek sayısının arttırılması, idrar ve serumda belirlenen miRNA'ların kanser dokusunda da belirlenerek çalışmanın desteklenmesine ihtiyaç vardır. Daha ileriki aşamalarda ise belirlenen miRNA'ların hedef genlerinin tespitiyle hücresel süreçte rollerinin araştırılması ve yolak analizi yapılması çalışmanın desteklenmesi açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(1): p. 11-30.
2. Guzel, E., et al., *Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with prostate cancer*. Int J Cancer, 2015. **136**(4): p. 875-9.
3. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
4. Korzeniewski, N., et al., *Identification of cell-free microRNAs in the urine of patients with prostate cancer*. Urol Oncol, 2015. **33**(1): p. 16 e17-16 e22.
5. Selbach, M., et al., *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 58-63.
6. Kwak, P.B., S. Iwasaki, and Y. Tomari, *The microRNA pathway and cancer*. Cancer Sci, 2010. **101**(11): p. 2309-15.
7. Dijkstra, S., P.F. Mulders, and J.A. Schalken, *Clinical use of novel urine and blood based prostate cancer biomarkers: a review*. Clin Biochem, 2014. **47**(10-11): p. 889-96.
8. Bryant, R.J., et al., *Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer*. Br J Cancer, 2012. **106**(4): p. 768-74.
9. *Prostate Cancer Treatment (PDQ(R)): Patient Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*. 2002: Bethesda (MD).
10. Kgtle, M.M., et al., *Prostate Cancer: Epigenetic Alterations, Risk Factors, and Therapy*. Prostate Cancer, 2016. **2016**: p. 5653862.
11. Catalona, W.J., et al., *Comparison of prostate specific antigen concentration versus prostate specific antigen density in the early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves*. J Urol, 1994. **152**(6 Pt 1): p. 2031-6.
12. Barry, M.J., *Screening for prostate cancer--the controversy that refuses to die*. N Engl J Med, 2009. **360**(13): p. 1351-4.
13. *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. 2012 [cited 2017 07.11.2017]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>
14. Bashir, M.N., *Epidemiology of Prostate Cancer*. Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(13): p. 5137-41.
15. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
16. Hassanipour-Azgom, S., et al., *Incidence and mortality of prostate cancer and their relationship with the Human Development Index worldwide*. Prostate Int, 2016. **4**(3): p. 118-24.
17. Gronberg, H., *Prostate cancer epidemiology*. Lancet, 2003. **361**(9360): p. 859-64.
18. Vanacore, D., et al., *Micrnas in prostate cancer: an overview*. Oncotarget, 2017. **8**(30): p. 50240-50251.
19. Zorlu, F., et al., *Prostate cancer incidence in Turkey: an epidemiological study*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(21): p. 9125-30.

20. Loeb, S. and W.J. Catalona, *Prostate-specific antigen in clinical practice*. Cancer Lett, 2007. **249**(1): p. 30-9.
21. Gleason, D.F. and G.T. Mellinger, *Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging*. J Urol, 1974. **111**(1): p. 58-64.
22. Munkley, J., et al., *RNA splicing and splicing regulator changes in prostate cancer pathology*. Hum Genet, 2017.
23. Oesterling, J.E., *Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate*. J Urol, 1991. **145**(5): p. 907-23.
24. Deng, J., et al., *Long Non-Coding RNA as Potential Biomarker for Prostate Cancer: Is It Making a Difference?* Int J Environ Res Public Health, 2017. **14**(3).
25. Barry, M.J., *Clinical practice. Prostate-specific-antigen testing for early diagnosis of prostate cancer*. N Engl J Med, 2001. **344**(18): p. 1373-7.
26. Lilja, H., D. Ulmert, and A.J. Vickers, *Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(4): p. 268-78.
27. Schroder, F.H., et al., *Early detection of prostate cancer in 2007. Part 1: PSA and PSA kinetics*. Eur Urol, 2008. **53**(3): p. 468-77.
28. Berges, R.R., et al., *Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(5): p. 473-80.
29. Graham, M.K. and A. Meeker, *Telomeres and telomerase in prostate cancer development and therapy*. Nat Rev Urol, 2017. **14**(10): p. 607-619.
30. Dasari, S., et al., *Vitamin K and its analogs: Potential avenues for prostate cancer management*. Oncotarget, 2017. **8**(34): p. 57782-57799.
31. Karan, D., et al., *Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas*. Int J Cancer, 2003. **103**(3): p. 285-93.
32. Shukla, S.N., et al., *Synthesis, Spectroscopic Characterization and Antibacterial Activity of some Chloro Dimethylsulphoxide/Tetramethylenesulphoxide Ruthenium (II)/(III) Complexes with 1, 2, 3-Benzotriazole*. Acta Chim Slov, 2011. **58**(3): p. 542-8.
33. Joshi, G., et al., *Growth factors mediated cell signalling in prostate cancer progression: Implications in discovery of anti-prostate cancer agents*. Chem Biol Interact, 2015. **240**: p. 120-33.
34. Gordetsky, J. and J. Epstein, *Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications*. Diagn Pathol, 2016. **11**: p. 25.
35. Chen, N. and Q. Zhou, *The evolving Gleason grading system*. Chin J Cancer Res, 2016. **28**(1): p. 58-64.
36. Cury, J., R.F. Coelho, and M. Srougi, *Well-differentiated prostate cancer in core biopsy specimens may be associated with extraprostatic disease*. Sao Paulo Med J, 2008. **126**(2): p. 119-22.
37. Steinberg, D.M., et al., *Correlation of prostate needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings*. Am J Surg Pathol, 1997. **21**(5): p. 566-76.
38. Baisden, B.L., H. Kahane, and J.I. Epstein, *Perineural invasion, mucinous fibroplasia, and glomerulations: diagnostic features of limited cancer on prostate needle biopsy*. Am J Surg Pathol, 1999. **23**(8): p. 918-24.

