



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**OVER KANSERİ TÜMÖRLERİNDE FARKLILAŞMIŞ
MİRNA'LARIN VALİDASYONU**

Efnan Elif TEKARSLAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Tuba GÜNEL**

Aralık, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 5.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Samet TOPUZ
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Mahmut ÖNCÜL
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi



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

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 27339 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans sürecim boyunca desteğini, akademik tecrübelerini, sonsuz bilgisini ve sevgisini asla esirgemeyen, her zaman cesaretlendirici konuşup daha iyi şeyler başarabileceğime inandıran tez danışmanım Sayın Doç.Dr.Tuba GÜNEL'e;

Araştırmamıza verdiği destekten dolayı Sayın Prof.Dr.Samet TOPUZ'a;

Tezimde elde ettiğim sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmesine katkı sağlayan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nazife Çevik'e;

Bu laboratuvara başladığım ilk günden beri yanımda olan Yüksek Lisans sürecine beraber başladığım her konuda destekçim, sevgili arkadaşım, kader ortağım Nilüfer KAMALI'ya;

Deneysel aşamada ve sonrasında her konuda yardımına koşan, tezimin ilk aşamasından son aşamasına kadar yardımcı olan iyi niyetli laboratuvarımızın güler yüzlüsü Sayın Arş. Gör. Ece GÜMÜŞOĞLU'na ve laboratuvarımızdaki tüm Yüksek Lisans ve doktora öğrencilerine;

Üniversite hayatımdan itibaren sınav zamanları ezberlerimi yaparken beni dinleyen, Yüksek Lisans sürecimde yanımda olup beni destekleyen ve hayatımın her aşamasında yanımda olacağına inandığım Özhan ÖZTÜRK'e;

Hayatım boyunca her zaman destekçim olan her sıkıntımı, sevincimi kısacası her şeyimi onlarla paylaştığım gibi bu tez sürecinde de her türlü destekçim olan ve her zaman arkamda olup bana sonsuz güvenen canım ailem; sevgili annem Şükran TEKARSLAN, babam Erdal TEKARSLAN ve ablam Şeyma Hande TEKARSLAN ŞAHİN'e;

Beni desteklediğiniz, yanımda olduğunuz ve bu tezin tamamlanmasını sağladığınız için sonsuz teşekkür ederim.

Aralık 2018

Efnan Elif TEKARSLAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1.OVER KANSERİ.....	4
2.1.1.OVER KANSERİNİN BİYOLOJİSİ	5
2.1.2. OVER KANSERİNİN ETİYOLOJİSİ ve RİSK FAKTÖRLERİ	6
2.1.3.OVER KANSERİNİN SINIFLANDIRMASI.....	7
2.1.3.1.Seröz Tümörler	9
2.1.3.2.Müsinöz Tümörler.....	10
2.1.3.3.Endometrioid Tümörler	10
2.1.3.4.Berrak Hücreli Tümörler	10
2.1.4.OVER KANSERİNİN TEŞHİSİ.....	11
2.1.4.1. Over Kanserinin Teşhisinde Kullanılan Yöntemler	12
2.2.OVER KANSERİNDE TÜMÖR OLUŞUMU VE TÜMÖR OLUŞUMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER	14
2.2.1.METASTAZ OLUŞUMU	15
2.3.OVER KANSERİNDE KULLANILAN BİYOBELİRTEÇLER.....	16
2.3.1. CA-125 VE HE-4	16
2.3.2. İMMÜNOLOJİK BİYOBELİRTEÇLER	18
2.3.3. TÜMÖR KAYNAKLI EKSOZOMLAR	18
2.3.4. GEN TEMELLİ OVER KANSERİ BİYOBELİRTEÇLERİ.....	19
2.3.4.1. Kalıtsal Gen Mutasyonları	19
2.3.4.2. Gen Anlatımı.....	19
2.3.4.3. Tüm Genom Dizileme	20

2.3.5. EPİGENETİK TEMELLİ BİYOBELİRTEÇLER	21
2.3.5.1. MikroRNA Temelli Biyobelirteçler	21
2.4. MİKORNA	22
2.4.1. MİKORNA BİYOGENEZİ	22
2.4.2. MİKORNALARIN İŞLEVLERİ	23
2.4.2.1. Onkogen ve Tümör Baskılayıcı Gen Rolünde MikroRNalar	24
2.4.3. MİKORNALARIN KANSERDEKİ MEKANİZMASI	24
2.4.3.1. MikroRNaların Over Kanserindeki Rolü	25
2.5. OVER KANSERİNDE MİKORNA TESPİTİ İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER	26
2.5.1. NORTHERN BLOTTING VE IN SITU HİBRİDİZASYON (ISH)	26
2.5.2. KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI REVERS-TRANSKRİPSİYON PCR (qRT-PCR).....	27
2.5.3. MİKRODİZİLİM	28
2.5.4. YENİ NESİL DİZİLEME (NGS).....	29
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	30
3.1.ÖRNEK TOPLAMA.....	30
3.2.DOKUDAN TOTAL RNA İZOLASYONU	30
3.3.CDNA SENTEZİ	31
3.4.ADAY MİRNA'LARIN GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR)	32
3.5.İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1.KULLANILAN ÖRNEKLERİN ÖZELLİKLERİ	35
4.2.ÖRNEKLERİN KALİTE KONTROLÜ.....	36
4.3.ANLATIM ANALİZİ SONUÇLARI	37
4.4.VERİ TABANLI YÖNTEMLER İLE MİRNA'LARIN HEDEF GEN TESPİTİ.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR.....	49
EKLER	56
EK 1. ETİK KURUL YAZISI	56
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Kadın üreme sistemi.	4
Şekil 2.2: Sağlıklı over ve over kanseri gösterimi.	5
Şekil 2.3: Epitelyal over kanseri (EOK) histotipleri (Cho ve Shih Ie, 2009).....	9
Şekil 2.4: Epitelyal over kanserinin alt tipleri ile ilişkili mutasyonlar (Banerjee ve Kaye, 2013).....	11
Şekil 2.5: MiRNA biyogenezinin şematik gösterimi (Kim ve diğ., 2018).	23
Şekil 4.1: Basit over kisti ve epitelyal over kanseri hasta grubu örneklerindeki aday 3 miRNA'nın (hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p) rölatif miRNA anlatım seviyeleri ("Wilcoxon test").	39
Şekil 4.2: Aday miRNA'ların (hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p) ROC analiz eğrileri.....	40
Şekil 5.1: Hsa-mir-200'ün insan genomundaki lokalizasyonu	43
Şekil 5.2: "Pathway Studio®" ile hsa-mir-200c-3p'nin over kanserinde hedeflediği genler	44

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Over Kanseri (OK) Evreleri (Jayson ve diğ., 2014).....	8
Tablo 3.1: cDNA sentez reaksiyonu için çalışma çözeltisi bileşenleri.....	32
Tablo 3.2: cDNA sentez reaksiyonları bileşenleri.....	32
Tablo 3.3: cDNA sentez reaksiyonu koşulları.....	32
Tablo 3.4: qRT-PCR bileşenleri.....	33
Tablo 3.5: qRT-PCR koşulları.....	33
Tablo 4.1: Epitelyal over kanseri hastalarının özellikleri.....	35
Tablo 4.2: Over kist hastalarının özellikleri.....	36
Tablo 4.3: Epitelyal over kanseri ve kist doku örneklerinin kalitatif ve kantitatif değerlendirme sonuçları.....	37
Tablo 4.4: Aday 3 miRNA'nın mikrodizilim sonuçları (Gümüsoğlu, 2016, Yüksek Lisans Tezi).....	38
Tablo 4.5: Anlatımı anlamlı şekilde değişen 3 aday miRNA'nın qPCR sonuçlarının analizi.....	38
Tablo 4.6: Aday miRNA'ların miRBase erişim ve olgun dizisi.....	40
Tablo 4.7: Aday 3 miRNA'nın " <i>Pathway Studio</i> ", " <i>TargetScan</i> " ve " <i>DIANA TOOLS</i> " kullanılarak belirlenen ve over kanserinde etkili olan hedef genleri.....	41
Tablo 5.1: Hsa-mir-200c-3p'nin katıldığı biyolojik yollar.....	47

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	:Yüzde
cm	:Santimetre
dk (')	:Dakika
g	:Gram
<i>g</i>	:RCF " <i>Relative Centrifugal Field</i> "
kcal	:Kilokalori
mL	:Mililitre
mM	:Milimolar
ng	:Nanogram
rpm	:Dakikada devir sayısı
sn (")	:Saniye
T _m	:Erime sıcaklığı
µl	:Mikrolitre
µg	:Mikrogram
°C	:Santigrad derece

Kısaltmalar	Açıklama
ΔΔCt	: " <i>The Comparative CT</i> "
ACHE	: " <i>Acetylcholinesterase</i> "
ARID1A:	: " <i>AT-Rich Interactive Domain 1A</i> "
ATP	:Adenozin Trifosfat
AUC	: " <i>Area Under The Curve</i> "
BACH1	: " <i>BTB Domain And CNC Homolog 1</i> "
BAP	:Bilimsel Araştırmalar Projeleri
BRAF	: " <i>B-Raf Proto-Oncogene</i> "
BRCA1	: " <i>Breast Cancer 1</i> "
BRCA2	: " <i>Breast Cancer 2</i> "
CA-125	:Kanser Antijen 125
CASP-3	: " <i>Caspase 3</i> "

CCND1	:“ <i>Cyclin D1</i> ”
CDH1	:“ <i>Cadherin 1</i> ”
CDK6	:Siklin Bağlı Kinaz 6
Cdks	:Siklin bağlı kinazlar
cDNA	:“ <i>Complementary DNA</i> ”
CD3	:“ <i>Cluster of Differentiation 3</i> ”
CGH	:Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
CLDN3	:“ <i>Claudin 3</i> ”
c-MYC (MYC)	:Myc Proto-Onkogen
COL18A1	:“ <i>Collagen Type XVIII A1</i> ”
CT	:Bilgisayarlı Tomografi
C_t	:“ <i>Cycle Treshold</i> ”
DGCR8	:“ <i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Protein</i> ”
DH	:Dendritik Hücre
dH₂O	:Distile Su
DNA	:Deoksiribonükleik asit
dNTP	:Deoksiribonükleotrid trifosfat
E2F	:E2 Faktör
E2F1	:E2 Faktör 1
EGFR	:“ <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> ”
EMT	:Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
EN1	:“ <i>Engrailed 1</i> ”
EOK	:Epitelyal Over Kanseri
ERBB2	:“ <i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2</i> ”
Exp-5	:Eksportin-5
FBXO32	:“ <i>F-Box Protein 32</i> ”
FGF2	:“ <i>Fibroblast Growth Factor 2</i> ”
FIGO	:Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
FOLR1	:“ <i>Folate Receptor 1</i> ”
FOXL2	:“ <i>Forkhead Box L2</i> ”
GLRX	:“ <i>Glutaredoxin</i> ”
GPX3	:“ <i>Glutathione Peroxidase 3</i> ”
HE-4	:İnsan Epididimal Protein 4
HER2	:“ <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> ”

HMGA2	: “ <i>High Mobility Group AT-Hook 2</i> ”
hMLH1	: İnsan MutL Homolog 1
hMSH2	: İnsan MutS Homolog 2
HOXA9	: “ <i>Homeobox Protein A9</i> ”
HOXA11	: “ <i>Homeobox Protein A11</i> ”
IGFBP-3	: “ <i>Insulin Like Growth Factor Binding Protein</i> ”
ISH	: In Situ Hibridizasyon
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KRAS	: “ <i>KRAS Proto-Oncogene</i> ”
LNA	: “ <i>Locked Nucleic Acid</i> ”
LOH	: Heterozigozite Kaybı
LS	: Lynch Sendromu
MDSC	: Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler
miRNA	: MikroRNA
MLH1	: “ <i>MutL Homolog 1</i> ”
MMP13	: Matriks metalloproteinaz 13
MMR	: “ <i>Mismatch Repair</i> ”
mRNA	: Mesajcı RNA
MSH2	: “ <i>MutS Homolog 2</i> ”
MSH6	: “ <i>MutS Homolog 6</i> ”
MUC16	: Musin16
ncRNA	: Kodlamayan RNA
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
NK	: Doğal Öldürücü Hücre
NTC	: “ <i>No Template Control</i> ”
OK	: Over Kanseri
p53	: “ <i>Protein 53</i> ”
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMS2	: “ <i>PMS1 Homolog 2</i> ”
Pre-miRNA	: Öncül MiRNA
Pri-miRNA	: Primer MiRNA
RISC	: “ <i>RNA-Induced Silencing Complex</i> ”
ROC	: Alıcı İşlem Karakteristikleri
ROCA	: Over Kanseri Risk Algoritması

RNA	:Ribonükleikasit
RNAaz	:Ribonükleaz
RNAi	:“ <i>RNA Interferans</i> ”
RNA Pol II	: RNA Polimeraz II
RNA Pol III	:RNA Polimeraz III
RT	:Revers Transkriptaz
RT-PCR	:Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAGE	:“ <i>Serial Analysis of Gene Expression</i> ”
SBT	:Seröz Sınır Çizgisi Tümörü
snRNA	:“ <i>Small Nuclear RNA</i> ”
SOD2	:“ <i>Superoxide Dismutase 2</i> ”
qRT-PCR	:Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TIL	:Tümörü İnfiltrate Eden Lenfosit
TP53	:Tümör Protein 53
TRBP	:“ <i>TAR RNA Binding Protein</i> ”
TUBB3	:“ <i>Tubulin Beta 3 Class III</i> ”
TVS	:Transvajinal Ultrasonografi
UTR	:Çevrilmeyen Bölge
VEGFA	:“ <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> ”
VIM	:Vimentin
WFDC2	:“ <i>WAP Four-Disulfide Core Domain Protein 2</i> ”
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
WLS	:“ <i>Wntless Wnt Ligand Secretion Mediator</i> ”
www	:“ <i>World Wide Web</i> ”
ZEB	:“ <i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox</i> ”
ZEB1	:“ <i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i> ”
ZEB2	:“ <i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2</i> ”

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OVER KANSERİ TÜMÖRLERİNDE FARKLILAŞMIŞ MİRNA'LARIN VALİDASYONU

Efnan Elif TEKARSLAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Tuba GÜNEL

Over kanseri gelişmekte olan toplumlarda en ölümcül beşinci kanser türüdür. Over kanseri çeşitlerinin %90'ından fazlası epitelyal histolojiye sahiptir ve epitelyal over kanseri olarak adlandırılır. Over kanserinde sağkalım için erken teşhis önem teşkil etmektedir. 5 yıllık sağ kalım oranı erken evrede teşhis edildiğinde %90'lara ulaşmaktadır. Over kanserinin semptomlarının hafifliğinden, özgüllüğü ve hassasiyeti yüksek bir biyobelirteç eksikliğinden dolayı erken evrede teşhis koyulamamaktadır. MikroRNA'lar küçük kodlayıcı olmayan RNA ailesidir ve karsinogenez de dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçleri düzenlemede etkilidir. Yapılan araştırmalar sonucunda over kanserinin oluşması ve ilerlemesinde mikroRNA anlatımlarının değişmesinin önemli bir katkısı olduğu vurgulanmıştır. Geniş çaplı genom analizi ile mikroRNA'ların over kanseri de dahil olmak üzere çoğu kanserde anlatımlarının değiştiği bulunmuş ve etkili bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

Tez kapsamında, aynı yaş aralığında olan epitelyal over kanseri olan 10 hastadan doku örnekleri ve kontrol grubu olarak 10 bireyden over kisti doku örnekleri toplanmış ve daha önceden mikrodizilim yöntemi ile anlatımlarının farklılaştığı tespit edilen 3 mikroRNA'nın (hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p) Real-Time PCR yöntemi ile validasyonu yapılmıştır. Mikrodizilim yönteminin sonuçlarına göre bu 3 mikroRNA'nın epitelyal over kanseri dokularında anlatımlarının arttığı tespit edilmiştir. Hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p'nin Real-Time PCR yöntemi ile validasyonu yapıp elde edilen Ct değerlerinin "Wilcoxon test" ile biyoinformatik analizleri yapılmıştır. "Pathway studio",

“*DIANA TOOLS*” ve “*TargetScan*” veri tabanları ile aday 3 mikroRNA’nin over kanserinde hedeflediği genler tespit edilmiştir. Hsa-mir-200c-3p’nin ($p=0.0273$, $AUC=0.83$) anlatımının epitelyal over kanseri doku örneklerinde anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur. Hsa-mir-4665-3p ($p=0.13$, $AUC=0.83$) ve hsa-mir-6737-3p’nin ($p=0.8457$, $AUC=0.50$) anlatım artışlarının anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Aralık 2018, 73 sayfa.

Anahtar kelimeler: miRNA, over kanseri, erken teşhis, Real-Time PCR, biyobelirteç.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

VALIDATION OF ALTERED MIRNAS IN OVARIAN CANCER TUMORS

Efnan Elif TEKARSLAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Ovarian cancer is the fifth most fatal cancer type in developing populations. 90% of ovarian cancer varieties have epithelial histology and they are called epithelial ovarian cancer. Early diagnosis is important for survival in ovarian cancer. 5-year survival rate reaches 90% when it is diagnosed at an early stage. Early diagnosis cannot be diagnosed due to the mild symptoms of ovarian cancer and a lack of biomarker with high specificity and sensitivity. MicroRNAs are small non-coding RNA families and are effective in regulating a wide range of biological processes including carcinogenesis. As a result of the researches, it has been emphasized that the change of microRNA expressions is an important contribution to the development and progression of ovarian cancer. With the whole wide genomic analysis, microRNAs have been found to change their expression in many cancers, including ovarian cancer and it is emphasized that microRNAs may be an effective biomarker

In the thesis, tissue samples were collected from 10 patients with epithelial ovarian cancer in the same age range and ovarian cyst tissue samples were collected from 10 individuals as control group and 3 microRNAs (hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p and hsa-mir-6737-3p) that were previously determined and differentiation of their expression by microarray method were validated by Real-Time PCR method. According to the results of the microarray method, these 3 microRNAs were found to be increased in the epithelial ovarian cancer tissues. Hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p and hsa-mir-6737-3p were validated by Real-Time PCR method,

bioinformatic analysis of obtained Ct values were done by “*Wilcoxon test*”. The genes targeted in ovarian cancer were determined by using “*Pathway studio*”, “*DIANA TOOLS*” and “*TargetScan*” databases. The expression of hsa-mir-200c-3p ($p=0.0273$, AUC=0.83) was found to be significantly increased in epithelial ovarian cancer tissue samples. Increase of hsa-mir-4665-3p ($p=0.13$, AUC=0.83) and hsa-mir-6737-3p’s ($p=0.8457$, AUC=0.50) expression were not significant.

December 2018, 73 pages.

Keywords: miRNA, ovarian cancer, early diagnosis, Real-Time PCR, biomarker.



1. GİRİŞ

Over kanseri (OK) dünya çapında kadınlarda en sık görülen jinekolojik kanser türüdür (Srivastava ve diğ., 2017, Deb ve diğ., 2018). Epitelyal over kanseri (EOK), over kanseri vakalarının %90'nını oluşturmaktadır. EOK'deki hafif ve yaygın semptomlar nedeniyle, hastalığın erken evrede teşhis edilmesi zordur. OK'nin görülme oranları 55-64 yaş arasındaki kadınlarda en yüksektir. OK hastalarının yalnızca %19'u erken evrede teşhis edilebilmektedir ve 5 yıllık sağ kalım oranı EOK erken evrede teşhis edilirse %90'dır. Hastalık üst abdomende veya vücudun diğer bölgelerine yayıldığında (evre III ve IV) 5 yıllık sağ kalım oranı %20'ye düşmektedir (Kinose ve diğ., 2014). EOK'nin beş farklı histotipi vardır: yüksek dereceli seröz (70%), düşük dereceli seröz (5%), endometrioid (10%), berrak hücre (10%) ve müsinöz (3%). Histotiplerin her birinin spesifik genlerdeki mutasyonlar ile ilişkili olduğu ve farklı klinik bulguları olduğu bulunmuştur. Günümüzde EOK için tanısal yöntemler pelvik muayene, transvajinal ultrason (TVS) ve serum kanser antijen 125 (CA125) ölçümüdür ancak bu yöntemler EOK'nin erken evre tanısı için yetersiz kalmaktadır (Testa ve diğ., 2018). EOK nedeni ölümlerin azalması için erken tanı önemli olup, hastalığın erken evrelerine duyarlı spesifik bir biyobelirteç bulmak önem arz etmektedir. İdeal over kanseri biyobelirteçleri yaygın bir tarama sürecinde kullanılacaktır ve klinisyenlerin asemptomatik kadınlarda EOK teşhis etmesini sağlayacaktır (Zhang ve diğ., 2011).

MikroRNA'lar (miRNA'lar) 18-25 nükleotid uzunluğunda, küçük kodlama yapmayan RNA (ncRNA)'ların bir sınıfıdır. MiRNA'lar hücre çoğalması, gelişme, farklılaşma, apoptoz gibi çeşitli biyolojik süreçlerde yer alır. MiRNA'lar farklı kanser formlarında anormal anlatım ifadeleri gösterirler. Tümör baskılayıcı genler veya onkogenler olarak görev alırlar ve bu nedenle OK gelişiminde miRNA'ların anlatımları önemlidir. Biyobelirteç olarak miRNA'ların kullanılması ve geliştirilmesi için kullanılan başlıca teknikler; mikrodizilim, yeni nesil dizileme (NGS) ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) 'dur. Mikrodizilim, miRNA anlatım profillerini ve kansere bağlı miRNA'ları tanımlamak için kullanılan başlıca tekniklerdendir. Ancak bu teknik genelde bilinen miRNA'ları görüntülemektedir. NGS'nin mikrodizilim tekniğine üstünlüğü herhangi bir ön bilgiye ihtiyaç duyulmadan örnekteki tüm RNA'lar için bilgi sağlamasıdır. qRT-PCR tekniği ise en sık kullanılan, maliyeti ve iş yükü az

olan bir moleküler tekniktir. Genom çapında profillemeye ile elde edilen bilgilerin doğrulanması için kullanılmaktadır (de Planell-Saguer ve Rodicio, 2013).

Biyoinformatik analizler ile biyolojik verilerin daha geniş ölçekte saptanması ve işlenmesi sağlanır. Biyoinformatik analizler ile miRNA'ların hedef dizilerinin belirlenmesi, miRNA'nın tanımlanması veya validasyonu, miRNA anlatımlarının sinyal ve metabolik yollarının belirlenmesi, miRNA'ların transkripsiyon faktörünün tanımlanması ve hastalıklar ile miRNA'ların bağlantısı ve etkileşimi gibi analizler yapılabilmektedir (Zafar, 2017).

Tez kapsamında mikrodizilim yöntemiyle EOK tümör dokularında basit over kistlerine göre anlatımlarının arttığı belirlenen hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p'nin Real-Time PCR (qRT-PCR) yöntemiyle validasyonu yapılmıştır.

Hsa-mir-200 (miR-200) ailesi, iki farklı genomik bölgede iki küme oluşturan beş üyeden oluşmaktadır. Hsa-mir-200b, hsa-mir-200a ve hsa-mir-429 1. Kromozomda (1p36.33) yerleşmiş olup küme 1'i oluşturmaktadır. Hsa-mir-200c ve hsa-mir-141 12. Kromozomda (12p13.31) yerleşmiş olup küme 2'yi oluşturmaktadır. Mir-200 ailesi omurgalı türler arasında yüksek oranda korunmuştur. OK'de yapılan karşılaştırmalı genomik hibridizasyon çalışması miRNA genlerini içeren lokuslardaki değişikliklerin anormal miRNA anlatım profillerine neden olduğunu göstermiştir. Özellikle mir-200 ailesine ait genlerde kopya sayısı artışı gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda mir-200'ün anlatımında artış görülmüştür (Humphries ve Yang, 2015).

Literatürde hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p'nin çeşitli hastalıkların mikrodizilim tekniği kullanılarak miRNA profillerinin belirlenmesi ile anlatım seviyelerinde farklılıklar olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır. Hsa-mir-4665-3p'nin vitiligo, kolon kanseri, narkolepsi ve yemek borusu kanseri, hsa-mir-6737-3p'nin ise vitiligo ve nonsendromik yarık dudak patolojilerindeki anlatım profillerine ilişkin veriler dikkat çekmektedir (Mosakhani ve diğ., 2017, Shang ve Li, 2017, Zhang ve diğ., 2017, Zou ve diğ., 2016, Peng ve diğ., 2017).

Tez kapsamında qRT-PCR sonuçlarının “*Wilcoxon test*” ile değerlendirilmesi ve ROC “*Receiver Operating Characteristics*” (Alıcı İşlem Karakteristikleri) analizi ile doğruluğunun tespit edilmesi sonucunda sadece hsa-mir-200c-3p'nin anlatımında ($p=0.0273$, $AUC=0.83$) anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p'nin gen regülasyonuna etkilerini tespit etmek amacıyla “*TargetScan*”, “*DIANA TOOLS*”

ve “Pathway Studio®” (v11.4.0.8) veri tabanları kullanılmıştır. Bu analizler sonucunda hsa-mir-200c-3p’nin *ZEB1* “zinc finger E-box binding homeobox 1”, *ZEB2* “zinc finger E-box binding homeobox 2”, *VEGFA* “vascular endothelial growth factor A” ve *TUBB3* “tubulin beta 3 class III” gibi genlerin over kanserinde anlatımlarını baskıladığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışması, over kanseri doku örneklerinde anlatımı artmış olan miRNA’ların over kanseri erken tanısında kullanılmasının tespiti için önemlidir. Hsa-mir-200c-3p’nin over kanserinin erken tanısında kullanılmak üzere aday biyobelirteçlerden birisidir. Hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p’nin over kanserine etkisinin belirlenmesi için literatüre katkıda bulunacaktır.

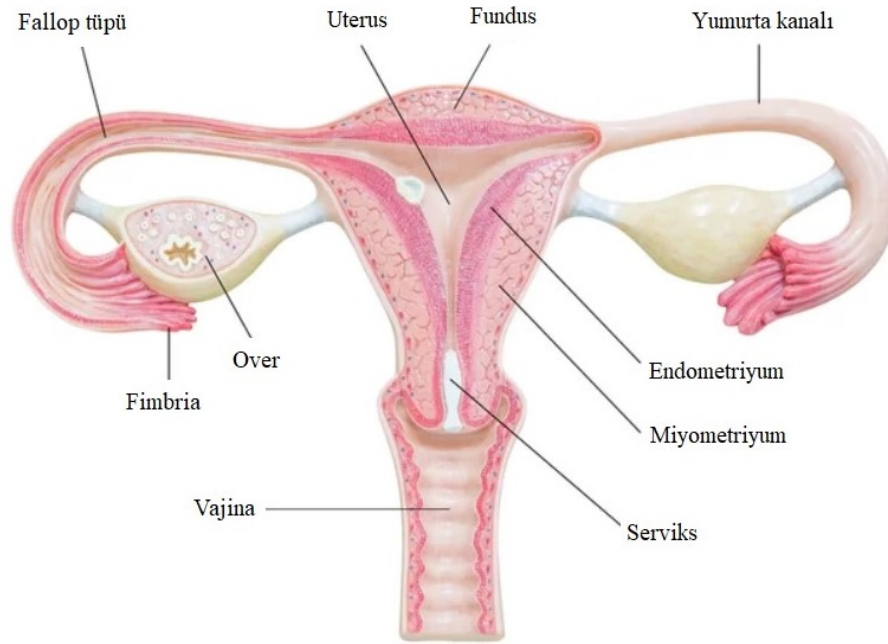


2. GENEL KISIMLAR

2.1.OVER KANSERİ

Overler uterusun her iki tarafında bulunan ve pelvisin lateral duvarına bitişik eşleştirilmiş kadın üreme organlarıdır (Şekil 2.1). Overler oval şekillidir ve 2-3 cm büyüklüğündedir. Pembemsi gri renkte olup düz olmayan bir yüzeye sahiptirler. Overler, uterusu fallop tüpleri veya yumurtaları uterus boşluğuna taşıyan yumurta kanalı ile bağlanır. Overlerin üç işlevi vardır:

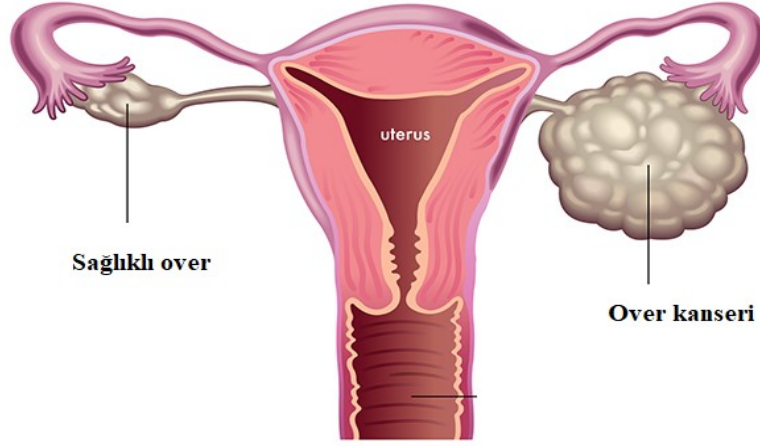
- Yumurtaları barındırmak ve korumak
- Östrojen ve progesteron adı verilen dişi üreme hormonlarını ve daha az seviyede bulunan relaksin ve inhibin adı verilen hormonları üretmek
- Ovülasyon; overin bir yumurtayı ya da bazen daha fazla yumurtayı her bir adet döngüsünde serbest bırakmak (Desai ve diğ., 2014)



Şekil 2.1: Kadın üreme sistemi¹.

¹ <https://www.livescience.com/58862-ovary-facts.html>[Ziyaret tarihi:14.08.2018]

Over kanseri (OK) kadınlarda görülen kanser türleri arasında en ölümcül beşinci kanser türüdür (Testa ve diğ., 2018; Prahm ve diğ., 2016). 2017 yılındaki istatistiklere göre ABD’de 22,140 kişiye OK teşhisi konulmuştur ve bu sayı tüm kanser teşhislerinin %1,3’ünü kapsamaktadır. Ayrıca 2017 yılında kanserden dolayı ölümlerin %2,3’ünü OK ölümleri oluşturmaktadır (Testa ve diğ.,2018). Over kanseri vakalarının %90’nını epitelyal over kanseri (EOK) oluşturmaktadır. Erken belirti ve semptomlarının azlığı nedeniyle EOK ‘*Silent Killer*’ ‘Sessiz Katil’ olarak adlandırılır (Prahm ve diğ., 2016). Sağlıklı ve kanserli over karşılaştırılması Şekil 2.2’de şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.2: Sağlıklı over ve over kanseri gösterimi².

2.1.1.OVER KANSERİNİN BİYOLOJİSİ

Over kanseri biyolojisi ve evriminin anlaşılması oldukça zordur. Bunun ana nedenlerinden biri, tümör hücrelerinin overin normal hücrelerine fenotipik olarak benzememesidir (Karnezis ve diğ., 2017). EOK oluşumunun nedenleri arasında over yüzeyi, periton veya fallop tüpü epitelinin malign transformasyonu bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda üreme ve yumurtlama ile ilişkili faktörlerin EOK oluşumunda en büyük etkiye sahip olduğu

²<https://universityhealthnews.com/daily/cancer/respond-quickly-to-ovarian-cancer-symptoms/>[Ziyaret tarihi: 19.07.2018]

gösterilmiştir. *BRCA1*, *BRCA2* ve diğer genlerdeki somatik mutasyonların da EOK'nin ilerlemesine yol açabileceği gösterilmiştir. EOK patogenezi için bazı teoriler şunlardır:

- travma ile tekrarlanan ovulasyon
- aşırı gonadotropin sekresyonunun bir sonucu olarak artan östrojen konsantrasyonları
- yüksek androjen konsantrasyonları
- stromal hiperaktivite (Desai ve diğ., 2014)

Morfolojik ve moleküler genetik özelliklerine dayanarak, invaziv epitelyal kanserler, farklı doğal öyküleri olan tip I ve tip II kanserlere ayrılırlar. Tip I kanserler yavaş büyür, tanıdaki overlerle ilişkili kalmaktadır ve düşük dereceli seröz, düşük dereceli endometrioid, müsinöz ve berrak hücreli karsinomları içerir. *KRAS* “*Kras proto-oncogene*”, *BRAF* “*B-Raf proto-oncogene*” ve *ERBB2* “*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*” gibi spesifik mutasyonlarla karakterizedirler ve nispeten daha iyi prognoza sahiptirler. Daha iyi prognozun nedeni kanserin erken evrede tespit edilmesine veya başka bir hastalığın seyrinde ortaya çıkmasına bağlıdır. Tip II kanserler, epitelyal kanserlerin %70'inden fazlasına karşılık gelen daha agresif olanlardır ve bunların yaklaşık %80'i geç evrede saptanmaktadır. Tip II kanserler, yüksek dereceli seröz ve endometrioid kanserleri, farklılaşmamış tümörler ve karsinosarkomları içermektedir (Basu ve Vale, 2017).

2.1.2. OVER KANSERİNİN ETİYOLOJİSİ ve RİSK FAKTÖRLERİ

Farklı bireylerdeki OK'de çoklu genetik ve epigenetik anomaliler bulunmuştur. Genlerin aktivasyonu amplifikasyon, mutasyon ve hipometilasyon yollarıyla meydana gelirken, genetik inaktivasyon ise büyük kromozomal bölgelerin silinmesinden, belirli lokuslarda ve promotör metilasyonunda daha sınırlı heterozigozite kaybından (LOH) kaynaklanmaktadır (Matulonis ve diğ., 2016).

Overi kaplayan epitel hücreler genellikle canlılığını kaybetmiştir ve düşük proliferatif indekse sahiptirler. Olgun foliküller, oositleri serbest bırakmak için yırtıldıktan sonra epitel hücreler over yüzeyindeki hasarı onarmak için çoğalırlar. Yumurtlama döngüsünün sayısını arttıran epidemiyolojik faktörler; menstrüasyonun erken başlaması, geç menopoza ve infertilite OK riskini artırırken, ovulasyonu azaltan faktörler ise; çoğul gebelikler, uzamış laktasyon OK riskini azaltmaktadır (Matulonis ve diğ., 2016).

Bir dizi genetik faktör, OK gelişme riski ile ilişkilidir. *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları OK için bilinen en önemli genetik risk faktörleridir. *BRCA*'daki mutasyonlar meme kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri, melanom ve seröz endometrial kanser gibi diğer kanserlerin de riskini artırır. EOK'nin alt tiplerinin çoğu, germ hattı *BRCA* mutasyonları ile ilişkilidir. Hem gen içindeki *BRCA* mutasyonunun konumu hem de mutasyon türü, over kanseri gelişme riskini etkilemektedir. Meme kanseri ya da over kanseri riski; germ hattı *BRCA1* ya da *BRCA2* mutasyonları olan hastalarda mutasyon tipine, nükleotid pozisyonuna ve mutasyonun fonksiyonel sonucuna göre değişebilmektedir (Matulonis ve diğ., 2016).

Lynch sendromu gibi kalıtsal bozukluklar over kanseri riskini artırabilir. Lynch sendromu kolorektal, endometriyal ve over kanseri ile ilişkilidir, fakat aynı zamanda idrar yolu, mide, ince bağırsak ve safra yolu kanserleri ile de ilişkili olabilir. Sendrom, farklı frekanslarda mutasyona uğramış olan *MLH1* “*mutL homolog 1*”, *PMS2* “*PMS1 homolog 2*”, *MSH2* “*mutS homolog 2*” veya *MSH6* “*mutS homolog 6*”; DNA yanlış eşleşme “*mismatch*” onarım sisteminin genlerinde bir germ hattı mutasyonunun kalıtılması ile karakterize edilir (Matulonis ve diğ., 2016).

Over kanseri gelişme riski oranları, *BRCA1* mutasyonu, *BRCA2* mutasyonu veya Lynch sendromu olan hastalar için sırasıyla %40, %20 ve %4-11'dir (Davidson ve Trope, 2014).

Hormon replasman tedavisinin postmenopozal kadınlarda over kanseri gelişme riskini artırdığı gösterilmiştir; sadece östrojen tedavisi %22 oranında artırmış, birlikte verilen östrojen ve progesteron tedavisi ise riski %10 artırmıştır. Bununla birlikte, bir meta-analiz, sadece östrojen veya östrojen ve progesteronun bir kombinasyonunu içermesine bakılmaksızın, hormon replasman tedavisi kullanan menopoz dönemindeki kadınlarda, özellikle seröz ve endometrioid karsinomlar olmak üzere over kanseri gelişme riskinde benzer bir artış olduğunu göstermiştir (Matulonis ve diğ., 2016). Birçok çalışma obeziteyi, menopoz sonrası over kanserinin gelişimi için olası bir risk faktörü olarak tanımlamıştır (Matulonis ve diğ., 2016).

2.1.3.OVER KANSERİNİN SINIFLANDIRMASI

EOK çok çeşitli tümör morfolojileri, klinik belirtiler ve altta yatan genetik değişiklikler gösteren heterojen bir neoplazm grubudur (Karst ve Drapkin, 2010). OK'nin patolojik değerlendirmesi ve tümör evreleri lenf nodları, doku biyopsisi ve abdominal sıvınının da çıkarılması dahil olmak üzere kanserin cerrahi değerlendirmesine dayanmaktadır ve

Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) evreleme sistemine göre derecelendirilir (Tablo 2.1) (Matulonis ve diğ., 2016).

Tablo 2.1: Over Kanseri (OK) Evreleri (Jayson ve diğ., 2014).

Evre I: Tümör overlerle sınırlı

- Ia: Tümör bir over ile sınırlı
- Ib: Tümör iki overde de bulunmakta
- Ic: Tek ya da iki overin yüzeyinde tümör bulunan Ia veya Ib, yırtılan kapsül, sitolojik olarak pozitif assit ya da pozitif peritoneal yıkama

Evre II: Tümör pelvise yayılmakta

- IIa: Tümör tüpleri, uterusu ya da her ikisini birden etkilemekte
- IIb: Diğer pelvik dokuları etkilemekte
- IIc: Tek ya da iki overin yüzeyinde tümör bulunan IIa veya IIb, yırtılan kapsül, sitolojik olarak pozitif assit veya pozitif peritoneal yıkama

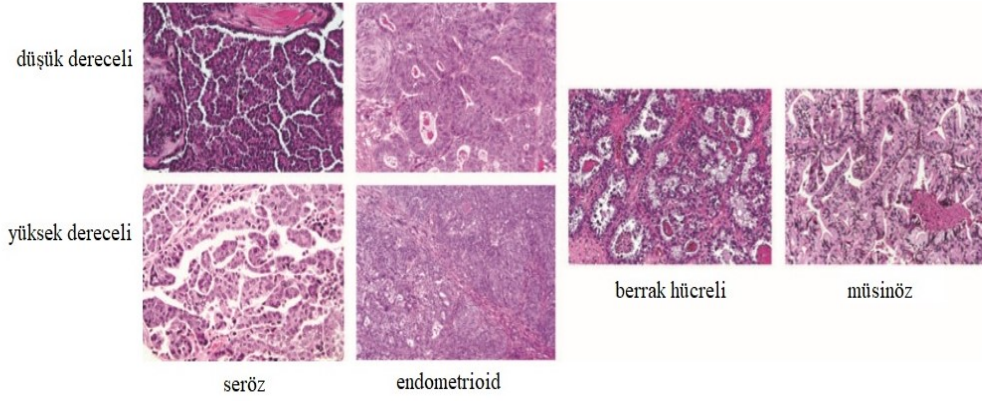
Evre III: Tümör abdomen boşluğa ve/veya lenf düğümlerine ulaşmakta

- IIIa: Tümör abdomen duvarını etkilemekte
- IIIb: Abdomen duvarındaki tümörler 2 cm çapına ulaşmakta
- IIIc: Yayılım lenf düğümlerine ulaşmakta

Evre IV: Uzak metastaz (tümör uzak organlara yayılmaya başlamakta)

Tümörlerin her bir alt tipi iyi huylu (benign), malign olarak ya da düşük ve yüksek dereceli tümörler olarak sınıflandırılabilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), baskın epitelyal hücre tipine göre (kanserlerinin %80'ini temsil eden) EOK'ni kategorize etmiştir (bkz. Şekil 2.3):

1. Seröz tümörler (düşük dereceli ve yüksek dereceli seröz tümörler)
2. Müsinöz tümörler
3. Endometrioid tümörler
4. Berrak hücreli tümörler



Şekil 2.3: Epitelyal over kanseri (EOK) histotipleri (Cho ve Shih Ie, 2009).

2.1.3.1. Seröz Tümörler

Seröz alt tipi tüm EOK vakalarının %60-80'ini oluşturur, ancak bu vakaların sadece %25'i erken evrede (evre I veya II) tespit edilir. Bu tip tümörler fallop tüp epitelyumuna benzemektedirler.

Seröz over kanseri için iki kademeli bir sınıflandırma önerilmiştir;

1. Düşük dereceli seröz tümörleri
2. Yüksek dereceli seröz tümörleri

Düşük dereceli seröz karsinomları çok nadir tümörlerdir. Genetik olarak stabildirler ve düşük sayıdaki genetik mutasyonlar ile karakterizedirler. Bu nedenle, prekürsörlerinden yavaş yavaş gelişirler. Ayrıca, benign seröz kistadenomdan, seröz sınır çizgisi tümörlerine (SBT'ler) ve daha sonra düşük dereceli seröz karsinomaya kadar seviye seviye gelişim gösterirler. Düşük dereceli seröz tümörlerinde *p53* mutasyonları nadir olarak görülmektedir. Bu karsinomlar, SBT'lerine çok benzeyen bir DNA içeriğine ve kopya sayısı değişikliklerine sahiptirler. Yüksek dereceli seröz karsinomları, over kanserinin %68'ini oluşturur ve genellikle ileri evrede (evre III ve IV) teşhis edilen yüksek dereceli klinik olarak agresif neoplazmlar olduğundan en kötü prognoza sahiptirler. Üç anatomik bölge yüksek dereceli seröz tümörlerinin potansiyel kaynağıdır: ovaryan yüzey epiteli, fallop tüp epiteli ve peritoneal kavitenin yüzeyini kaplayan mezotelyum.