39. Robinson, B.D. and J.I. Epstein, *Intraductal carcinoma of the prostate without invasive carcinoma on needle biopsy: emphasis on radical prostatectomy findings*. J Urol, 2010. **184**(4): p. 1328-33.
40. El Hajj, N., M. Dittrich, and T. Haaf, *Epigenetic dysregulation of protocadherins in human disease*. Semin Cell Dev Biol, 2017. **69**: p. 172-182.
41. Bishop, K.S., H. Xu, and G. Marlow, *Epigenetic Regulation of Gene Expression Induced by Butyrate in Colorectal Cancer: Involvement of MicroRNA*. Genet Epigenet, 2017. **9**: p. 1179237X17729900.
42. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
43. Chen, Q.W., et al., *Epigenetic regulation and cancer (review)*. Oncol Rep, 2014. **31**(2): p. 523-32.
44. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33** **Suppl**: p. 245-54.
45. Smith, Z.D. and A. Meissner, *DNA methylation: roles in mammalian development*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(3): p. 204-20.
46. Weber, M. and D. Schubeler, *Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(3): p. 273-80.
47. International Human Genome Sequencing, C., *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 931-45.
48. Zhang, Y., et al., *Decoding Noncoding RNAs: Role of MicroRNAs and Long Noncoding RNAs in Ocular Neovascularization*. Theranostics, 2017. **7**(12): p. 3155-3167.
49. Consortium, E.P., et al., *Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project*. Nature, 2007. **447**(7146): p. 799-816.
50. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1559-63.
51. Ponting, C.P. and T.G. Belgard, *Transcribed dark matter: meaning or myth?* Hum Mol Genet, 2010. **19**(R2): p. R162-8.
52. Li, X., et al., *Noncoding RNA in drug resistant sarcoma*. Oncotarget, 2017. **8**(40): p. 69086-69104.
53. Michalik, K.M., et al., *Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth*. Circ Res, 2014. **114**(9): p. 1389-97.
54. Sana, J., et al., *Novel classes of non-coding RNAs and cancer*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 103.
55. Kapranov, P., et al., *RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription*. Science, 2007. **316**(5830): p. 1484-8.
56. Oliveto, S., et al., *Role of microRNAs in translation regulation and cancer*. World J Biol Chem, 2017. **8**(1): p. 45-56.
57. Celano, M., et al., *MicroRNAs as Biomarkers in Thyroid Carcinoma*. Int J Genomics, 2017. **2017**: p. 6496570.
58. Monteleone, N.J. and C.S. Lutz, *miR-708-5p: a microRNA with emerging roles in cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(41): p. 71292-71316.
59. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.