Olguların yaklaşık %80'inde *TP53* “*tumor protein p53*” gen mutasyonları görülmektedir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar, kalıtsal yüksek dereceli seröz tümör vakalarının %90'ı ile ilişkilidir (Koshiyama ve diğ., 2017)

2.1.3.2.Müsinöz Tümörler

Müsinöz tümörler epitelyal over tümörlerinin en sık görülen ikinci formudur ve tüm epitelyal over tümörlerinin yaklaşık %35'ini oluştururlar. En sık erken evrede teşhis edilen OK türüdür. Müsinöz tümörleri genellikle intestinal veya endoservikal epitelyuma benzemektedir. Müsinöz tümörlerinin medyan çapı 18 ila 20 cm arasındadır ve overlerle sınırlı kalmaya eğilimlidir. Ayrıca, birincil over müsinöz tümörlerini, kolon/rektum, apandis, serviks veya pankreasta bulunan metastatik müsinöz tümörlerinden ayırt edilmesi zor olmaktadır (Desai ve diğ., 2014). Bu nadir kanser türü yaklaşık %100 *KRAS* mutasyonuna ve yüksek oranda *HER2* “*Human epidermal growth receptor 2*” amplifikasyonuna sahiptir (Desai ve diğ., 2014). Müsinöz over kanseri, platin (kemoteropatik ajan) tedavisine nadiren cevap vermektedir (Testa ve diğ., 2018).

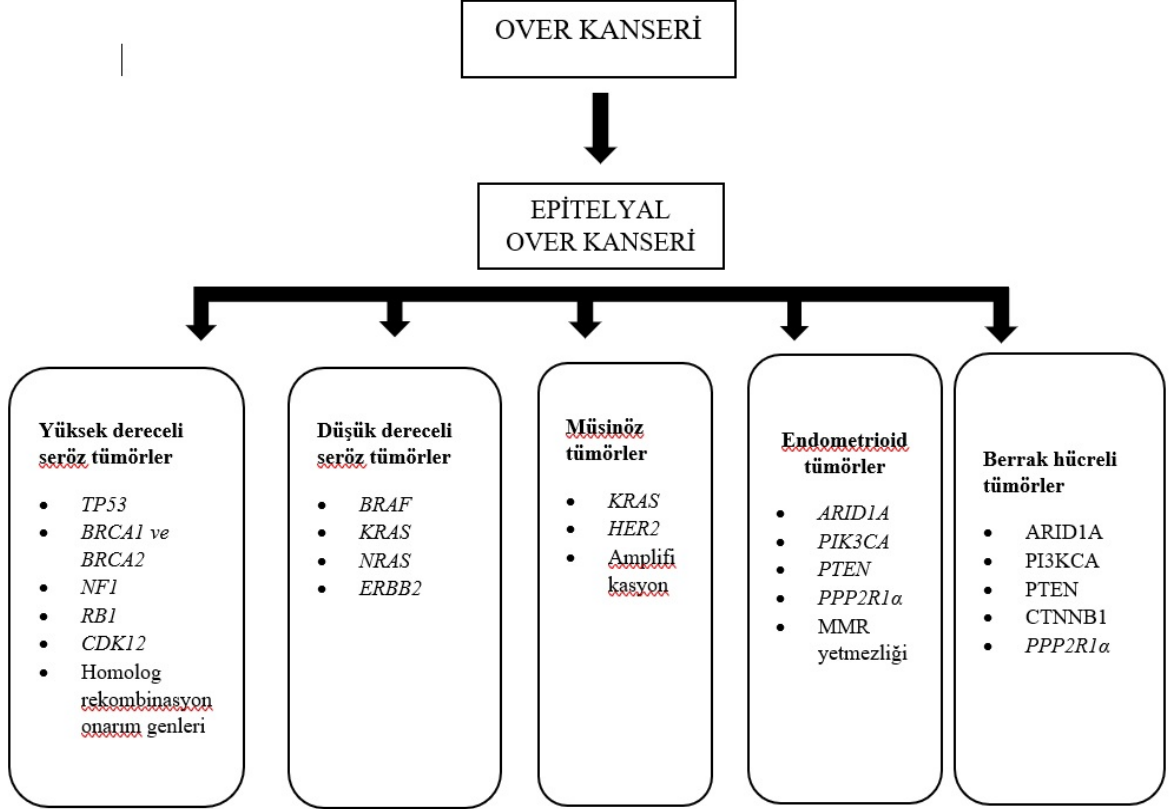
2.1.3.3.Endometrioid Tümörler

Endometrioid tümörler tüm EOK'nin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Bu tümör tipi endometriyal bezleri andırmaktadır ve endometriozis kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Hastalık evresine bakılmaksızın seröz tümörlere göre daha iyi sağ kalım ile ilişkilidirler. Ailede veya kişisel olarak kolon veya endometrial kanser öyküsü olan kadınlar daha yüksek risk taşırlar. Endometriozisi olan kadınlar da bu nadir görülen OK tipini geliştirme riskini arttırmaktadır (Desai ve diğ., 2014).

2.1.3.4.Berrak Hücreli Tümörler

Berrak hücreli tümörler OK vakalarının %10'undan daha azını oluşturan nadir bir OK türüdür. Berrak hücreli tümörlerin de endometriozisten dolayı oluştuğu düşünülmektedir. Adını taşıdığı histolojik özelliğe bağlı olarak “berrak hücreler” içerdiği için almıştır. Platin ve taksan bazlı kemoterapiye yanıtı düşük olduğu için prognozu kötüdür. (Desai ve diğ., 2014). Gen anlatım çalışmaları sayesinde sadece berrak hücreli tümörlerde anlatımı artmış genler bulunmuştur. Bunlar arasında *GPX3* “*Glutathione peroxidase 3*”, *SOD2* “*Superoxide dismutase 2*” ve *GLRX* “*Glutaredoxin*” bulunmaktadır. Bunlar gibi oksidatif stres cevabında rol oynayan genlerin aşırı anlatımı ile bu tümörün kemoterapiye karşı direncin açıklanmasına yardımcı olmaktadır (Testa

ve diğ., 2018). *ARID1A* “*AT-rich interaction domain 1A*” tümör baskılayıcı genindeki somatik mutasyonlar, sıklıkla berrak hücreli tümörlerde tanımlanmıştır (Koshiyama et al., 2017). EOK’de tanımlanmış mutasyonlar Şekil 2.4’te özetlenmiştir.



Şekil 2.4: Epitelyal over kanserinin alt tipleri ile ilişkili mutasyonlar (Banerjee ve Kaye, 2013).

2.1.4.OVER KANSERİNİN TEŞHİSİ

OK klinik, hücresel ve moleküler düzeyde farklı biyoloji ve davranışa sahiptir. Klinik olarak, OK genellikle pelviste karmaşık bir kistik kitle halinde bulunur. OK sessiz katil olarak adlandırılrsa da hastalığın hala overlerle sınırlı olduğu durumlarda bile hastaların %80'den fazlası EOK semptomlarını göstermektedir. Bununla birlikte, bu semptomlar birçok yaygın gastrointestinal, genitoüriner ve jinekolojik durumlarda da görüldüğü için henüz erken teşhis için yeterli değildir (Bast Jr ve diğ., 2009).

2.1.4.1. Over Kanserinin Teşhisinde Kullanılan Yöntemler

Tarama, bir testin asemptomatik risk altındaki bir popülasyona, daha erken veya daha iyileştirilebilir bir aşamadaki hastalığı saptamak için yapılan testlerin bir kombinasyonu olarak tanımlanır (Koshiyama ve diğ., 2017). Tarama sonucunun pozitif çıkması durumunda, hastalık tedavisine yönelik daha fazla araştırmaya ve ardından uygun tedaviye ihtiyaç vardır. Nüfusun ortalama kanser riski taraması, genel olarak her uygun bireyin kalitatif tarama, ileri tanı ve tedavi hizmetlerine eşit erişime sahip olduğu bir halk sağlığı programı kapsamında ele alınmaktadır. Böyle bir halk sağlığı programı aracılığıyla tarama yapmak için uygun olan bir hastalığı seçme kriteri 1968'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) için Wilson ve Jungner tarafından tanımlanmıştır ve bu kriterler hala küçük değişiklikler uygulanmaktadır. Herhangi bir kanser tarama testinin en önemli ölçütü, tarama testinin hedef popülasyondaki söz konusu kanserden ölüm oranını azaltma yeteneği olabilir. Ayrıca, testlerin güvenli olması için, nüfus uygulamasında uygulanabilmesi ve taramadan kaynaklanan potansiyel zararların (yanlış pozitif tanı ve sonuçta oluşan müdahaleler) kabul edilebilir sınırlar içinde olması ve faydaların olası zararlardan daha ağır basması gerekmektedir (Basu ve Vale, 2017). OK tespiti için günümüzde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler sırasıyla aşağıda açıklanmıştır:

- **Pelvik Muayenesi**

Pelvik muayene, transvajinal ultrasonografi (TVS) ve serum CA-125 seviyesinin tespiti over kanserinin saptanmasında standart yöntemlerdir. Bununla birlikte, yalnızca pelvik muayene erken tanı veya premalin bir lezyonu normal bir yumurtalıktan ayırmada etkili değildir. Yalnızca pelvik muayeneye dayalı pelvik kitlenin saptanmasının duyarlılığı %40 ve özgüllüğü %90 oranındadır. Bu oranlar ile yalnızca pelvik muayenenin etkili bir tarama testi olmadığı kanıtlanmaktadır (Nguyen ve diğ., 2013).

- **Kan Testleri**

Kanser teşhisi konulması için kırmızı kan hücresi, beyaz kan hücresi ve trombosit seviyelerini belirlemek amacıyla kan sayımı testleri gerekmektedir. Bazı over stromal tümörleri, inhibin, östrojen ve testosteron gibi hormonların kanda yükselmesine neden olur. Ayrıca, OK tespiti için kandan CA-125 (kansere antijen 125) testinin de yapılması gerekmektedir. Yüksek CA-125

seviyesine (>35 U/ml) sahip kadınların over kanseri olma riski yüksektir (American Cancer Society, 2018).

- **Tanısal Görüntüleme**

Transvajinal ultrasonografi (TVS), adneksin (overlerin ve tüplerinin birlikte değerlendirilmesi) değerlendirilmesi için tercih edilen ilk tanı yöntemidir. Bununla birlikte, over kanserinin kesin tanısı için TVS'nin duyarlılığı ve özgüllüğü sınırlıdır (Nguyen ve diğ., 2013). TVS, over kitlelerinin saptanmasını kolaylaştıran, over boyutu ve şeklinin ayrıntılı görüntülerini sağlayan, invaziv olmayan bir tekniktir. TVS sadece over hacminde belirgin bir artışa neden olan tümörleri saptayabilmektedir. Over genişlemesinden önce overden diğer pelvik bölgelere hızla yayılabilen seröz tip tümörleri saptamada yetersiz kalmaktadır. TVS taraması yanlış pozitif sonuçlara eğilimlidir, çünkü malin over tümörleri, postmenopozal kadınlarda oldukça yaygın görülen kist ve fibromlar gibi benign adneksiyal kitlelerden ayırt edememektedir. Tek başına TVS uygun bir ön-tarama tarama testi olmamakla, serum biyobelirteç testinden sonra yararlı bir ikincil tarama aracı olarak kullanılabilir (Karst ve Drapkin, 2010).

- **Laparoskopi**

Laparoskopide, doktorun overlere ve diğer pelvik organlara ve dokulara bakabileceği ince ve ışıklı bir tüp kullanılır. Tüp alt karın bölgesindeki küçük bir kesikten geçirilir ve pelvis veya karın görüntülerini bir video monitörüne gönderir. Laparoskopi, cerrahiye veya diğer tedavileri planlamaya yardımcı olan ve doktorların kanserin aşamalarını doğrulamasına yardımcı olabilecek organların bir görünümünü sağlamaktadır (American Cancer Society, 2018).

- **Kolonoskopi**

Kolonoskopi, kalın bağırsağın iç kısmını incelemek için kullanılan bir tekniktir. Kolon ve rektumun tüm uzunluğunu kolonoskopi, ince, esnek, ışıklı bir tüple ve sonunda küçük bir video kamerayla inceler. İnceleme sırasında görülen herhangi bir kitle biyopsi ile test edilebilir. Bu prosedür, kolorektal kanserin tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır (American Cancer Society, 2018).

- **Biyopsi**

Biyopsi; farklılaşmanın kanser olup olmadığını kesin olarak belirlenmesinin tek yoludur. Şüpheli alandan kesit alınır ve mikroskop altında incelenir. OK için, biyopsi çoğunlukla tümör çıkartılarak yapılır. Nadir durumlarda, şüpheli bir OK, laparoskopi prosedürü sırasında veya doğrudan karından tümöre yönlendirilen bir iğne ile biyopsi yapılabilir. Genellikle iğne, ultrason veya bilgisayarlı tomografi (CT) taraması ile yönlendirilir. Bu sadece ilerlemiş kanser veya başka ciddi tıbbi durumlar nedeniyle ameliyat yapılamazsa uygulanır, çünkü bir biyopsi kanserin yayılmasına neden olabilir. Eğer assit (batın içinde sıvı birikmesi) oluşumu varsa, kanserin teşhisi için sıvı örnekleri de kullanılabilir (American Cancer Society, 2018).

2.2.OVER KANSERİNDE TÜMÖR OLUŞUMU VE TÜMÖR OLUŞUMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Hücre proliferasyonu, kanserin en önemli ayırt edici özelliğidir ve düzensizliği tümör oluşumunun önde gelen nedenlerindedir. Hücre döngüsü, hücre proliferasyonunu teşvik etmek ve engellemek arasındaki dengeyi sağlamak için hücre içi düzenleyiciler ve hücre dışı sinyal molekülleri tarafından kontrol edilir. Hücre büyümesi veya bölünmesi kontrolden çıktığında hücreler kanserleşmeye başlar. Yıllar süren çalışmalarda, bazı mikroRNA (miRNA)'ların işlevsel olarak birden çok kritik hücre proliferasyon yoluna entegre olduğu ve bu miRNA'ların işleyişinin bozulmasının, büyüme baskılayıcılarından kaçınma ve kanser hücrelerinde proliferatif sinyalleşmeyi sürdürmekten sorumlu olduğu bulunmuştur. Bir transkripsiyon faktörü ailesi olan E2F proteinleri, hücre döngüsüne bağımlı bir şekilde hücre proliferasyonunun kritik düzenleyicilerindedir. Yapılan çalışmalarda miRNA'ların E2F ifadesinin düzenlenmesinde yer aldığını göstermektedir. E2F üyesi olan E2F1, G1/S geçişi sırasında 66 hedef gen transkripsiyonunu indüklemektedir ve E2F1 anlatımı eksik olan farelerde çeşitli kanser türleri oluşumu gözlemlendiği için bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanır. Hücre döngüsü ilerlemesi, miRNA'lar tarafından geniş çapta düzenlenmiş olan farklı siklinlere, siklin bağlı kinazlara (Cdks) ve bunların inhibitörlerine bağlıdır (Hatfield ve diğ., 2005). Apoptozdan kaçma, miRNA'lar tarafından düzenlendiği düşünülen, tümör progresyonunun bir başka belirleyici özelliğidir. Tümör hücreleri, apoptozu sınırlamak veya atlatmak için çeşitli stratejiler geliştirir. Bunlar arasında, p53 tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybı en yaygın olanıdır. Apoptozdan kaçınmanın alternatif yolları arasında, antiapoptotik

regülatörlerin artışı, proapoptotik faktörlerin baskılanması ve ekstrinsik ligandların yol açtığı ölüm yolunun inhibe edilmesi yer alır. Anti-apoptoza katılan bileşenler miRNA'lar tarafından geniş ölçüde inhibe veya aktive edilir (Peng ve Croce, 2016).

Kanser biyolojisinde, bir “*driver*”, sürücü düşüncesi, tümörögenezi başlatan önemli genetik mutasyonları tanımlamak için kullanılır, kanser hücresine doğrudan veya dolaylı olarak seçici bir büyüme avantajı sağlayan genetik mutasyonlar, “*driver mutations*” sürücü mutasyonları olarak adlandırılır. Sürücü mutasyonlarını barındıran ve kanser hücrelerine büyüme avantajı sağlayan iki gen sınıfı; onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Tümör baskılayıcı genleri susturan onkogenler veya aktive edici mutasyonlar, kanser hücrelerinin hücre bölünmesindeki kontrol noktalarından kaçmasına ve tümör büyümesini desteklemesine izin verir (Chatterjee ve diğ., 2018). Pek çok bilinen tümör baskılayıcı genler over onkogenezinde rol oynamaktadır. Onkogenlerin tek bir genetik olay ile aktive edilebilmesine rağmen, bir tümör baskılayıcı geninin işlevini kaybetmesi için her iki allelinin de etkisiz hale getirilmesi gerekir (Matulonis ve diğ., 2016).

2.2.1.METASTAZ OLUŞUMU

Kanser, moleküler ve fenotipik özelliklere sahip heterojen bir hastalıktır. Dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve yeni vakaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Önemli olarak, kansere bağlı ölümlerin %90'ı metastazdan ve tümör hücrelerinin vücuttaki uzak organlara yayılma özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Kanser metastazı zorlu ve ölümcül bir mücadeledir. Metastatik kanseri tedavi etmek için etkili terapiler yoktur. Metastatik hastalık riski yüksek olan hastaları tanımlamak için maliyet, zaman ve biyobelirteçlerin eksikliği nedeniyle, erken evre kanserli hastalarda metastaz önleme çalışmalarını yürütmek zor olmaktadır. Bu nedenle, metastaz için yeni prognostik belirteçler, spesifik anomalileri hedefleyen yeni ajanlar ve tedaviye yanıt için etkili prediktif belirteçler geliştirmek acildir. 2007'den bu yana, onkogenlerin düzenlenmesi, tümör baskılayıcı genler, metastaz genleri, kanser kök hücre özellikleri, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), mikro çevre ve ekzosom sekresyonu gibi miRNA aracılı metastaz düzenlemesinin altında yatan çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır. Ayrıca miRNA biyogenez enzimleri ve regülatörleri de metastazda fonksiyonel rol oynamaktadırlar. Metastaz sürecinde etkili olan miRNA regülasyonu ilk kez 2007 yılında bildirilmiştir. Ma ve diğ. tarafından yürütülen bir çalışmada, normal insan meme epitel hücreleri, metastatik olmayan göğüs kanseri hücreleri ve metastatik göğüs kanseri hücreleri

arasındaki miRNA anlatımlarını karşılaştırılarak metastaza bağlı miRNA'lar tanımlanmıştır. İnsan meme kanseri hücre dizilerindeki miR-10b'nin aşırı anlatımının ortotopik ksenograft modelinde akciğer metastazı geliştirdiğini bulmuşlardır (Yoo ve diğ., 2017). Spesifik miRNA'ların tümör metastazını desteklediği veya baskıladığı gösterilmesine rağmen, son çalışmalar miRNA biyogenezi düzenleyicilerinin de metastatik progresyonda fonksiyonel rol oynadığını göstermiştir. MiRNA biyogenezinde rol oynayan “*Drosha*” ve “*Dicer*” adlı iki enzimin kanserde regülasyonu azalmaktadır ve bu iki proteinin düşük anlatım seviyeleri, kötü klinik sonuçlar ile ilişkilidir. “*Dicer*” anlatımı düzenleyicileri, muhtemelen miR-200 aile üyeleri gibi miRNA'ları baskılayan metastaz modülasyonu yoluyla, tümör metastazında rol oynamaktadır (Kim ve diğ., 2018).

Kanserli hücreler, birincil over tümöründen tek hücreler veya kümeler olarak ayrıldıktan sonra, periton sıvısının omentuma fizyolojik hareketi ile taşınan pasif bir mekanizma ile metastaz yaptıkları düşünülmektedir. Over karsinom hücreleri ayrılmadan ve metastatik yolculuklarına başlamadan önce, sıklıkla epitelyal hücrelerin bazal membrana bağlanmasını kolaylaştıran ve kanser hücreleri arasındaki hücreler arası yapışıklıkları gevşeten bir epitelyal-mezenkimal (EMT) geçişine uğrarlar. Komşu epitelyal hücrelerin yapışması için kritik olan moleküllerden biri, hücre birleşme yerlerinde bulunan bir membran glikoprotein olan E-kaderin'dir. E-kaderin, alfa ve beta katenin aracılığıyla sitoplazma içindeki aktin mikrofilamentlerine bağlanır, böylece epitelyal hücreleri birbirine bağlar. Genel olarak, epitelyal kanserde E-kaderin kaybı EMT ve invaziv bir fenotip edinimi ile ilişkilidir. Over karsinomasında, assitlerde ve metastatik bölgelerde bulunan kanser hücrelerinin E-kaderin anlatımı primer over tümöründen daha düşüktür (Lengyel, 2010).

2.3.OVER KANSERİNDE KULLANILAN BİYOBELİRTEÇLER

Over kanseri hastalarında hayatta kalma oranlarını arttırmak, kemoterapötik ilaçlara verilen yanıtın izlenmesine yardımcı olmak, OK taraması ve erken saptanması için spesifik ve daha hassas biyobelirteçler keşfedilmeli ve geliştirilmelidir.

2.3.1. CA-125 VE HE-4

CA-125 (kanseri antijen 125) OK için en yaygın olarak kullanılan biyobelirteçtir. Seviyesi, evre I epitelyal kanserlerin yaklaşık %50'sinde ve evre II epitelyal kanserlerin yaklaşık %90'ında (>35 U/ml) artış göstermektedir. Bununla birlikte, menstrüasyon, endometriozis, fibroid veya

pelvik enflamasyon hastalığı sırasında CA-125 seviyesinde artış görülebilir (Basu ve Vale, 2017). Bazı OK histotiplerinde CA125 anlatımı yapılmamaktadır. Özellikle epitel olmayan tümörler de (germ hücreli ve seks kord stromal tümörler) CA-125 glikoproteinini yapısal olarak anlatımı yapılamamaktadır. CA-125'in anlatımı seröz tümörlerde yüksektir ancak müsinöz tümörlerde daha düşüktür. Buna göre, EOK'nin %20'sinde CA-125 anlamlı düzeyde ifade edilmediğinden, hastalığın erken evrelerinde düşük duyarlılık ve özgüllük göstermektedir. Ayrıca Kafkas ırkından kadınlarda, Afrikalı ve Asyalı kadınlardan daha yüksek CA-125 konsantrasyonu görülmektedir (Montagnana ve diğ., 2017). Over Kanseri Risk Algoritması (ROCA), bir kişinin seri CA-125 profilleri bilinen vakalar ve kontroller ile karşılaştırarak OK olma riskini hesaplayan bir algoritmadır. Algoritma kadının yaşını, menopoz durumunu, risk durumunu ve serum CA-125'in seri ölçümlerini zaman içinde bir skor üretmek için dikkate alır. Algoritma orta dereceli ve yüksek dereceli risk düzeyini tanımlar. Orta dereceli riskte CA-125 testi 3 ayda bir tekrarlanır ve risk tekrar hesaplanır. Risk derecesi yükselen kadınlar da transvajinal ultrason taraması (TVS)'na başvurur (Basu ve Vale,2017).

İnsan epididimal protein 4 (HE4), insan kromozomu 20q12-13.1 üzerinde haritalanan *WFDC2* “*WAP four-disulfide core domain 2*” geni tarafından kodlanan 13 KDa olan bir proteindir. Schummer ve diğ. ilk kez HE4 geninin, over karsinomlu hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla anlatımının arttığını göstermişlerdir (Schummer ve diğ., 1999). Birkaç yıl sonra, Hellström ve diğ. over karsinomlu hastaların serumunda HE4 konsantrasyonlarını ölçmüş ve HE4'ün over kanseri için potansiyel olarak yararlı bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir (Hellstrom ve diğ., 2003). Aşırı anlatımı yapılmış HE4'ün, OK hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu ve metastazının teşvik edilmesinde doğrudan bir biyolojik role sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak HE4 mükemmel bir OK biyobelirteci değildir; diğer jinekolojik neoplazmalarda özellikle jinekolojik (endometriyal, tubal, vulvar kanser) ve akciğere ilişkin (pulmoner) neoplazmalarda anlatımı artmaktadır. Buna göre, diğer kanser türlerinde özellikle endometrial kanserde ve akciğer kanserinde kullanılmak üzere aday bir biyobelirteç olarak önerilmiştir. Sigara kullanımı ve yaş gibi faktörlerin serum seviyelerinde HE4 biyobelirtecini etkileyebildiği gösterilmiştir. HE4 konsantrasyonunun yaşlılarda daha yüksek olduğu ve sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre üçte bir oranında daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Montagnana ve diğ., 2017).

2.3.2. İMMÜNOLOJİK BİYOBELİRTEÇLER

Bağışıklık sistemi OK'nin gelişiminde ve prognozunda önemli bir parametredir. Konakçı bağışıklık sisteminin OK hastalarının sonuçlarını etkilediği gösterilmiştir. Over kanseri tümörünü infiltre eden immün hücreleri çalışmaları lenfosit düzenleyici T hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler (DH), miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC) ve doğal öldürücü hücreleri (NK) tümörün biyolojik davranışını, kanser terapisi ve prognozunu belirleyebileceği gösterilmiştir. Periferik kandaki mutlak lenfosit sayısının over kanserindeki tümörü infiltre eden lenfositlerden (TIL) bağımsız olarak over kanserinde sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur. T lenfositleri, tümörü infiltre eden lenfositlerin önemli bir popülasyonunu temsil eder. Çeşitlilikleri, bu hücrelerin tümör gelişmesindeki önemini değerlendirmeyi zorlaştırır, çünkü T hücrelerinin alt tipleri tümör ilerlemesi üzerinde ters etkiye sahip olabilir. Tümörü infiltre eden CD3⁺ "*cluster of differentiation 3*" T hücrelerinin yüksek yoğunluğu OK dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir. TIL'lerin spesifik alt tipleri arasında sitotoksik T hücreleri (CD8⁺) OK hastalarında iyi sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek dereceli seröz over tümörlerinde TIL'lerin analizleri, CD103'ün (α E integrin) intraepitelyal CD8⁺ T hücreleri tarafından anlatımının hastalığa özgü sağkalımın artması ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Makrofajların sayıları sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında tümörlerde artış gösterir. Genel olarak tümör epitelyal adacıklar içinde yer alan M1 makrofajlarının anti-tümör etkilere sahip olduğu ve stromada bulunan M2 hücrelerinin ise tümör büyümesini desteklediği bilinmektedir (Szajnik ve diğ., 2016).

2.3.3. TÜMÖR KAYNAKLI EKSOZOMLAR

Eksozomlar, dolaşımdaki vücut sıvılarının çoğunda bulunan ve kanser dahil olmak üzere farklı hücresel sistemlerde otokrin ve parakrin etkilere aracılık eden proteinler, mRNA'lar ve miRNA'ları içeren salgılanmış 30-100 nm boyutundaki lipoprotein vesikülleridir. Eksozomlarda bulunan proteinler adhezyon, sinyal transdüksiyonu, membran transportu ve füzyonu, bağışıklık yanıt modülasyonu ve sitoskeletal organizasyonu içeren çoklu biyolojik yollarda yer alır. Eksozomların, OK hastalarının serumunda kontrollerle karşılaştırıldığında anlatımının arttığı ve OK hastalarının serumundaki eksozomların, kanserde ve aynı zamanda çeşitli glikanlardaki terapötik müdahale için bir hedef olarak kabul edilen "*gap junction protein claudin-4*" içerdiği bildirilmiştir. Eksozomlar OK periton sıvılarında saptanmış ve bu bölgede bağışıklık yanıtını bastırmaya aracılık ettiği gösterilmiştir (Davidson ve Trope, 2014).

2.3.4. GEN TEMELLİ OVER KANSERİ BİYOBELİRTEÇLERİ

Over tümörlerinin büyük çoğunluğu genetik hasarın birikmesinden dolayı oluşmaktadır. Genetik değişiklikler ile over tümörü oluşumu arasında yakın bir bağlantı olduğu göz önüne alındığında, gen düzeyindeki araştırmaların (kalıtsal gen mutasyonları, epigenetik değişiklikler ve gen anlatımı çalışmaları dahil) potansiyel over kanseri biyobelirteçleri olarak kullanılabilir (Szajnik ve diğ., 2016).

2.3.4.1. Kalıtsal Gen Mutasyonları

Tüm EOK'lerin en az %10'u kalıtsaldır ve vakaların %90'ında meme kanserindeki tümör baskılayıcı genlerinin (*BRCA1* ve *BRCA2*) germline mutasyonları görülür. Geri kalan %10'luk kısmın çoğu Lynch sendromunun duyarlılık genleri olan *hMLH1* "human mutL homolog 1" ve *hMSH2* "human mutS homolog 2" olmak üzere DNA yanlış eşleşme onarım "DNA mismatch repair" (*MMR*) genlerinin germline mutasyonlarından kaynaklanır. Araştırmalar sonucunda her iki BRCA proteininin gen anlatımının transkripsiyonel regülasyonuna ayrıca DNA hasarın belirli formlarının tanınmasına veya onarılmasına katıldığı gösterilmiştir. *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları başlıca çerçeve kayması ya da "nonsense" özelliklidir. *hMLH1* ve *hMSH2* genleri önemli DNA onarım mekanizmalarında yer alır ve DNA replikasyonu sırasında nükleotid uyumsuzluğunun onarımından sorumludur. Bu genlerin mutasyonları için genetik testler, OK gelişme riski yüksek olan hastaları teşhis etmede ve OK riskini azaltmak için müdahale stratejileri tasarlamada yardımcı olabilirler. *MMR* genlerinin mutasyonları hücrelerin DNA replikasyonu sırasında normal olarak üretilen hataları onarabilme yeteneğini değiştirmektedir (Szajnik ve diğ., 2016). *EGFR* "epidermal growth factor receptor" 30% ile 70% arasında EOK'de ifade edilmektedir. Malign fenotip ile ilişkili hücresel süreçlerin çoğu *EGFR* aktivasyonu ile başlamaktadır (Fischer ve diğ., 2004).

2.3.4.2. Gen Anlatımı

Serum veya tümör dokusundaki belirli genlerin anlatımlarının kantitatif veya yarı kantitatif analizi, tümör teşhisine yardımcı olma potansiyeline sahiptir. Gen anlatımı analiz çalışmaları, mikrodizilim teknolojisinin gelişmesine bağlı olarak hızlı bir şekilde ilerlemiştir ve bir doku örneğindeki on binlerce genin anlatımı aynı anda analiz edilebilmektedir. Bu yüksek verimli teknoloji ile güçlü veri analiz yazılımı birleştiğinde, normal ve malign hücreler karşılaştırılıp kanser gelişimi sırasında farklı olarak düzenlenmiş olan genlerin tanımlanması sağlanır. Gen

anlatımının seri analizi olan SAGE “*serial analysis of gene expression*”, over kanserinde gen anlatımının kantitatif analizi için kullanılan bir diğer önemli teknolojidir. SAGE, mRNA transkriptlerinin ölçümünü kolaylaştırır ve normal ve patolojik hastalık dokusunun gen anlatım profillemesini sağlar. SAGE tekniği, daha önce karakterize edilmemiş genlerin tanımlanmasına izin veren yeni transkriptlerin anlatımını tespit etme kapasitesine sahiptir, böylece ifade profillemesinde uygulanan geleneksel mikrodizi bazlı yaklaşıma göre avantaj sağlar. Over kanserinde anlatımı arttığı bilinen ve yeni bulunan genler SAGE teknolojisi ile tanımlanmıştır. Bu genler arasında *CLDN3* “*claudin 3*”, *WFDC2* (*HE4*), *FOLR1* “*folate receptor 1*”, *COL18A1* “*collagen type XVIII a1*”, *CCND1* “*cyclin D1*” bulunmaktadır (Zhang ve diğ., 2011). Over kanserinde gen anlatımı profillemesinin potansiyel klinik değeri hakkındaki bilgi üç ana alana odaklanmaktadır:

- over tümörlerinden normal over dokusunu ayırt etmek
- over kanserinin farklı alt tiplerini tanımlamak
- kanserin tedaviye yanıtını test etmek ve terapiyi yönlendirmek

EOK'de gen anlatım profili prognostik bilgi sağlamak, platin bazlı kemoterapiye yanıtı öngörmek ve farklı histolojik alt tipler arasında ayırım yapmak için kullanılmıştır (Szajnik ve diğ., 2016).

2.3.4.3. Tüm Genom Dizileme

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH “*Comparative Genomic Hybridization*”), genlerin kopya sayısının artmasını veya azalmasını tespit eden tüm genom analiz yöntemidir. Bu test kullanılarak, OK'de anormal kopya sayısına sahip genlerin bulunduğu kromozom bölgeleri tespit edilebilir (Coticchia ve diğ., 2008). Tüm genom dizileme tekniği olan NGS kanser genomunun kapsamlı karakterizasyonu hakkında bilgi verir. Kanser teşhisinde ve tedavi seçiminde iyileşmelere yol açar. Mevcut hedeflenmiş yöntemlere göre daha kapsamlı bir genetik risk değerlendirmesi sağlayan tüm genom dizileme aile öyküsü olan hastalarda genetik tarama için önemli bir tekniktir. Genetik kliniklerde tedavi gören hastalar için kanser ilerlemesi tespitinin yanı sıra kanser genetik riskinin daha iyi anlaşılması sağlanmaktadır. Genomik dizilemeden elde edilen bilgiler erken teşhis için biyobelirteç olarak kullanılabilir (Foley ve diğ., 2015).

2.3.5. EPİGENETİK TEMELLİ BİYOBELİRTEÇLER

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarını içeren epigenetik mekanizmalar gen anlatımı düzenlenmesinde rol oynarlar ve tümör başlangıcında ve ilerlemesinde etkilidirler. Spesifik genlerin promotör bölgelerinin metilasyon profillerinin analizi, kanserin erken evrede teşhisine yardımcı olabilir, prognozu belirleyebilir ve tedavi yanıtını tahmin edebilir. Epigenetik mekanizmalarla anlatımı değişen spesifik genlerin tanımlanması OK'de aktif olarak araştırılmaktadır (Zhang ve diğ., 2011). Bu alanda yapılan araştırmalar, gen metilasyon kombinasyonlarının yüksek hassasiyet ve özgüllükle OK biyobelirteçleri olarak kullanılabilceğini göstermiştir (Szajnik ve diğ., 2016). OK sırasında heterokromatin DNA bölgesinde metilasyonu azalması, birkaç onkogenin demetilasyonuna ve tümör baskılayıcı genlerin promoterleri ile ilişkili spesifik CpG adalarının hipermetilasyonuna yol açar. DNA onarımından sorumlu olan MutL homolog 1 (MLH1) aynı zamanda hastalardaki platin bazlı tedaviye direncin artmasına yol açan OK'de hipermetile olmuş *MLH1* geni tarafından kodlanır. Epigenetik biyobelirteçler prognostik bilgi sağlayabilir. Seeber ve Van Diest tarafından elde edilen verilere göre, OK için olası bir prognostik değere sahip metillenmiş genler *HOXA11* “*homeobox A11*”, *FBXO32* “*F-box protein 32*” ve *IGFBP-3* “*insulin like growth factor binding protein 3*” dahil kötü prognoz ve yüksek mortalite oranı ile ilişkilendirilmiştir (Seeber ve van Diest, 2012). Montavon ve diğ. HOXA9'u (homeobox protein A9) kodlayan genin, yüksek dereceli seröz over karsinomunun %97,5'inde ve normal over yüzey epitelinin sadece %8'inde metillendiğini bulmuştur. Ayrıca HOXA9 ve EN1'in “*engrailed homeobox1*” CA-125 seviyeleriyle kombinasyon oluşturan metilasyonu, yüksek dereceli seröz over kanserini %100'lük bir duyarlılık ve %91,7'lik bir özgüllük ile normal over epitelyumdan ayırt edebilmiştir. Bu da OK tespiti için HOXA9 metilasyonunun potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir (Montavon ve diğ., 2012).

2.3.5.1. MikroRNA Temelli Biyobelirteçler

MikroRNA (miRNA)'lar kanser progresyonu, hücre invazyonu, metastaz, hücre sağkalımı ve terapötik ilaçlara yanıt gibi çoğu yolakta önemli roller oynamaktadır. Ayrıca onkogen ve tümör baskılayıcı genler olarak da görev aldıklarından biyobelirteç olarak kullanım için önemli bir potansiyele sahiptirler. MiRNA'lar EOK tanı ve prognozu için incelenen diğer biyobelirteçlerden daha hassas ve özgündür. MiRNA'ların farklı dokularda yapılan anlatım profillerinin yanı sıra serum ve plazmada da profillemeleri yapılmış ve invaziv olmayan

biyobelirteçler olarak kullanılabilirler sonucuna varılmıştır. Biyobelirteç olarak kullanılmalarının avantajlarından biri, serum ve plazmada korunmuş bir halde bulunmaları, dolayısıyla doğrudan serumdan miRNA anlatım profillerinin saptanmasına olanak sağlamasıdır. Örneğin, aynı hastalardan alınan serum ve tümör kaynaklı miRNA anlatım profilleri yapılmış ve 8 miRNA'nın (miR-21, miR141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205, and miR-214) ortak olduğu bulunmuştur (Pal ve diğ., 2015). Başka çalışmada, EOK hastaları ve sağlıklı grubunun serum örnekleri karşılaştırılmış ve EOK hastalarında 8 miRNA'nın anlatımının değiştiği tespit edilmiştir. Bunlardan 5 miRNA'nın (miR-21, miR-92, miR-93, miR-126, ve miR-29a) anlatımı EOK hastalarında artarken 3 miRNA'nın (miR-155, miR-127, ve miR-99b) anlatımının hasta grubunda azaldığı gözlemlenmiştir. Mir-21, mir-92 ve mir-93'ün, normal CA-125 seviyeleri olan hastalarda aşırı anlatımının olduğu bulunmuştur. Bu da miRNA'ların OK'nin erken teşhisi için kullanılabilirliğini göstermektedir (Eitan ve diğ., 2009).

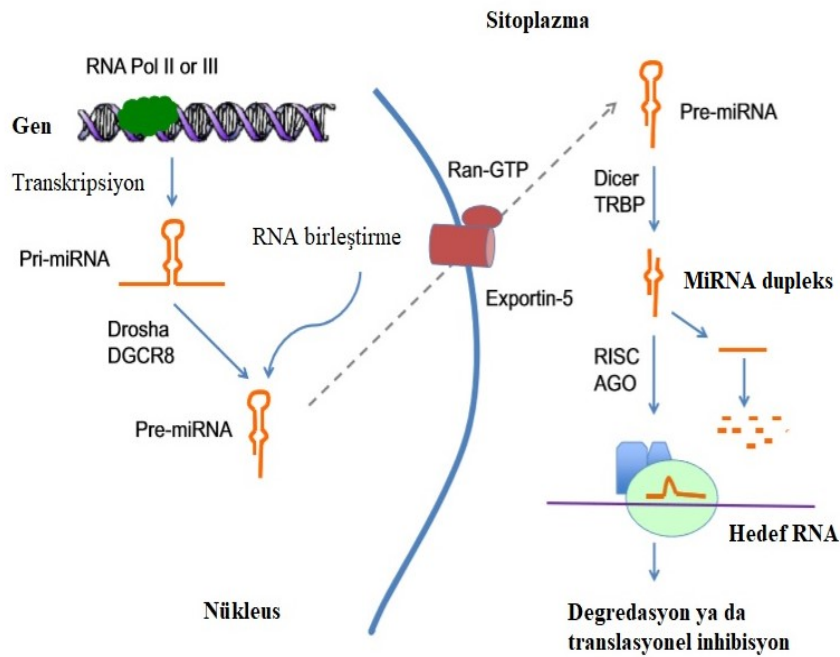
2.4. MİKORNA

MikroRNA (miRNA), DNA ve mRNA'nın tamamlayıcı sekanslarını hedefleyerek gen anlatımının transkripsiyon ve post-transkripsiyon regülasyonunda görev alan, 20-22 nükleotid uzunluğunda küçük ve kodlama yapmayan RNA (ncRNA) molekülleridir. miRNA'lar proliferasyon, apoptoz, hücre döngüsü ve farklılaşma dahil olmak üzere çoğu hücre fonksiyonları etkilemektedir ve çok sayıda kanser türüyle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Prahm ve diğ., 2016).