60. Lin, S. and R.I. Gregory, *MicroRNA biogenesis pathways in cancer*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(6): p. 321-33.
61. Masuda, T., et al., *MicroRNAs as Biomarkers in Colorectal Cancer*. Cancers (Basel), 2017. **9**(9).
62. Michael, M.Z., et al., *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(12): p. 882-91.
63. Huang, Y., et al., *Biological functions of microRNAs: a review*. J Physiol Biochem, 2011. **67**(1): p. 129-39.
64. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
65. Bounds, K.R., et al., *MicroRNAs: New Players in the Pathobiology of Preeclampsia*. Front Cardiovasc Med, 2017. **4**: p. 60.
66. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
67. Liu, X., et al., *Bioinformatic analysis of microRNA biogenesis and function related proteins in eleven animal genomes*. J Genet Genomics, 2009. **36**(10): p. 591-601.
68. Wilson, R.C., et al., *Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis*. Mol Cell, 2015. **57**(3): p. 397-407.
69. Detassis, S., et al., *microRNAs Make the Call in Cancer Personalized Medicine*. Front Cell Dev Biol, 2017. **5**: p. 86.
70. Yekta, S., I.H. Shih, and D.P. Bartel, *MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA*. Science, 2004. **304**(5670): p. 594-6.
71. ZAMANI, A.G. and A. ZAMANI, *MikroRNA'lar ve ve akciğer kanseri* Tuberk Toraks, 2013. **61**(1): p. 57-62.
72. Ipsaro, J.J. and L. Joshua-Tor, *From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(1): p. 20-8.
73. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
74. Reddy, K.B., *MicroRNA (miRNA) in cancer*. Cancer Cell Int, 2015. **15**: p. 38.
75. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
76. Hayes, J., P.P. Peruzzi, and S. Lawler, *MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy*. Trends Mol Med, 2014. **20**(8): p. 460-9.
77. Ziebarth, J.D., A. Bhattacharya, and Y. Cui, *Integrative analysis of somatic mutations altering microRNA targeting in cancer genomes*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47137.
78. Zhang, B., et al., *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. Dev Biol, 2007. **302**(1): p. 1-12.
79. Medina, P.P., M. Nolde, and F.J. Slack, *OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma*. Nature, 2010. **467**(7311): p. 86-90.
80. Svoronos, A.A., D.M. Engelman, and F.J. Slack, *OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer*. Cancer Res, 2016. **76**(13): p. 3666-70.
81. Hammond, S.M., *microRNA detection comes of age*. Nat Methods, 2006. **3**(1): p. 12-3.

82. Fang, Y.X. and W.Q. Gao, *Roles of microRNAs during prostatic tumorigenesis and tumor progression*. *Oncogene*, 2014. **33**(2): p. 135-47.
83. Goto, Y., et al., *Functional significance of aberrantly expressed microRNAs in prostate cancer*. *Int J Urol*, 2015. **22**(3): p. 242-52.
84. Catto, J.W., et al., *MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review*. *Eur Urol*, 2011. **59**(5): p. 671-81.
85. Jackson, B.L., A. Grabowska, and H.L. Ratan, *MicroRNA in prostate cancer: functional importance and potential as circulating biomarkers*. *BMC Cancer*, 2014. **14**: p. 930.
86. Porkka, K.P., et al., *MicroRNA expression profiling in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(13): p. 6130-5.
87. Ristau, J., et al., *Suitability of circulating miRNAs as potential prognostic markers in colorectal cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014. **23**(12): p. 2632-7.
88. Ferracin, M., et al., *Absolute quantification of cell-free microRNAs in cancer patients*. *Oncotarget*, 2015. **6**(16): p. 14545-55.
89. Okato, A., et al., *Direct regulation of LAMP1 by tumor-suppressive microRNA-320a in prostate cancer*. *Int J Oncol*, 2016. **49**(1): p. 111-22.
90. Ge, X., et al., *miR-320a modulates cell growth and chemosensitivity via regulating ADAM10 in gastric cancer*. *Mol Med Rep*, 2017. **16**(6): p. 9664-9670.
91. Ma, W., et al., *Identification of microRNAs involved in gefitinib resistance of non-small-cell lung cancer through the insulin-like growth factor receptor 1 signaling pathway*. *Exp Ther Med*, 2017. **14**(4): p. 2853-2862.