2.4.1. MİKORNA BİYOGENEZİ

İlk miRNA nematod *Caenorhabditis elegans*'ta 1993 yılında keşfedilmiştir ancak miRNA'ların genel düzenleyici işlevleri 2001 yılına kadar aydınlatılamamıştır. Bu tarihten itibaren çeşitli türlerde binlerce miRNA tanımlanmıştır (Lin ve Gregory, 2015). MiRNA transkripsiyonu ilk olarak nükleusta RNA-polimeraz II (RNA Pol II) tarafından yapılır ve primer miRNA (pri-miRNA) olarak adlandırılan uzun bir öncü molekül sentezlenir. Pri-miRNA, miRNA dizilerini içeren kısa "saç tokası" yapılarını oluşturabilir (Prahm ve diğ., 2016). Pri-miRNA; RNaz III ailesinin üyesi olan "*Drosha*" enzimi ve onun RNA bağlayıcı proteini *DGCR8* "*DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Protein*" tarafından kesilerek yaklaşık 70 nükleotid boyutunda öncül miRNA (pre-miRNA) oluşur. Ardından pre-miRNA Exp-5 "*Exportin 5*" ve *RAN-GTPaz*

“*Ras-related nuclear protein*” tarafından sitoplazmaya taşınır (Lan ve diğ., 2015). Pre-miRNA sitoplazmada RNase III ailesinin üyesi olan “*Dicer*” enzimi ve onun RNA bağlayıcı proteini TRBP “*Human Immunodeficiency Virus Transactivating Response RNA Binding Protein*” tarafından kesilip 22 nükleotid uzunluğunda çift zincirli RNA molekülünü oluşturur. Oluşan çift zincirli RNA molekülünün RISC “*RNA-Induced Silencing Complex*” Kompleksine bağlanması RNA interferansa (RNAi) neden olmaktadır ve zincirlerden biri bozulurken diğer zincir tamamlayıcı hedefleri tanımlamak için kullanılan miRNA'dır. RISC yoluyla, miRNA'lar genellikle mRNA translasyonunu inhibe eder ve mRNA yıkımını teşvik eder (Şekil 2.5) (Prahm ve diğ., 2016).



Şekil 2.5: MiRNA biyogenezinin şematik gösterimi (Kim ve diğ., 2018).

2.4.2. MİKRORNALARIN İŞLEVLERİ

MiRNA genleri; kodlanmayan DNA lokuslarında ya da protein kodlayan genlerin intronlarında bulunmaktadır (Lan ve diğ., 2015). Memelilerde miRNA'lar tüm protein kodlayıcı genlerin yaklaşık %50'sinin aktivitesini kontrol etmektedir (Krol ve diğ., 2010). Çoğu araştırma ile kanserde miRNA anlatımının değiştiği kanıtlanmıştır.

2.4.2.1. Onkogen ve Tümör Baskılayıcı Gen Rolünde MikroRNAlar

Kanser hücrelerinde miRNA'lar onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak işlev görebilir. Tümörlerde anlatımı artmış miRNA'lar tümör baskılayıcı genleri inhibe ederek tümör gelişimini destekledikleri için sıklıkla onkogen olarak adlandırılırlar. Buna karşın, miRNA'lar onkogen anlatımını veya hücre farklılaşması ve apoptozu kontrol eden genleri inhibe ederek tümör gelişimini engellediklerinden dolayı tümör baskılayıcı olarak görev alabilirler (Palma Flores ve diğ., 2017). En iyi bilenen ve insanlarda bulunan ilk miRNA olan let-7, tümör baskılayıcı rolündedir ve *MYC* “*MYC proto-oncogene*”, *CDK6* “*cyclin dependent kinase 6*”, *HMG2* “*high mobility group AT-hook 2*” ve *BACH1* “*BTB domain and CNC homolog 1*” dahil olmak üzere birçok onkogeni hedefler. İnsanda let-7 diğer miRNA'lardan daha fazla bulunmaktadır. Let-7 anlatımı akciğer tümörlerinde normal akciğer dokusundan daha düşük bulunmuştur. Let-7'nin anlatımı hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak kanser hücresi büyümesini baskılayabilmektedir. Let-7'nin kaybı, çeşitli insan tümörlerinin patogenezinde katkıda bulunmaktadır. Mir-21 ise onkogen olarak görev almaktadır ve akciğer, over, meme kanseri ve lenfoma da dahil olmak üzere çoğu kanser türünde anlatımı artmaktadır. MiRNA-155, tümör oluşumunu tek başına indüklemektedir. Çeşitli B hücre malignitelerinde, Hodgkin lenfomasında ve Burkitt lenfomalarında miRNA-155'in anlatımının arttığı bildirilmiştir ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. İlk tanımlanmış onkogenik miRNA kümesi miRNA-17-92'dir (oncomiRNA-1). İnsanlarda kromozom 13q31.3'te bulunmaktadır. MiRNA-17-92 anlatımı lenfoma, akciğer kanseri ve çeşitli kanser türlerinde artmaktadır (Kim ve diğ., 2018).

2.4.3. MİKRORNALARIN KANSERDEKİ MEKANİZMASI

Son yıllarda yapılan birçok araştırma ile kanserde miRNA anlatımının değiştiği kanıtlanmıştır. 2004 yılında miRNA'ların yaklaşık %50'sinin kırılğan bölgelerde ve kanser duyarlılık bölgelerinde bulunduğu bildirilmiştir (Calin ve diğ., 2004). 2002 yılında ilk defa Calin ve diğ.'nin yaptığı bir araştırma ile, 13q14 kromozom lokusunun silinmesi nedeniyle mir-15a ve mir-16'nın anlatımının kronik lenfositik lösemide (KLL) kaybolduğu gösterilmiştir (Calin ve diğ., 2002). Lu ve diğ. yaptıkları çalışmada, toplam 334 normal ve tümör doku örneklerinde miRNA anlatım analizi yapmış ve 217 miRNA'nın anlatım değişimini araştırmışlardır. Tümör dokusunda anlatımı artmış veya azalmış miRNA'ları tanımlamışlar ve miRNA'ların mRNA'lara göre kanser tiplerini daha iyi sınıflandırdıklarını bulmuşlardır (Lu ve diğ., 2005). İnsan kanserinde miRNA aktivitesinin birçok temel ve genel ilkesi tanımlanmıştır. MiRNA

kanser ilişkisinin önemli yönlerinden biri, her tür insan kanserinde kanser spesifik miRNA'ların tanımlanmasına olanak tanıyan yüksek verimli teknolojilerin varlığıdır. Diğeri ise miRNA'ların anlatımı malignitelere artabilir ya da azalabilir olmasıdır. MiRNA'ların tümörün oluşumunda rol aldıkları tam olarak aydınlatılamasa da kanserleşme sürecinde değişen anlatımları nedeniyle onkogen veya tümör baskılayıcı olarak adlandırılırlar. Kanser taramasında miRNA'ların anlatımlarının değişmesinin nedenlerini açıklayan çeşitli mekanizmalar vardır:

- miRNA genlerinin kromozomal değişiklikleri
- DNA nokta mutasyonları
- epigenetik mekanizmalar
- miRNA üretiminden sorumlu transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası elemanlarda genetik ve epigenetik değişiklikler.

Kanserde miRNA'ların biyolojik aktivitesi ile ilgili ortak bir kanı bulunmaktadır: onkogenik miRNA'lar tümör baskılayıcı genlerin ifadesini bastırırken, tümör baskılayıcı miRNA'lar onkogenlerin ifadesini bastırmaktadır (Di Leva ve Croce, 2013).

2.4.3.1. MikroRNAların Over Kanserindeki Rolü

MiRNA'ların OK'de önemli bir rol oynadığını gösteren ilk çalışma 2006 yılında yayınlanmış olup yaklaşık %40 miRNA geninin modifiye olmuş DNA kopya sayısını gösterdiğini belirtmiştir (Zhang ve diğ., 2006). MiRNA'lar OK'de tümör oluşumu, hücre döngüsü, apoptoz, proliferasyon, invazyon ve metastazdan kemoterapi direncinin gelişmesi kadar farklı hücresel fonksiyonlarda görev almaktadırlar. Ayrıca miRNA'lar onkogen ve tümör baskılayıcı genler olarak da işlev gördüklerinden OK için önemli bir biyobelirteç olma potansiyeline sahiptirler (Mahdian-Shakib ve diğ., 2016). 2007 yılında Iorio ve diğ. normal over dokusu ile over kanserini karşılaştırarak miRNA anlatım analizlerinin farklılığı üzerine araştırma yapmıştır. Mir-141, mir-200a, mir-200b ve mir-200c'nin OK'de anlatımının arttığını, mir-125b1, mir-140, mir-145 ve mir-199a'nın anlatımının OK'de azaldığını bulmuşlardır. Mir-140 OK'de sıklıkla silinen 6q22 kromozom bölgesinde yer almaktadır ve miR-140'ın invazyondan etkilenen *MMP-13* "matris metalloproteinaz 13", *FGF2* "fibroblast büyüme faktörü 2" ve anjiyogenik *VEGFA*'yı içeren genleri hedef aldığı düşünülmektedir (Iorio ve diğ., 2007). OK'de anlatımı değişmiş miRNA'lardan en sık rastlananları mir-200 ve let-7 aileleridir. MiR-200 ailesi, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR141 ve miR-429'dan oluşmaktadır ve iki ayrı pri-miRNA

transkriptinden oluşurlar. MiR-200a, miR-200b ve miR-429 1. kromozom üzerinde bulunurken, miR200c ve miR-141 kromozom 12'de bulunur. İnsan let-7 ailesi, Let-7a, Let-7b, Let-7c, Let-7d, Let-7e, Let-7f, Let-7g, Let-7i, miR-98 ve miR-202 miRNA'larından oluşmaktadır. OK de dahil olmak üzere birçok farklı kanser tipinde sıklıkla anlatımı azalmaktadır. Let-7'nin, *KRAS*, *HRAS* “*HRas proto-oncogene, GTPase*”, *c-MYC* “*MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*” ve *HMGA-2* gibi OK'de çoklu onkogenleri baskıladığı ve CD25, CDK6 ve Cyclin A, D1, D2 ve D3 gibi hücre döngüsü aktivatörlerini inhibe ettiği bilinmektedir. Bu çalışmaların sonucunda let-7 ailesinin tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü düşünölmektedir (Prahm ve diğ., 2016).

2.5. OVER KANSERİNDE MİKORNA TESPİTİ İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER

MiRNA'lar klinik uygulamada; dokuda veya formalinlenmiş, parafine gömölü dokularda iyi korunma gibi özellikleri sayesinde uygun biyobelirteçler olsada miRNA'ların saptanması çeşitli özelliklerinden dolayı zorlayıcıdır. Boyutlarının küçük olması, miktarlarının azlığı ve aralarındaki dizi benzerliğinden kaynaklı seçici çoğaltım zorluğu gibi nedenlerden dolayı tespitleri zordur. MiRNA'ların biyolojik işlevlerdeki kritik rolleri ve miRNA analizinin kullanıldığı çalışmaların giderek artması göz önünde bulundurularak miRNA tespit yöntemleri geliştirmek için önemli bir çaba harcanmaktadır. (de Planell-Saguer ve Rodicio, 2013).

2.5.1. NORTHERN BLOTTING VE IN SITU HİBRİDİZASYON (ISH)

Northern blot, gen anlatımını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu metot; total RNA'nın bir poliakrilamid jel üzerinde ayrılması, ardından RNA'nın bir nitroselölöz membrana aktarılması ve hedeflenen miRNA'nın araştırılması temeline dayanır. Bu teknik hem miRNA hem de pre-miRNA'nın saptanmasına izin veren tek yöntemdir ancak uzun zaman alır ve fazla miktarda RNA gerektirmektedir. MiRNA'nın boyutunun küçük ve miktarının az olması nedeniyle Northern blot tekniğinin uygulanması zor olmaktadır. Bununla birlikte literatürde radyoaktif etiketlenmiş veya radyoaktif etiketlenmemiş LNA “*locked nucleic acid*” içeren problemleri kullanan birkaç Northern blot yöntemi vardır. LNA ile modifiye edilmiş Northern blot problemlerinin miRNA'ların tespiti için kullanılması DNA oligonökleotidlerine göre daha hassas ve spesifiktir (Bernardo ve diğ., 2012).

Hücrelerdeki miRNA'ların anlatım düzeylerinin dolaylı olarak ölçülmesi için genel olarak şu şekilde bir prosedür takip edilir: hücreler ilk olarak parçalanır ve elde edilen miRNA daha sonra qRT-PCR, Northern blot veya mikrodizi hibridizasyonu ile tespit edilir. MiRNA'nın fizyolojik fonksiyonunu anlamak için tek hücre seviye ifadesinde miRNA ifadesinin araştırılması gerekmektedir. In situ hibridizasyon (ISH) tekniği, tek hücrede gen anlatımı profillenmesinin tespiti için kullanılır. ISH tekniğinde probalar radyoaktif olarak etiketlenerek ya da florofor bağlanarak otoradyografi ile tespit edilir. ISH'deki gelişmelerle, RNA'nın doku, hücre ve hücre içi düzeyde lokalizasyonunun görselleştirilmesi sağlanmıştır. Olgun miRNA'ların boyutunun küçüklüğü, konvansiyonel ISH yöntemleriyle hücre içindeki spesifik miRNA'yı gözlenmesini ve hedeflenmesini zorlaştırır. Alternatif bir yaklaşım LNA problemlerinin bazı eşleme özellikleri sayesinde sekans spesifitesini sağlayan LNA tabanlı ISH sistemidir. LNA tabanlı ISH sisteminin yüksek çözünürlüklü görüntüleme mikroskobu ile birleştirilmesiyle tek sıçan miyogen hücresinin hücresel düzeyde farklılaşması sırasında miR-206'nın hücre içi lokalizasyonunu belirlenmiştir. (Politz ve diğ., 2006).

2.5.2. KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI REVERS-TRANSKRİPSİYON PCR (qRT-PCR)

Kantitatif gerçek zamanlı revers-transkripsiyon PCR (qRT-PCR), mikrodizilim ve yeni nesil dizileme (NGS) yöntemlerine göre daha kolay uygulanan ve düşük maliyetli bir tekniktir. Bu teknik, hastalık biyobelirteci analizleri için klinikte kullanılmaktadır. qRT-PCR tekniği, miRNA mikrodiziliminin genom çapında profillemeye ile elde edilen sonuçlarını doğrulamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknik hibridizasyona dayanan tekniklerden daha hassastır. Ancak miRNA'ları PCR ile çoğaltmak zorlu bir süreçtir çünkü prekürsör miRNA sabit bir saç tokası yapısına sahiptir ve olgun miRNA boyutu sıradan PCR primerleri için daha kısadır. Hedef miRNA'nın normalizasyonu için çeşitli referans genler kullanılmaktadır ve farklı zamanlarda gerçekleştirilen örnek toplama metodları miRNA anlatım profillerinin karşılaştırılmasında zorluk çıkartmaktadır. qRT-PCR tekniğinde iç kontroller saflaştırma kalitesini test etmek ve varyasyonu normalleştirmek için kullanılmaktadır. Çalışmalarda kullanılan iç kontroller mir-16, U6, U6B, mir-142-3p, 18S rRNA, mir-638, let-7a, mir-1249, mir-295, 5S RNA, RNU38B, RNU43 miRNA'larıdır. Ayrıca cel-mir-39, cel-mir-54, cel-mir-238 gibi spesifik *C. elegans* miRNA'larının sentetik versiyonları da iç kontrol genleri olarak kullanılmaktadır. Ancak hiçbiri geniş çaplı bir şekilde standart kontrol olarak kabul

edilmemiştir. MiRNA'ların güvenilir ve sağlam kanser biyobelirteçleri olarak geliştirilmesi için tamamen doğru bir normalizasyon protokolünün geliştirilmesine ve herbir insan örneği için uygun iç kontrol genlerinin validasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (Shen ve diğ., 2013). qRT-PCR analizinin avantajları arasında yüksek verimlilikte birçok miRNA'nın aynı anda tespit edilmesi bulunmaktadır. Hassasiyet, özgünlük, hız ve kolaylık rutin olarak tanıda kullanılan qRT-PCR tabanlı tekniklerin ortak avantajları arasında yer almaktadır. Klinikte qRT-PCR ile miRNA'ların saptanması; erken tanı testlerinin geliştirilmesini, hastalık progresyonunun takip edilmesini, kanser sınıflandırılmasını, hastalıklardan sorumlu RNA genlerinin taranmasını ve tedavi etkinliğinin izlenmesini sağlar (de Planell-Saguer ve Rodicio, 2013).

2.5.3. MİKRODİZİLİM

Microdizilim teknolojisi, genlerin genom boyutunda anlatımını inceleyen güçlü tekniklerden biridir. DNA mikrodizilim teknolojisini kullanan tüm genom anlatım profili OK gelişimini, histopatolojik alt tiplendirmesini, ilerlemesini, tedaviye yanıtını ve genel sağkalımı etkileyen genlerin anlaşılmasını arttırmıştır. Bu yöntem kullanılarak hem tanı yapılabilir hem de prognostik bilgi elde edilebilir (Nguyen ve diğ., 2013). Mikrodizilim tekniği, aynı anda çok sayıda miRNA'nın anlatım seviyelerini ölçmek için kullanılır. İç kontrol miRNA'lar içeren RNA örnekleri incelenen türdeki her bir tanımlanmış miRNA için problemleri gösteren mikrodizilere hibritlenir. Mikrodizilim ile anlatım profillemesinin bir sınırlaması prob tasarımı için kullanılacak olan dizi bilgisinin gerekliliğidir ve genellikle ticari şirketlerin tescilli algoritmaları tarafından üretilen teorik problemler bilinen miRNA'lara özgü üretilir (Bernardo ve diğ., 2012). Serum veya tümör dokusundaki belirli genlerin anlatımlarının kantitatif veya yarı kantitatif ölçümü tümör teşhisine yardımcı olma potansiyeline sahiptir. Son on yılda gen anlatım alanı büyük ölçüde mikrodizilim teknolojisine bağlı olarak hızla ilerlemiştir, bu da bir doku örneğindeki on binlerce genin anlatımının tek bir deneyle belirlenmesini sağlamaktadır. Bu yüksek verimli teknoloji güçlü veri analizi yazılımı ile birleştiğinde, normal ve kanserli hücreler arasındaki gen anlatımını hızla karşılaştırmaya ve kanser gelişimi sırasında farklı olarak düzenlenmiş olan genleri tanımlamaya izin verir. Mikrodizilim verileri tümörlerin biyolojik teşhis ve prognostik bilgi sağlayabilen transkripsiyonel profillerine göre sınıflandırılması için de kullanılabilir (Szajnik ve diğ., 2016).

2.5.4. YENİ NESİL DİZİLEME (NGS)

DNA ve RNA'nın daha kısa parçalarını dizilemek için geliştirilmiş teknolojiye sahip olan yeni nesil dizileme (NGS) platformları mikrodizilim tekniğinin bazı sınırlamalarının üstesinden gelmektedir. NGS genom çapında miRNA'ların hızlı ve verimli bir şekilde araştırılması için son derece doğru ve ölçeklenebilir bir sistem sunmaktadır. NGS teknolojisinde herhangi bir dizi bilgisine ihtiyaç yoktur ve numunedeki tüm RNA türleri hakkında bilgi sağlanmaktadır. Ancak NGS büyük miktarda RNA numunesi gerektiren pahalı ve iş yükü çok olan bir tekniktir (Shen ve diğ., 2013). Bugüne kadar araştırmacıların karşı karşıya kaldığı en büyük problem dizileme sonucunda elde edilen büyük ve karmaşık veri sonuçları ve bunların yorumlanması için gereken biyoinformatik analizlerdir. NGS tekniğinin maliyetinden dolayı diğer dizilim temelli teknolojiler kadar etkili olmasa da bench üstü dizileme makinaları ile (Miseq vb) bu sorun ortadan kalkmaktadır. Ayrıca NGS'nin ilerlemesi ile elde edilen bilgileri analiz edebilecek veri tabanlarının gelişmesi eşzamanlı devam etmektedir (Bernardo ve diğ., 2012).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1.ÖRNEK TOPLAMA

Proje için örnek toplama işlemleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 23/06/2017 tarihli 12 sayılı kararıyla 2017/647 dosya numaralı etik kurul izni alınmıştır. Çalışma grupları 2'ye ayrılmış olup epitelyal over kanseri hastaları ve over kisti hastaları olarak seçilmiş ve over kisti hastaları kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her iki araştırma grubunda kullanılmak üzere 10 farklı ve aynı yaş aralığında bireyden doku örnekleri toplanmıştır. Ameliyat sırasında alınan doku örnekleri RNAlater® (Ambion, ABD) solüsyonu içeren tüplere konup soğuk zincirle taşınarak İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Tanı ve Analiz Birimi'ne transfer edilmiştir. İzolasyon aşamasına kadar doku örnekleri toplanılan tüplerin içerisinde -80°C'de saklanmıştır.

3.2.DOKUDAN TOTAL RNA İZOLASYONU

Dokudan total RNA izolasyonu için *PureLink™ RNA mini kit* (Invitrogen by ThermoFisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Kitin önerdiği prosedür aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

1. “*Lysis Buffer*” hazırlanır. Her bir örnek için 1 ml “*Lysis Buffer*”’a 10 µl β-merkaptöetanol eklenir ve 1 dakika bekletilip vorteks yapılır.
2. Tümör dokusundan kesit alınıp daha önceden -20°C’de bekletilmiş havanda sıvı azot ile ezilir. Tüm bu aşamalar sırasında dokular buzda bekletilir. Ezilen örnekler 2 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine transfer edilir. Tüplere konulan örnekler 30-60 mg arasında olmalıdır.
3. 2 ml mikrosantrifüj tüplerindeki örneklerin miktarlarına göre hazırlanan “*Lysis buffer*” eklenir. Eklenecek “*Lysis buffer*” miktarı aşağıdaki gibi ayarlanmaktadır;
 - <20 mg ➔ 350 µl
 - 20-40 mg ➔ 600 µl
 - 40-60 mg ➔ 800 µl
 - >60 mg ➔ 1000 µl

4. Ardından 2600g'de 5 dakika santrifüj yapılır ve süpernatant başka bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpe aktarılır.
5. Aynı tüpe süpernatant hacmi kadar %70'lik etanol eklenir ve vorteks yapılır.
6. Kitin içinde bulunan "*spin cartridge*" tüpüne 700 µl örnek eklenir ve 12.000 g'de 15 saniye santrifüj yapılır. Santrifüjün ardından "*collection*" tüpte kalan sıvı atılır.
7. 5. ve 6. basamakta belirtilen teknikler 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpte örnek bitene kadar tekrarlanır.
8. "*Spin cartridge*" tüpe 700 µl "*Wash Buffer 1*" eklenir ve 12.000 g'de 15 saniye santrifüj yapılır. Ardından "*Spin cartridge*" tüpün içerisindeki filtre yeni bir "*collection*" tüpe aktarılır.
9. Filtrenin aktarıldığı yeni "*collection*" tüpe 500 µl "*Wash Buffer 2*" eklenir ve 12.000 g'de 15 saniye santrifüj yapılır. "*Collection*" tüpte kalan sıvı atılır.
10. Yeniden 500 µl "*Wash Buffer 2*" eklenir. 12.000 g'de 15 saniye santrifüj yapılır ve "*collection*" tüpte kalan sıvı atılır.
11. Ardından 12.000 g'de 1 dakika santrifüj yapılır. Filtrenin bulunduğu "*collection*" tüp atılır ve filtre "*spin cartridge recovery*" tüpe yerleştirilir.
12. 30 µl RNazsız su filtrenin tam ortasına gelecek şekilde eklenir ve oda sıcaklığında 5 dakika beklenir.
13. 12.000 g'de 2 dakika santrifüj yapıldıktan sonra filtre atılır.
14. Nanodrop cihazında elde edilen örneklerin kalite kontrolü yapılır ardından örnek kullanılana kadar -80°C'de saklanır.

3.3.CDNA SENTEZİ

Dokudan izolasyonu yapılan total RNA'ların "*TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit*" (ThermoFisher Scientific, ABD) ile firmanın önerdiği protokole uyularak cDNA sentezi yapılmıştır. Kit içerisinde bulunan nükleazsız su, 10X RT tamponu, dNTP karışımı, RNaz inhibitör ve ters transkriptaz enzim, 5X primer ve izole edilen total RNA buz içerisinde çözülür. Kit protokolüne uygun olarak çalışma solüsyonu ("*master mix*") hazırlanır. Reaksiyon steril PCR tüplerinde gerçekleşir. cDNA sentezi için primer olarak "*TaqMan MicroRNA Assay (5X)*" (ThermoFisher Scientific, ABD) kullanılır. cDNA sentezi için hazırlanan çalışma solüsyonu ("*master mix*") bileşenleri Tablo 3.1, sentez reaksiyonları bileşenleri Tablo 3.2 ve sentez reaksiyonlarının koşulları Tablo 3.3'deki gibidir;

Tablo 3.1: cDNA sentez reaksiyonu için çalışma çözeltisi bileşenleri.

BİLEŞEN	HACİM
Nükleazsız su “ <i>Ultra pure</i> ”	4,16µl
10X RT tamponu	1,5µl
dNTP karışımı	0,15µl
RNaz inhibitör	0,19µl
Ters transkriptaz enzimi	1µl
TOTAL	7 µl

Tablo 3.2: cDNA sentez reaksiyonları bileşenleri.

BİLEŞEN	HACİM
Çalışma Çözeltisi	7µl
Total RNA (10ng/µl)	5µl
Primer (5X)	3µl
TOTAL	15µl

Tablo 3.3: cDNA sentez reaksiyonu koşulları.

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

3.4.ADAY MİRNA’LARIN GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunu (qRT-PCR) gerçekleştirmek için “*TaqMan MicroRNA Assay (20X)*” ve sentezlenen cDNA’lar kullanılmıştır. Validasyonunun yapılması için seçilen 3 farklı aday miRNA (hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p, hsa-mir-6737-3p) ve kontrol olarak kullanılan U6 snRNA ile bu miRNA’ların “*TaqMan MicroRNA Assay*”

(ThermoFisher Scientific, ABD) spesifik 20X primer ve problemleri kullanılmıştır. Uygun bağlanma koşulları belirlendikten sonra miRNA'ların anlatım analizleri yapılmıştır. Reaksiyonda kullanılacak olan malzemeler buzda eritilir ve karışımlar PCR tüplerinde hazırlanır. Ayrıca reaksiyonlara “*No Template Control*” (NTC) olarak adlandırılan negatif kontrol grubu ile kontrol edilir. NTC grubuna ait reaksiyon hazırlanırken genetik materyal yerine aynı miktarda nükleazsız su kullanılmıştır. qRT-PCR Stratagene Mx3000P cihazı ile gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR bileşenleri ve koşulları sırasıyla Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3.4: qRT-PCR bileşenleri.

BİLEŞEN	HACİM
Universal PCR master mix	10 µl
Nükleazsız su “ <i>Ultra Pure</i> ”	7,67 µl
Primer (20X)	1 µl
cDNA	1,33 µl
TOTAL	20 µl

Tablo 3.5: qRT-PCR koşulları.

ZAMAN	SICAKLIK
2 dakika	50°C
10 dakika	95°C
15 dakika	95°C
1 dakika	60°C
	} 40 döngü

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tez kapsamında yapılan qRT-PCR metodu sonucu elde edilen C_t verileri $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile normalize edilip anlatım katsayıları belirlenmiştir. Normalize edilmiş veriler istatistiksel olarak parametrik olmayan “*Wilcoxon test*” ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda p değerleri 0.05’ten düşük olan veriler anlamlı kabul edilmiştir. Normalize edilmiş $\Delta\Delta C_t$ değerleri ile standart sapma değerleri ve CI (güven aralığı) hesaplanmıştır. Standart sapma değerleri ile elde edilen verilerin doğruluğu ve kesinliği tespit edilmiş olur. Güven aralığı örnek sayısı ve standart sapma değerine bağlı olup aralığın dar olması beklenmektedir.

Ayrıca ROC “*Receiver Operating Characteristics*” (Onanma Olasılığı) eğrisi analizi de yapılmıştır. Bu analiz, hasta ve kontrol olarak kullanılan örneklerin ayırt edilmesi ve verilerin güvenilirliği için yapılan istatistiksel bir metottur. AUC “*Area Under the Curve*” değeri ROC eğrisinin altında kalan alanı göstermektedir. Bu değer duyarlılık ve özgüllüğü belirlemek için kullanılmaktadır. AUC değeri 0.50 ve 1 değerleri arasında olmalıdır. Değer 1 sayısına ne kadar yakın olursa elde edilen verilerin doğruluğu o kadar yüksek olmaktadır.

Hedef miRNA’lar ve onların OK’de hedeflediği genlerin tespiti için çeşitli yazılımlar kullanılmıştır. “*Pathway studio*”, “*DIANA TOOLS*” ve “*TargetScan*” veri tabanları ile seçilen miRNA’ların OK’de hedeflediği genler tespit edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1.KULLANILAN ÖRNEKLERİN ÖZELLİKLERİ

Araştırma için kullanılmak üzere doku örneklerinin toplanması İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Örnek grubunu epitelyal over kanseri (EOK) ve over kisti hastaları oluşturmaktadır. Çalışılan örnek gruplarının özellikleri Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.1: Epitelyal over kanseri hastalarının özellikleri.

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

Tablo 4.2: Over kist hastalarının özellikleri.

YAŞ	ALKOL	SİGARA	KİST TÜRÜ	AİLE GEÇMİŞİ	CA-125(U/ml)
19	HAYIR	HAYIR	Dermoid Kist	YOK	353
17	HAYIR	HAYIR	Selim Epitelyal	YOK	72
32	HAYIR	HAYIR	Selim Epitelyal	YOK	58
28	HAYIR	HAYIR	Selim Epitelyal	YOK	82
34	HAYIR	HAYIR	Selim Epitelyal	YOK	36
46	HAYIR	HAYIR	Endometrioma	YOK	21
59	HAYIR	HAYIR	Endometrioma	YOK	28
29	HAYIR	HAYIR	Dermoid Kist	YOK	42
70	HAYIR	HAYIR	Seröz Kistadenofibrom	YOK	21
62	HAYIR	HAYIR	Müsinöz Kistadenom	YOK	17

4.2.ÖRNEKLERİN KALİTE KONTROLÜ

EOK ve kist doku örneklerinden izole edilen total RNA'ların kalite kontrolünü ve konsantrasyonunu belirlemek için "NanoDrop IMPLEN P-Class" spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Ölçümde "PureLink™ RNA mini kit" ile izolasyon yapılırken kullanılan RNazsız su kör örnek ("blank") olarak kullanılmıştır. Nanodrop ölçümü sırasında izole edilen RNA'lardan 1 μ l kullanılmıştır. 10 EOK ve 10 over kisti doku örneklerinin "NanoDrop" ölçümünden elde edilen konsantrasyon (ng/μ l) ve 260/280nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerinin oranı ($A_{260/280}$) Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3: Epitelyal over kanseri ve kist doku örneklerinin kalitatif ve kantitatif değerlendirme sonuçları.

HASTA SAYISI	EOK DOKU ÖRNEKLERİ		KİST DOKU ÖRNEKLERİ	
	Konsantrasyon (ng/µl)	260/280	Konsantrasyon (ng/µl)	260/280
1	81,2	1,735	94,8	1,911
2	1028	1,947	154	1,944
3	244	1,740	192	1,714
4	566	1,899	198	1,618
5	518	2,003	417	2,010
6	772	1,911	108	1,805
7	49,2	1,952	12,4	1,476
8	581	2,060	68,8	2,048
9	599	2,059	55,2	1,917
10	19,2	1,600	37,2	1,958

4.3.ANLATIM ANALİZİ SONUÇLARI

Grubumuz tarafından “*Over Kanserinde miRNA Analizi ile Moleküler Tanı ve İzleme*” başlıklı İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) destekli öncelikli alan projesi (Proje No: 51472) ve aynı başlıklı Yüksek Lisans tez projesi (Proje No: 47803) daha önce tamamlanmıştır. Bu projeler kapsamında, over kisti ve EOK hastalarının doku örneklerinden izole edilen miRNA profilleri mikrodizilim yöntemiyle karşılaştırılmıştır ve 3 tane anlatımı anlamlı şekilde değişmiş miRNA tespit edilmiştir. Bu 3 miRNA'nın mikrodizilim sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir (Gümüşoğlu, 2016, Yüksek Lisans Tezi).

Tablo 4.4: Aday 3 miRNA'nın mikrodizilim sonuçları (Gümüšođlu, 2016, Yüksek Lisans Tezi).

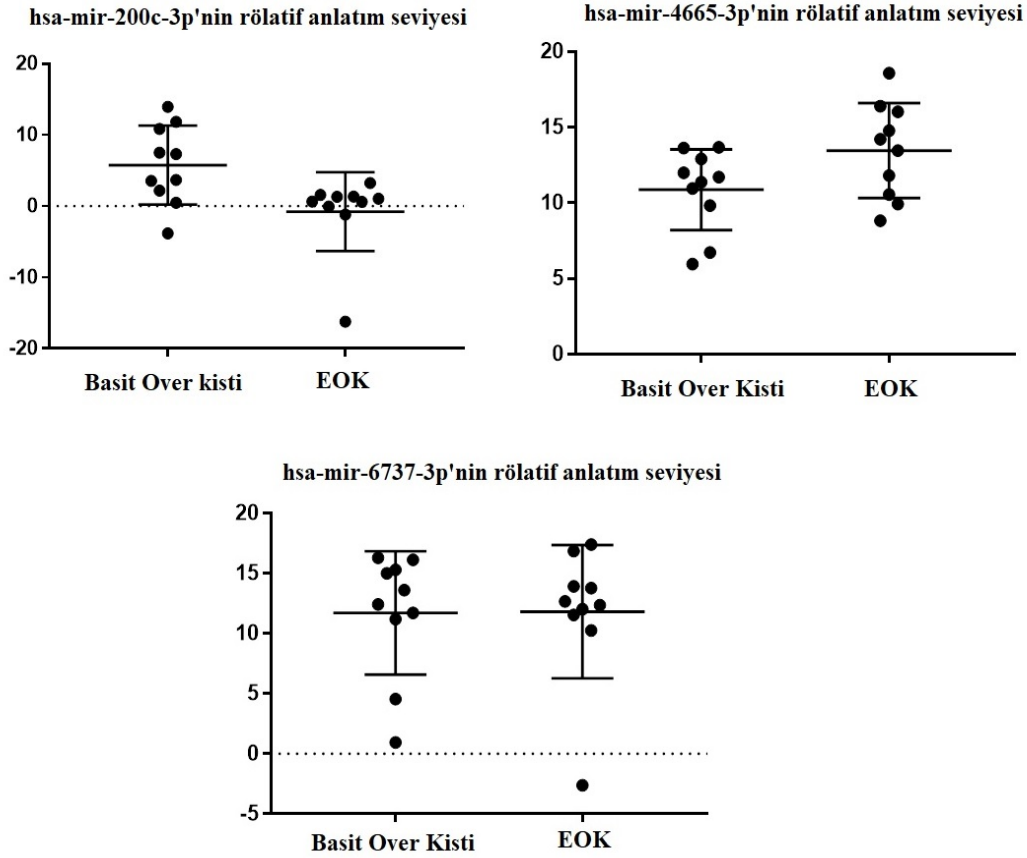
MiRNA	p-değeri	Anlatım	Kat değişimi(log)
Hsa-mir-200c-3p	0.0000965	artmış	7.873392
Hsa-mir-4665-3p	0.0000011	artmış	4.859524
Hsa-mir-6737-3p	0.0000602	artmış	3.851476

Aday 3 miRNA'nın (hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p) over kisti ve EOK hastalarından alınan doku örneklerindeki anlatım analizleri için her aday miRNA'ya özel "TaqMan prob" kullanılmıştır. Analizler sırasındaki normalizasyon için U6 snRNA kullanılmıştır. "Stratagene" cihazında örneklerin C_t değerleri ve logaritmik kat değişiklikleri otomatik olarak hesaplanmıştır. $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile anlatım katsayıları belirlenmiştir. $\Delta\Delta C_t$ değerleri ile istatistiksel metod olan "Wilcoxon test" kullanılarak p değerleri hesaplanmıştır. Tablo 4.5'te aday 3 miRNA'ya ait qPCR analizleri verilmiştir. Aday 3 miRNA'nın EOK hastalarındaki anlatım seviyeleri over kisti hastalarıyla karşılaştırıldığında artmış olarak bulunmuştur (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Anlatımı anlamlı şekilde değişen 3 aday miRNA'nın qPCR sonuçlarının analizi.

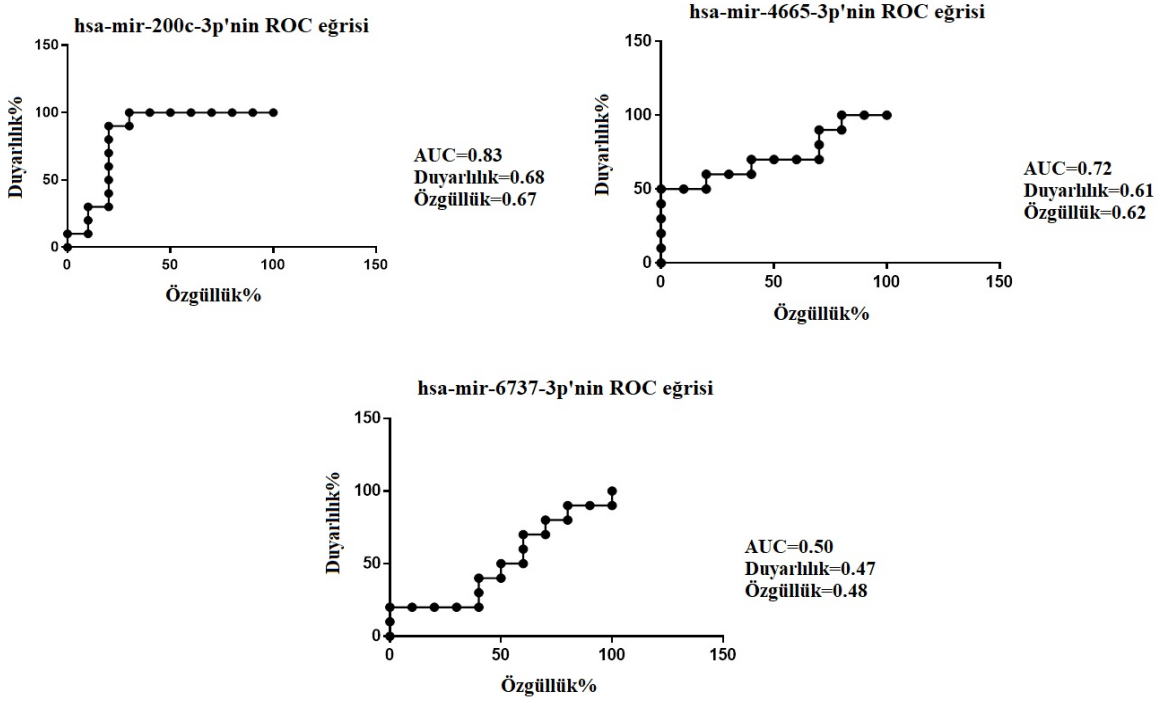
MİRNA	ANLATIM	KAT DEĐİŐİMİ (log)	P DEĞERİ	STANDART SAPMA	%95 CI
Hsa-mir-200c-3p	artmış	2.87	0.0273	0.1056	0.623-1.037
Hsa-mir-4665-3p	artmış	1.96	0.13	0.1191	0.4866-0.9534
Hsa-mir-6737-3p	artmış	0.17	0.8457	0.1348	0.2359- 0.7641

qRT-PCR'dan elde edilen C_t değerleri "Wilcoxon test" ile değerlendirildiğinde hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p'nin arasından sadece hsa-mir-200c-3p anlatımının anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. şekil 4.1'de rölatif anlatım seviyelerinin karşılaştırıldığı grafiklerde de görüldüğü üzere hsa-mir-200c-3p'nin EOK dokularındaki anlatım seviyesi artışı hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p'ye göre daha anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.1: Basit over kisti ve epitelyal over kanseri hasta grubu örneklerindeki aday 3 miRNA'nın (hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p) rölatif miRNA anlatım seviyeleri ("Wilcoxon test").

ROC eğrisi analizi verilerin doğruluğunu kontrol etmek için yapılmıştır. AUC değeri; ROC eğrisinin altında kalan alan aday miRNA'ların EOK hasta doku örneklerinden over kisti doku örneklerini ayırmadaki başarıyı göstermektedir. AUC değerinin anlamlı olması için 0.50 ile 1 arasında olması gerekmektedir. Bu değer 1'e ne kadar yakın olursa tanı değeri yükselmektedir. Çalışmamızda hsa-mir-200c-3p (AUC=0.83, duyarlılık=0.68, özgüllük=0.67), hsa-mir-4665-3p (AUC=0.72, duyarlılık=0.61, özgüllük=0.62) ve hsa-mir-6737-3p'nin (AUC= 0.50, duyarlılık=0.47, özgüllük=0.48) ROC analizi yapılmış olup hsa-mir-200c-3p ve hsa-mir-4665-3p'nin değerleri anlamlı aralıklarda tespit edilmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2: Aday miRNA'ların (hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p) ROC analiz eğrileri.

4.4. VERİ TABANLI YÖNTEMLER İLE MİRNA'LARIN HEDEF GEN TESPİTİ

Çalışmada aday 3 miRNA'nın genlerini tespit etmede veri tabanlarından yararlanılmıştır. Aday 3 miRNA'nın miRBase erişim ve olgun dizisi Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6: Aday miRNA'ların miRBase erişim ve olgun dizisi³.

MİRNA	MiRBase Erişimi	Olgun Dizisi
Hsa-mir-200c-3p	MIMAT0000617	UAAUACUGCCGGGUAUAUGAUGGA
Hsa-mir-4665-3p	MIMAT0019740	CUCGGCCGCGGCGCGUAGCCCCCGCC
Hsa-mir-6737-3p	MIMAT0027376	UCUGUGCUUCACCCCUACCCAG

³ <http://www.mirbase.org/> [Ziyaret tarihi: 05.08.2018]

Aday genlerin over kanserinde hedeflediği genler “*TargetScan*”, “*DIANA TOOLS*” ve “*Pathway Studio*” veri tabanları karşılaştırılarak bulunmuştur (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Aday 3 miRNA'nın “*Pathway Studio*”, “*TargetScan*” ve “*DIANA TOOLS*” kullanılarak belirlenen ve over kanserinde etkili olan hedef genleri.