EKLER

EK A: Etik Kurul Kararı



EK A

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prostat Kanseri Hastalarında Kan ve İdrar Örneklerinde miRNA Düzeylerinin Karşılaştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2

02.12.2015

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ	Adnan Menderes Bulvarı Vatan caddesi 34093 Fatih/İstanbul
	TELEFON	(0212) 523 22 88 - 1028
	FAKS	(0212) 533 23 26
	E-POSTA	etikkurulu@bezmianlem.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Nur Özten KANDAŞ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Farmakoloji ve Toksikoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	Bezmialem Vakıf Üniversitesi BAP Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tabii cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma (akademik amaçlı)		<input checked="" type="checkbox"/> Biyolojik ürünlerle yapılan klinik araştırma			
DİĞER İSE BELİRTİNİZ					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Version Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	01.12.2015	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU(Hasta ve kontrol grubuna yönelik)	-	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Rona ERKOÇ

Sayfa 1 / 3

EK A**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU**

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prostat Kanseri Hastalarında Kan ve İdrar Örneklerinde miRNA Düzeylerinin Karşılaştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2

	Belge Adı		Açıklama
	DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	<input type="checkbox"/>
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		<input checked="" type="checkbox"/>	28.09.2015, V.2, 01.12.2015 imza tarihli
BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU		<input type="checkbox"/>	
ILAN		<input type="checkbox"/>	
YILLIK BİLDİRİM		<input type="checkbox"/>	
SONUÇ RAPORU		<input type="checkbox"/>	
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		<input type="checkbox"/>	
DİĞER:		<input checked="" type="checkbox"/>	<ul style="list-style-type: none">- Klinik Araştırma Başvuru Formu (doküman no: KA-1, 07.09.2015)- Sorumlu araştırmacı ve yardımcı araştırmacılara ait özgeçmiş formları- Çalışmanın Helsinki Bildirgesi, İKLU/İLU'ya uygun yürütüleceğine dair tashihname- Araştırma ile ilgili yayınlar
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:22 / 30	Tarih: 02.12.2015	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmacının/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

EK A

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Prostat Kanseri Hastalarında Kan ve İdrar Örneklerinde miRNA Düzeylerinin Karşılaştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Reha ERKOÇ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
			E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Reha ERKOÇ	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Orhan ÖZTURAN	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Faruk ÖKTEM	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özcan KARAMAN	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Adem KIRIŞ	Radyoloji	Mehmet Akif Ersoy G.K.D.C Eğitim Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ahmet MİHMANLI	Ağız-Diş ve Çene Cerrahisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hayrullah KÖSE	Biyofizik	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ertuğrul KAYA	Tıbbi Farmakoloji	Düzce Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL	Bioistatistik ve Tıp Bilişimi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İbrahim TOPÇU	Deontoloji ve Tıp Tarihi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Mehmet AKHOROZ	Emekli	Kurum Dışı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Avukat Aybülke EKİCİ	Hukuk	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

Karar: Onaylandı Reddedildi

Sayfa 3 / 3

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Reha ERKOÇ

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Sevde HASANOĞLU
Doğum Tarihi ve Yeri : 09.06.1992 / FATİH
E-posta : sevde.hasanoglu@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2014, Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2012-2013 yılları arasında TÜBİTAK destekli ‘İnsülin hormonunun üropatojen *E. coli* suşunda virulans gen(ler)in ekspresyonu üzerine etkisi’ adlı projede yardımcı araştırmacı olarak çalıştı.
- Mart 2016- Ekim 2017 tarihleri arasında TÜBİTAK destekli ‘Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsüne Özgü Serolojik Tanı Sistemlerinin Geliştirilmesi’ adlı projede teknisyen olarak çalıştı.

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Hasanoğlu S., Göncü B., Yücesan E., Kayalı Y., Kandaş N.** 2017. Prostat Kanseri Hastalarında Kan Ve İdrar Örneklerinde MikroRNA Düzeylerinin Karşılaştırılması. 6.Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 5-7 Ekim, 2017 Adana, Türkiye (Sözlü Bildiri)

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Yazıcı M., Cetin NS., Karaaslan E., Hasanoglu S., Doymaz MZ., Kilic AO.** 2017. Evaluation Of Cchfv Nucleoprotein As Diagnostic Tool In Elisa. 2nd International Conference On Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, September 10-12, 2017 Thessaloniki, Greece (Poster)
- **Gümüş D., Uz G., Özçelik N., Civelek İ., Elma YE., Ekin S., Hasanoglu S., Sarıkaya A., Küçüker M.** 2015 UPEC Suşlarında İnsülin Ve Glukozun Usp, Sfa/Foc, Cnfl Genlerinin Ekspresyonu Üzerine Etkileri. 6. FEMS Microbiology Congress, 7-11 Haziran, 2017 Maastricht, Hollanda (Poster)