MiRNA	Aday MiRNA'ların Over Kanserindeki Hedef Genleri
Hsa-mir-200c-3p	<p><i>ZEB1</i> (“<i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>”)</p> <p><i>ZEB2</i> (“<i>zinc finger E-box binding homeobox 2</i>”)</p> <p><i>TUBB3</i> (“<i>tubulin beta 3 class III</i>”)</p> <p><i>TP53 (p53)</i> (“<i>tumor protein p53</i>”)</p> <p><i>CDH1</i> (“<i>cadherin 1</i>”)</p> <p><i>VIM</i> (“<i>vimentin</i>”)</p> <p><i>VEGFA</i> (“<i>vascular endothelial growth factor A</i>”)</p>
Hsa-mir-4665-3p	<p><i>ACHE</i> (“<i>acetylcholinesterase</i>”)</p> <p><i>FOXL2</i> (“<i>forkhead box L2</i>”)</p> <p><i>TP73</i> (“<i>tumor protein P73</i>”)</p> <p><i>WLS</i> (“<i>wntless Wnt ligand secretion mediator</i>”)</p>
Hsa-mir-6737-3p	<p><i>CSE1L</i> (“<i>chromosome segregation 1 like</i>”)</p> <p><i>GTF2A1</i> (“<i>general transcription factor IIA subunit 1</i>”)</p>

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Jinekolojik kanser türleri arasından over kanseri (OK) en sık görülen kanser türüdür. OK teşhislerinin %90'nını epitelyal over kanseri (EOK) oluşturmaktadır. Klinik olarak OK pelviste bir kitle halinde bulunmaktadır. Sessiz katil olarak adlandırılrsa da kanserin overler ile sınırlı olduğu (evre I) aşamada dahi hastaların %80'inden fazlası OK semptomlarına sahip olduğu bildirilmektedir. Ancak bu semptomlar gastrointestinal, genitoüriner ve jinekolojik durumlarla ortak olduğu için erken tanıda yeterli olmamaktadır. Etkili bir tarama stratejisi geliştirme çalışmalarına rağmen hastaların ancak %20'sine erken evrelerde teşhis koyulabilmektedir. Erken tanıda 5 yıllık sağkalım oranı %90'dır. Erken tanı testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü yeterli olmaması sebebiyle özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek non-invaziv bir biyobelirteç tanımlanması önem taşımaktadır (Matulonis ve diğ., 2016).

MikroRNA (miRNA)'lar, transkripsiyon sonrası gen anlatımını düzenleyerek çeşitli fizyolojik ve patolojik fonksiyonları kontrol eden evrimsel olarak korunmuş kodlanmamış RNA moleküllerinin 18-24 nükleotid uzunluğunda bir sınıfıdır. MiRNA'lar ilk olarak *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiş ve araştırmalarla çoğu ökaryot genomunda da olduğu gösterilmiştir. OK hastalarında sağkalım oranını arttırmak, kemoterapötik ilaçlara verilen yanıtın izlenmesine yardımcı olmak, OK taraması ve erken tanı için miRNA'lar aday biyobelirteçlerdir. MiRNA'lar kanser progresyonu, hücre invazyonu ve metastaz, hücre sağkalımı ve terapötik ilaçlara yanıt gibi insan malignitelerini yöneten çoğu hücreyel yolakda önemli rol oynarlar. Ayrıca, miRNA biyobelirteçleri EOK 'nin tanı ve prognozu için incelenen diğer biyobelirteçlerden daha hassas ve özgündür (Pal ve diğ., 2015).

Bu tez kapsamında, mikrodizilim yöntemiyle EOK tümör dokusu ve over kisti dokusu karşılaştırılarak EOK tümör dokusunda anlatımı artmış olarak bulunan hedef 3 miRNA'nın (hsa-mir-200c-3p, hsa-mir-4665-3p ve hsa-mir-6737-3p) qPCR yöntemiyle validasyon çalışması yapılmıştır. Sonuçlara göre EOK tümör doku örnekleri kontrol olarak kullanılan over kisti doku örnekleriyle karşılaştırıldığında hedef 3 miRNA'nın anlatımlarının arttığı bulunmuştur. "Wilcoxon" test ile qRT-PCR verilerinin biyoinformatik analizi yapılmıştır (Şekil 4.1). "ROC" analizi ile elde edilen değerlerin doğruluğu kontrol edilmiştir (Şekil 4.2) ve elde edilen eğrinin altında kalan alan "AUC" değeridir. AUC değerinin 0.50 ile 1 arasında olması gerekmektedir, bu değer 1'e yaklaştıkça elde edilen verilerin tahmin gücü o kadar

yüksektir. Validasyonu yapılan 3 miRNA'nın over kanserinde hedeflediği genlerin biyoinformatik analizinde “Pathway Studio®”, “TargetScan” ve “DIANA TOOLS” veri tabanları kullanılmıştır

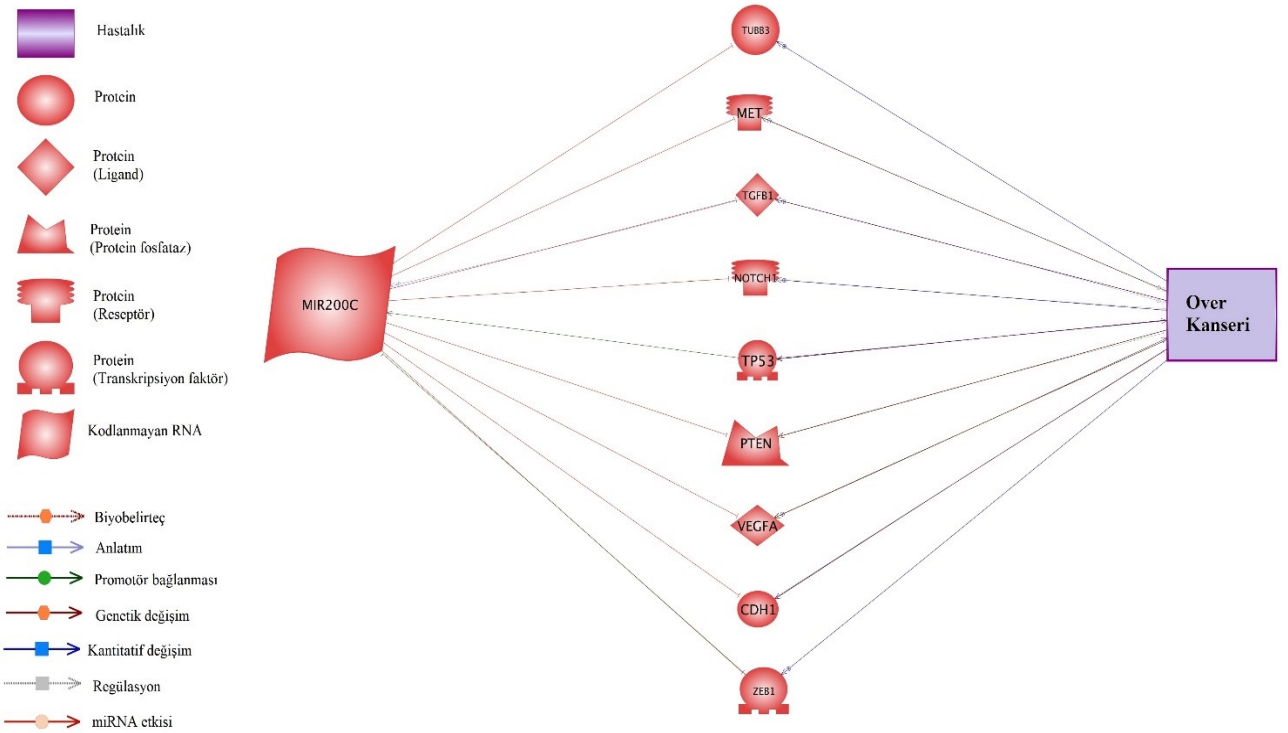
Çalışmanın sonucunda EOK tümörlerinde basit over dokusuyla karşılaştırıldığında mir-200c-3p'nin anlatımında anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur ($p=0.0273$, $AUC=0.83$). Hsa-mir-200c-3p mir-200 ailesine üyedir. Mir-200 ailesi miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 ve miR-429 olmak üzere 5 üyeden oluşmaktadır. Bu 5 miRNA iki küme oluşturur. Mir-200a, mir-200b ve mir-429 1. kromozom (1p36.33) üzerinde bulunur. Mir-200c ve mir-141 12. kromozom (12p113.31) üzerinde bulunur. Mir-200 ailesi OK tanısı ve prognozu için en çok çalışılan miRNA'lar arasındadır (Muralidhar ve Barbolina, 2015). Iorio ve diğ., OK'de farklılaşmış miRNA'ları belirlemek için normal over dokusu ve OK dokusunun anlatım profillerini karşılaştırma temelli bir çalışma yürütmüştür. Çalışma sonucunda mir141, mir-200a, mir-200c ve mir-200b'nin anlatımlarının arttığını, özellikle mir-200c'nin anlatımının seröz, endometrioid ve berrak hücreli over kanseri tiplerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir (Iorio ve diğ., 2007).

6. Chromosome 12 - NC_000012.12



Şekil 5.1: Hsa-mir-200'ün insan genomundaki lokalizasyonu⁴

⁴ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406985>[Ziyaret tarihi:08.10.18]



Şekil 5.2: “Pathway Studio®” ile hsa-mir-200c-3p’nin over kanserinde hedeflediği genler

Mir-200 ailesi, kanser hücrelerinin epitelyal özelliklerini ve büyümelerini kontrol etmede önemli bir role sahiptir. Ayrıca epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) düzenlemede de görev alırlar. EMT, normal olarak polar epitelyal bir hücrenin mezenkimal benzeri bir hücreye dönüştüğü bir süreçtir. EMT geçiren bir hücre, mezenkimal hücrenin özelliklerini alıp daha hareketli, istilacı olur ve apoptoza karşı direnci artar. Hsa-mir-200c-3p ‘nin hedeflerinden biri olan *ZEB* “Zinc Finger E-Box Binding Homeobox”, hücrel transformasyonu düzenlemede görev alır. *ZEB* genleri kanser gelişimi ve ilerlemesinde epitelyal-mezenkimal geçişi adhezyon molekülü olan E-kaderini baskılayarak düzenler (Panda ve diğ. 2012). *CDH1* “cadherin 1” geni tarafından üretilen E-kaderin, hücre içindeki kimyasal sinyalleri iletmede, hücre olgunlaşmasını ve hareketini kontrol etmede ve belirli genlerin aktivitesini düzenlemede rol oynar. *ZEB1* “zinc finger E-box binding homeobox 1” ve *ZEB2* “zinc finger E-box binding homeobox 2”, E-kaderin promotörü içindeki E-kutularına doğrudan bağlanarak E-kaderin baskılayıcıları olarak görev alırlar. Böylece *ZEB1* ve *ZEB2* E-kaderin'in anlatımını baskılayarak EMT'nin kontrolüne doğrudan katılır, hücre göçünü ve invazyonunu destekler. MiR-200 ailesinin, *ZEB1* ve *ZEB2*'yi 3'UTR'leri ile doğrudan hedefleyerek ürünlerinde düşüşe neden

oluyor ve dolayısıyla anlatımları azalan bu genlerin etkisi sonucunda E-kaderin yeterince baskılanmadığından EMT de bir artış söz konusu olmayabilir (Humphries ve Yang, 2015).

Park ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada NCI60 over kanseri hücrelerinin E-kaderin pozitif ve vimentin-negatif hücrelerinde mir-200 ailesini genel bir biyobelirteç olarak tanımlamışlardır. ZEB1 ve ZEB2 mRNA'larını hedefleyen miR200'ün E-kaderin/vimentin anlatımını sıkı bir şekilde kontrol ettiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak mir-200'ün E-kaderin pozitif hücreler için biyobelirteç olarak kullanılabilmesi ve EMT'nin güçlü bir düzenleyici olduğu tespitinde bulunmuşlardır (Park ve diğ., 2008).

Hsa-mir-200c-3p, ZEB1 ve ZEB2 ile ters olarak etkileşir. Ayrıca, yüksek dereceli seröz over kanserinde mir-200'ün ifadesinin artış gösterdiği ZEB1 ve ZEB2 ifadesinde ters olarak azaldığı bulunmuştur. ZEB1 ve ZEB2'nin anlatımının azalması E-kaderin'in baskılanmasını önler böylece hücreler epitelyal özelliklerini korurlar.

VIM "vimentin" geni tarafından üretilen vimentin, çeşitli epitelyal olmayan hücrelerde bulunur. Vimentin, metastaz sırasında EMT için belirteç olarak kullanılmaktadır. Vimentin düzeyinin azalması, hsa-mir-200c-3p anlatımının artmasına neden olmaktadır (Park ve diğ., 2008). Tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre hsa-mir-200c-3p'nin EOK tümör örneklerinde anlatımındaki anlamlı artıştan dolayı, hsa-mir-200c-3p'nin VIM ile arasındaki negatif regülasyon ile VIM'in anlatımında azalış görülebilir. Vimentinin anlatımının az olması hücrenin epitelyal özelliğini koruduğunu ve EMT geçirmedeğini göstermektedir.

Tp53 (p53) "tumor protein p53", kanserde büyük önem taşıyan ve en sık mutasyona uğramış protein olan bir tümör baskılayıcı gendir. Tüm kanserler arasında yüksek dereceli seröz over kanserin en yüksek p53 mutasyonuna sahiptir ve iyileştirici tedaviye sahip değildir (Soragni ve diğ., 2016). Memeli epitel hücrelerinde p53'ün kaybı miR-200c ifadesinin azalmasına yol açar ve EMT aktive olur. p53 mir-200c'nin promotör bölgesine bağlanarak mir-200c'nin anlatımını artırır (Chang ve diğ., 2011). TP53 fonksiyonu over kanserinde en sık görülen genetik anormalliklerden biridir ve hem sporadik hem de ailesel vakaların %60-80'inde görülür (Croce ve Di Leva, 2013).

VEGFA "vascular endothelial growth factor A" hücre büyümesi, farklılaşması, inflamasyon, anjiyogenez ve hücrel transformasyonda önemli bir role sahiptir. VEGFA tümör anjiyogenezinin önemli bir aracıdır ve seröz over kanserinde anlatımı artmaktadır. VEGFA'nin

anlatımının artmış olması kötü prognoz ile ilişkilidir (Elgaaen ve diğ., 2012). Elgaaen ve diğ.'nin biyoinformatik temelli yaptıkları çalışmaya göre, “*progression free survival*” ilerlemesiz sağkallımla ilişkili olan ve yüksek dereceli seröz over kanserinde anlatımı artmış VEGFA hsa-mir-200c-3p'nin bir hedefidir. Aralarındaki etkileşim için, anlatımının fazla olmasına karşın adatif mekanizma *VEGFA*'yı azaltmak amacıyla hsa-mir-200c-3p'nin anlatımının artmasına izin vererek karsinogenezi engellemiş olur (Vilming Elgaaen ve diğ., 2014). Anlatımı artmış hsa-mir-200c VEGFA'nın 3'UTR bölgesiyle direkt etkileşime girerek VEGFA'nın altımını baskılar (Panda ve diğ., 2012). Hsa-mir-200c-3p'nin anlatımının artması ile *VEGFA*'nın anlatımının azalması öngörülür bu sayede anjiyogenez oluşumu engellenmiş olur.

TUBB3 “*tubulin beta 3 class III*” miR-200c'nin agresif ve ilaca dirençli kanserler ile bağlantılı olduğu gösterilmiş olan sınıf III b tubulin'i kodlamaktadır (Croce ve Di Leva, 2013). Bu gen OK'de ilaç direnci ve kötü prognoz ile ilişkilidir. *TUBB3* gen anlatımının posttranskripsiyonel inhibisyonu Hey OK ve HeC50 kanser hücre hatlarında miR-200c'nin *TUBB3*'ü inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Prislei ve diğ., 2013). *TUBB3*'ün, birçok kanser türünde mikrotübül hedefleyici ajanlara karşı yaygın bir direnç mekanizması olduğu bilinmektedir. Mir-200c, OK'de aşırı anlatımı yapılan *TUBB3*'ün 3'UTR bölgelerini doğrudan hedefler. *TUBB3* anlatımındaki değişiklik sayesinde OK hücrelerinin mikrotübül hedefleyici ajanlara direnç kazanmış olur. MiR-200c'nin *TUBB3*'ün 3'UTR'sine bağlandığı ve anlatımını azalttığı, böylece hücrelerin paklitakselin yanı sıra vinkristin ve epotilon gibi diğer mikrotübül hedefleyici ajanlara karşı duyarlılık kazandığı gösterilmiştir (Muralidhar ve Barbolina, 2015). EOK'de hsa-mir-200c-3p'nin anlatımının artmasından dolayı *TUBB3*'ü hedefleyip hücrelerin direnç mekanizmalarını etkilediği söylenebilir.

Literatürdeki araştırmaların sonuçlarının da desteklediği üzere, hsa-mir-200c-3p'nin OK için özellikle yüksek dereceli seröz over kanseri için spesifik bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir (Elgaaen ve diğ., 2014).

Tablo 5.1: Hsa-mir-200c-3p'nin katıldığı biyolojik yollar

Hsa-mir-200c-3p	Katıldığı Biyolojik Yollar
	Epitelyal hücre farklılaşması
	Mezenkimal-epitelyal geçiş
	Tümör büyümesi
	Kanserli hücre büyümesi
	Epitelyal mezenkimal geçiş
	Hücre sağkalım
	Hücre ölümü
	Apoptozis

Mikrodizilim yöntemiyle ve qRT-PCR tekniği sonucunda elde edilen verilere göre hsa-mir-4665-3p'nin ($p=0.13$, $AUC=0.72$) anlatımı EOK tümör örneklerinde artmıştır. Ancak biyoistatistiksel çalışmalar sonucunda anlamlı bir artış olmadığı kanıtlanmıştır. Hsa-mir-4665-3p ile ilişkili literatürde çeşitli hastalıklarla ilgili çalışmalar bulunmuştur. Zhang ve diğ. kolon kanseri hastaları ve sağlıklı bireylerin serum örnekleri arasında bir çalışma yürütmüş ve mikrodizilim sonuçlarında hsa-mir-4665-3p'nin anlatım düzeyinin kolon kanserleri hastalarında azaldığını bulmuşlardır (Zhang ve diğ., 2017). Xie ve diğ.'nin yürüttüğü çalışmada, pankreas kanseri hastaları ve sağlıklı bireylerin tükürük örnekleri toplanmış, mikrodizilim ve qPCR metodları ile anlatım seviyelerine bakılmıştır. Hsa-mir-4665-3p'nin anlatımında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır (Xie ve diğ., 2015). Liao ve diğ. tarafından yapılan çalışmada ise yemek borusu kanseri hastalarından ve sağlık bireylerden plazma örnekleri toplanıp mikrodizilim tekniğiyle miRNA profillerine bakılmıştır. Hsa-mir-4665-3p'nin yemek borusu kanseri hastalarında anlatımının azaldığı bulunmuştur (Liao ve diğ., 2016). Hsa-mir-4665-3p yapılan istatistiksel çalışmalara göre *ACHE* "acetylcholinesterase", *FOXL2* "forkhead box L2", *TP73* "tumor protein P73", *WLS* "wntless Wnt ligand secretion mediator" genleri OK ile belirgin ilişki içerisindedir.

Çalışmamızda hsa-mir-6737-3p'nin ($p=0.8457$, $AUC=0.50$) anlatımının EOK dokularında arttığı bulunmuştur ancak biyoinformatik analizler sonrası anlamlı bir artış olmadığı gözlemlenmiştir. Tez kapsamında yapılan biyoinformatik çalışmalarda OK'nin gelişiminde katkı sağlayan ve hsa-mir-6737-3p'nin ortak olarak hedeflediği genler *CSE1L* “*chromosome segregation 1 like*” ve *GTF2A1* “*general transcription factor IIA subunit 1*” olarak bulunmuştur. Literatürde hsa-mir-6737-3p'nin çeşitli hastalıklarda anlatım profillemesi ile ilgili birkaç çalışma bulunmuştur. Shang ve Li tarafından yürütülen bir çalışmada vitiligo hastalarından ve vitiligo ya da herhangi bir otoimmün hastalığı olmayan kişilerden periferik kan örnekleri toplanıp mikrodizilim ve qRT-PCR teknikleri kullanılarak miRNA profillerinin farklılaşmalarına bakılmıştır. Sonuçta vitiligo hastalarında aday miRNA'lar arasında bulunan hsa-mir-6737-3p'nin anlatımının azaldığı bulunmuştur (Shang ve Li, 2017). Zou ve diğ. tarafından nonsendromik yarık dudak hastaları ve kontrol gruplarından plazma örnekleri toplanıp mikrodizilim yöntemiyle miRNA profillemesi çalışması yapılmıştır. Nonsendromik yarık dudak hastalarında hsa-mir-6737-3p'nin anlatımının azaldığı gözlemlenmiştir (Zou ve diğ., 2016).

Tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre hsa-mir-200c-3p ($p=0.0273$, $AUC=0.83$) OK tümörlerinin tespiti için aday bir biyobelirteç olabileceği öngörülmektedir. Hsa-mir-4665-3p ($p=0.13$, $AUC=0.72$) ve hsa-mir-6737-3p'nin ($p=0.8457$, $AUC=0.50$) qRT-PCR sonuçlarının biyoinformatik analizlerine göre güvenilir bir biyobelirteç olamayacağı düşünülmektedir. Yapılan biyoinformatik ve yolak analizleriyle hedef miRNA'ların over kanserinde hedeflediği genler, etkilediği mekanizmalar aydınlatılmıştır. MiRNA'ların EOK tanısı ve prognozu için hassas ve güvenilir bir biyobelirteç adayı olmalarından dolayı yapılan bu validasyon çalışmasının erken tanıya katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- American Cancer Society, 2018. Tests for Ovarian Cancer [Online]. The American Cancer Society Available: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed> [Accessed 2018].
- Banerjee, S. & Kaye, S. B. 2013. New Strategies In The Treatment Of Ovarian Cancer: Current Clinical Perspectives And Future Potential. *Clin Cancer Res*, 19, 961-8.
- Bast, R. C., Hennessy, B. & Mills, G. B. 2009. The Biology Of Ovarian Cancer: New Opportunities For Translation. *Nature Reviews Cancer*, 9, 415-428.
- Basu, P. & Vale, D. 2017. Screening For Epithelial Ovarian Cancer: An Updated Review. *Indian Journal Of Gynecologic Oncology*, 15.
- Bernardo, B. C., Charchar, F. J., Lin, R. C. & McMullen, J. R. 2012. A MicroRNA Guide For Clinicians And Basic Scientists: Background And Experimental Techniques. *Heart Lung Circ*, 21, 131-42.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. & Croce, C. M. 2002. Frequent Deletions And Down-Regulation Of MicroRNA Genes Mir15 And Mir16 At 13q14 In Chronic Lymphocytic Leukemia. *Pnas*, 99, 15524–15529.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. & Croce, C. M. 2004. Human MicroRNA Genes Are Frequently Located At Fragile Sites And Genomic Regions Involved In Cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2999-3004.
- Chang, C.-J., Chao, C.-H., Xia, W., Yang, J.-Y., Xiong, Y., Li, C.-W., Yu, W.-H., Rehman, S. K., Hsu, J. L., Lee, H.-H., Liu, M., Chen, C.-T., Yu, D. & Hung, M.-C. 2011. P53 Regulates Epithelial–Mesenchymal Transition And Stem Cell Properties Through Modulating Mirnas. *Nature Cell Biology*, 13, 317.
- Chatterjee, A., Rodger, E. J. & Eccles, M. R. 2018. Epigenetic Drivers Of Tumourigenesis And Cancer Metastasis. *Semin Cancer Biol*, 51, 149-159.
- Cho, K. R. & Shih Ie, M. 2009. Ovarian Cancer. *Annu Rev Pathol*, 4, 287-313.
- Coticchia, C. M., Yang, J. & Moses, M. A. 2008. Ovarian Cancer Biomarkers: Current Options And Future Promise. *Nih Public Access*, 795-802.
- Croce, C. M. & Di Leva, G. 2013. The Role Of MicroRNAs In The Tumorigenesis Of Ovarian Cancer. *Frontiers In Oncology*, 3.
- Davidson, B., Trope, C. G. & Reich, R. 2014. The Role Of The Tumor Stroma In Ovarian Cancer. *Front Oncol*, 4, 104.

- Deb, B., Uddin, A. & Chakraborty, S. 2018. Mirnas And Ovarian Cancer: An Overview. *J Cell Physiol*, 233, 3846-3854.
- De Planell-Saguer, M. & Rodicio, M. C. 2013. Detection Methods For Micornas In Clinic Practice. *Clin Biochem*, 46, 869-78.
- Desai, A., Xu, J., Aysola, K., Qin, Y., Okoli, C., Hariprasad, R., Chinemerem, U., Gates, C., Reddy, A., Danner, O., Franklin, G., Ngozi, A., Cantuaria, G., Singh, K., Grizzle, W., Landen, C., Partridge, E. E., Rice, V. M., Redd, E. S. P. & Rao, V. N. 2014. Epithelial Ovarian Cancer: An Overview. *World Journal Of Translational Medicine*, 3.
- Eitan, R., Kushnir, M., Lithwick-Yanai, G., David, M. B., Hoshen, M., Glezerman, M., Hod, M., Sabah, G., Rosenwald, S. & Levavi, H. 2009. Tumor Microna Expression Patterns Associated With Resistance To Platinum Sed Chemotherapy And Survival In Ovarian Cancer Patients. *Gynecol Oncol*, 114, 253-9.
- Elgaaen, B. V., Olstad, O. K., Haug, K. B. F., Brusletto, B., Sandvik, L., Staff, A. C., Gautvik, K. M. & Davidson, B. 2014. Global Mirna Expression Analysis Of Serous And Clear Cell Ovarian Carcinomas Identifies Differentially Expressed Mirnas Including Mir-200c-3p As A Prognostic Marker. *Bmc Cancer*.
- Elgaaen, B. V., Olstad, O. K., Sandvik, L., Odegaard, E., Sauer, T., Staff, A. C. & Gautvik, K. M. 2012. Znf385b And Vegfa Are Strongly Differentially Expressed In Serous Ovarian Carcinomas And Correlate With Survival. *Plos One*, 7, E46317.
- Fischer, D. C., Noack, K., Runnebaum, I. B., Watermann, D. O., Kieback, D. G., Stamm, S. & Stickeler, E. 2004. Expression Of Splicing Factors In Human Ovarian Cancer. *Oncol Rep*, 11, 1085-90.
- Foley, S. B., Rios, J. J., Mgbemena, V. E., Robinson, L. S., Hampel, H. L., Toland, A. E., Durham, L. & Ross, T. S. 2015. Use Of Whole Genome Sequencing For Diagnosis And Discovery In The Cancer Genetics Clinic. *Ebiomedicine*, 2, 74-81.
- Gilks, C. B. 2010. Molecular Abnormalities In Ovarian Cancer Subtypes Other Than High-Grade Serous Carcinoma. *J Oncol*, 2010, 740968.
- Hatfield, S. D., Shcherbata, H. R., Fischer, K. A., Nakahara, K., Carthew, R. W. & Ruohola-Baker, H. 2005. Stem Cell Division Is Regulated By The Microna Pathway. *Nature*, 435, 974.
- Hellstrom, I., Raycraft, J., Hayden-Ledbetter, M., Ledbetter, J. A., Schummer, M., McIntosh, M., Dresche, C., Urban, N. & Hellstrom, K. E. 2003. The He4 (Wfdc2) Protein Is A Biomarker For Ovarian Carcinoma. *Cancer Research* 63.
- Huang, Y.-W., Jansen, R. A., Fabbri, E., Potter, D., Liyanarachchi, S., Chan, M. W. Y., Liu, J. C., Crijns, A. P. G., Brown, R., Nephew, K. P., Derzee, A. G. J. V., Cohn, D. E., Yan, P. S., Huang, T. H.-M. & Lin, H.-J. L. 2009. Identification Of Candidate Epigenetic Biomarkers For Ovarian Cancer Detection. *Nih Public Access*.

- Humphries, B. & Yang, C. 2015. The MicroRNA-200 Family: Small Molecules With Novel Roles In Cancer Development, Progression And Therapy. *Oncotarget*, 6.
- Iorio, M. V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C. G., Alder, H., Calin, G. A., Menard, S. & Croce, C. M. 2007. MicroRNA Signatures In Human Ovarian Cancer. *Cancer Res*, 67, 8699-707.
- Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C. & Ledermann, J. A. 2014. Ovarian Cancer. *The Lancet*, 384, 1376-1388.
- Karnezis, A. N., Cho, K. R., Gilks, C. B., Pearce, C. L. & Huntsman, D. G. 2017. The Disparate Origins Of Ovarian Cancers: Pathogenesis And Prevention Strategies. *Nat Rev Cancer*, 17, 65-74.
- Karst, A. M. & Drapkin, R. 2010. Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model In Evolution. *J Oncol*, 2010, 932371.
- Kim, J., Yao, F., Xiao, Z., Sun, Y. & Ma, L. 2018. MicroRNAs And Metastasis: Small Rnas Play Big Roles. *Cancer Metastasis Rev*, 37, 5-15.
- Kinose, Y., Sawada, K., Nakamura, K. & Kimura, T. 2014. The Role Of MicroRNAs In Ovarian Cancer. *Biomed Research International*, 2014, 1-11.
- Koshiyama, M., Matsumura, N. & Konishi, I. 2017. Subtypes Of Ovarian Cancer And Ovarian Cancer Screening. *Diagnostics (Basel)*, 7.
- Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. 2010. The Widespread Regulation Of MicroRNA Biogenesis, Function And Decay. *Nat Rev Genet*, 11, 597-610.
- Lan, H., Lu, H., Wang, X. & Jin, H. 2015. MicroRNAs As Potential Biomarkers In Cancer: Opportunities And Challenges. *Biomed Research International*, 2015, 1-17.
- Lengyel, E. 2010. Ovarian Cancer Development And Metastasis. *Am J Pathol*, 177, 1053-64.
- Liao, J., Liu, R. A. N., Shi, Y.-J., Yin, L.-H. & Pu, Y.-P. 2016. Exosome-Shuttling MicroRNA-21 Promotes Cell Migration And Invasion-Targeting Pcd4 In Esophageal Cancer. *International Journal Of Oncology*, 48, 2567-2579.
- Lin, S. & Gregory, R. I. 2015. MicroRNA Biogenesis Pathways In Cancer. *Nat Rev Cancer*, 15, 321-33.
- Lorenzato, A., Biolatti, M., Delogu, G., Capobianco, G., Farace, C., Dessole, S., Cossu, A., Tanda, F., Madeddu, R., Olivero, M. & Di Renzo, M. F. 2013. Akt Activation Drives The Nuclear Localization Of Cse11 And A Pro-Oncogenic Transcriptional Activation In Ovarian Cancer Cells. *Exp Cell Res*, 319, 2627-36.

- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R. & Golub, T. R. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435, 834.
- Mahdian-Shakib, A., Dorostkar, R., Tat, M., Hashemzadeh, M. S. & Saidi, N. 2016. Differential Role Of Micrnas In Prognosis, Diagnosis, And Therapy Of Ovarian Cancer. *Biomed Pharmacother*, 84, 592-600.
- Matulonis, U. A., Sood, A. K., Fallowfield, L., Howitt, B. E., Sehouli, J. & Karlan, B. Y. 2016. Ovarian Cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16061.
- Montagnana, M., Benati, M. & Danese, E. 2017. Circulating Biomarkers In Epithelial Ovarian Cancer Diagnosis: From Present To Future Perspective. *Annals Of Translational Medicine*, 5, 276-276.
- Montavon, C., Gloss, B. S., Warton, K., Barton, C. A., Statham, A. L., Scurry, J. P., Tabor, B., Nguyen, T. V., Qu, W., Samimi, G., Hacker, N. F., Sutherland, R. L., Clark, S. J. & O'Brien, P. M. 2012. Prognostic And Diagnostic Significance Of Dna Methylation Patterns In High Grade Serous Ovarian Cancer. *Gynecol Oncol*, 124, 582-8.
- Mosakhani, N., Sarhadi, V., Panula, P., Partinen, M. & Knuutila, S. 2017. Narcolepsy Patients' Blood-Based Mirna Expression Profiling: Mirna Expression Differences With Pandemrix Vaccination. *Acta Neurol Scand*, 136, 462-469.
- Muralidhar, G. & Barbolina, M. 2015. The Mir-200 Family: Versatile Players In Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal Of Molecular Sciences*, 16, 16833-16847.
- Nguyen, L., Cardenas-Goicoechea, S. J., Gordon, P., Curtin, C., Momeni, M., Chuang, L. & Fishman, D. 2013. Biomarkers For Early Detection Of Ovarian Cancer. *Women's Health*, 9, 171-187.
- Pal, M. K., Jaiswar, S. P., Dwivedi, V. N., Tripathi, A. K., Dwivedi, A. & Sankhwar, P. 2015. Microrna: A New And Promising Potential Biomarker For Diagnosis And Prognosis Of Ovarian Cancer. *Cancer Biol Med*, 12, 328-41.
- Palma Flores, C., Garcia-Vazquez, R., Gallardo Rincon, D., Ruiz-Garcia, E., Astudillo De La Vega, H., Marchat, L. A., Salinas Vera, Y. M. & Lopez-Camarillo, C. 2017. Micrnas Driving Invasion And Metastasis In Ovarian Cancer: Opportunities For Translational Medicine (Review). *Int J Oncol*, 50, 1461-1476.
- Panda, H., Pelakh, L., Chuang, T. D., Luo, X., Bukulmez, O. & Chegini, N. 2012. Endometrial Mir-200c Is Altered During Transformation Into Cancerous States And Targets The Expression Of Zeb1, Vegfa, Flt1, Ikkbeta, Klf9, And Fbln5. *Reprod Sci*, 19, 786-96.
- Park, S. M., Gaur, A. B., Lengyel, E. & Peter, M. E. 2008. The Mir-200 Family Determines The Epithelial Phenotype Of Cancer Cells By Targeting The E-Cadherin Repressors Zeb1 And Zeb2. *Genes Dev*, 22, 894-907.

- Peng, Y. & Croce, C. M. 2016. The Role Of Micrnas In Human Cancer. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 1, 15004.
- Peng, F., He, J. A., Loo, J. F. C., Kong, S. K., Li, B. & Gu, D. 2017. Identification Of Serum Micrnas As Diagnostic Biomarkers For Influenza H7n9 Infection. *Virology Reports*, 7, 1-8.
- Politz, J. C. R., Zhang, F. & Pederson, T. 2006. Microna-206 Colocalizes With Ribosome-Rich Regions In Both The Nucleolus And Cytoplasm Of Rat Myogenic Cells. *Pnas*, 103, 18957-18962.
- Prahm, K. P., Novotny, G. W., Høgdall, C. & Høgdall, E. 2016. Current Status On Micrnas As Biomarkers For Ovarian Cancer. *Apmis*, 124, 337-355.
- Prislei, S., Martinelli, E., Mariani, M., Raspaglio, G., Sieber, S., Ferrandina, G., Shahabi, S., Scambia, G. & Ferlini, C. 2013. Mir-200c And Hur In Ovarian Cancer. *Bmc Cancer*, 13, 72.
- Schummer, M., Ng, W. V., Bumgarner, R. E., Nelson, P. S., Schummer, B., Bednarski, D. W., Hassell, L., Baldwin, R. L., Karlan, B. Y. & Hood, L. 1999. Comparative Hybridization Of An Array Of 21 500 Ovarian Cdnas For The Discovery Of Genes Overexpressed In Ovarian Carcinomas. *Gene* 238, 375-385.
- Seeber L.M.S And Van Diest P.J., 2012, *Epigenetics In Ovarian Cancer*, Cancer Epigenetics, Dumitrescu R.G And Verma M. (Ed), Humana Press, Totowa, NJ, 253-269
- Shang, Z. & Li, H. 2017. Altered Expression Of Four Mirna (Mir-1238-3p, Mir-202-3p, Mir-630 And Mir-766-3p) And Their Potential Targets In Peripheral Blood From Vitiligo Patients. *The Journal Of Dermatology*, 44, 1138-1144.
- Shen, J., Stass, S. A. & Jiang, F. 2013. Micrnas As Potential Biomarkers In Human Solid Tumors. *Cancer Lett*, 329, 125-36.
- Soragni, A., Janzen, D. M., Johnson, L. M., Lindgren, A. G., Thai-Quynh Nguyen, A., Tiourin, E., Soriaga, A. B., Lu, J., Jiang, L., Faull, K. F., Pellegrini, M., Memarzadeh, S. & Eisenberg, D. S. 2016. A Designed Inhibitor Of P53 Aggregation Rescues P53 Tumor Suppression In Ovarian Carcinomas. *Cancer Cell*, 29, 90-103.
- Srivastava, S. K., Ahmad, A., Zubair, H., Miree, O., Singh, S., Rocconi, R. P., Scalici, J. & Singh, A. P. 2017. Micrnas In Gynecological Cancers: Small Molecules With Big Implications. *Cancer Lett*, 407, 123-138.
- Stephenson, J., Czepulkowski, B., Hirst, W. & Mufti, G. J. 1996. Deletion Of The Acetylcholinesterase Locus At 7q22 Associated With Myelodysplastic Syndromes (Mds) And Acute Myeloid Leukaemia (Aml). *Leukemia Research*, 20, 235-241.

- Stewart, J., James, J., McCluggage, G. W., McQuaid, S., Arthur, K., Boyle, D., Mullan, P., Mcart, D., Yan, B., Irwin, G., Harkin, D. P., Zhengdeng, L., Ong, C. W., Yu, J., Virshup, D. M. & Salto-Tellez, M. 2015. Analysis Of Wntless (Wls) Expression In Gastric, Ovarian, And Breast Cancers Reveals A Strong Association With Her2 Overexpression. *Mod Pathol*, 28, 428-36.
- Szajnik, M., Czystowska-Kuźmicz, M., Elishaev, E. & Whiteside, T. L. 2016. Biological Markers Of Prognosis, Response To Therapy And Outcome In Ovarian Carcinoma. *Expert Review Of Molecular Diagnostics*, 16, 811-826.
- Tai, C.-J., Hsu, C.-H., Shen, S.-C., Lee, W.-R. & Jiang, M.-C. 2010. Cellular Apoptosis Susceptibility (Cse11/Cas) Protein In Cancer Metastasis And Chemotherapeutic Drug-Induced Apoptosis. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research*.
- Testa, U., Petrucci, E., Pasquini, L., Castelli, G. & Pelosi, E. 2018. Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity And Progression, Clonal Evolution And Cancer Stem Cells. *Medicines*
- Vilming Elgaen, B., Olstad, O. K., Haug, K. B., Brusletto, B., Sandvik, L., Staff, A. C., Gautvik, K. M. & Davidson, B. 2014. Global Mirna Expression Analysis Of Serous And Clear Cell Ovarian Carcinomas Identifies Differentially Expressed Mirnas Including Mir-200c-3p As A Prognostic Marker. *Bmc Cancer*, 14, 80.
- Xie, Z., Yin, X., Gong, B., Nie, W., Wu, B., Zhang, X., Huang, J., Zhang, P., Zhou, Z. & Li, Z. 2015. Salivary Micrnas Show Potential As A Noninvasive Biomarker For Detecting Resectable Pancreatic Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, 8, 165-73.
- Yin, F., Liu, X., Li, D., Wang, Q., Zhang, W. & Li, L. 2013. Tumor Suppressor Genes Associated With Drug Resistance In Ovarian Cancer (Review). *Oncol Rep*, 30, 3-10.
- Yoo, B., Kavishwar, A., Wang, P., Ross, A., Pantazopoulos, P., Dudley, M., Moore, A. & Medarova, Z. 2017. Therapy Targeted To The Metastatic Niche Is Effective In A Model Of Stage Iv Breast Cancer. *Sci Rep*, 7, 45060.
- Zafar, R. 2017. Bioinformatics Approach: A Powerful Tool For Micrna Research. *International Journal Of Health Sciences*, 11.
- Zhang, B., Cai, F. F. & Zhong, X. Y. 2011. An Overview Of Biomarkers For The Ovarian Cancer Diagnosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 158, 119-23.
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M. S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T. L., Barchetti, A., Ward, M. R., Yao, G., Medina, A., O'Brien-Jenkins, A., Katsaros, D., Hatzigeorgiou, A., Gimotty, P. A., Weber, B. L. & Coukos, G. 2006. Micrnas Exhibit High Frequency Genomic Alterations In Human Cancer. *Pnas*, 103, 9136-9141.

- Zhang, Y., Li, M., Ding, Y., Fan, Z., Zhang, J., Zhang, H., Jiang, B. & Zhu, Y. 2017. Serum MicroRNA Profile In Patients With Colon Adenomas Or Cancer. *Bmc Medical Genomics*, 10.
- Zou, J., Li, J., Li, J., Ji, C., Li, Q. & Guo, X. 2016. Expression Profile Of Plasma Micrnas In Nonsyndromic Cleft Lip And Their Clinical Significance As Biomarkers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, 459-466.



EKLER**EK 1. ETİK KURUL YAZISI**

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



Tarih : 08.08.2017


Sayı : 854
Konu: Doç. Dr. Tuba GÜNEL hk.

Sayın Doç. Dr. Tuba GÜNEL
Fen Fakültesi

İlgi : İ.Ü.Fen Fakültesinin 05/06/2017 gün ve 210152 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Efnan Elif TEKARSLAN' ın yürüteceği 2017/647 dosya numaralı "Over Kanseri Tümörlerinde Farklılaşmış miRNA'ların Validasyonu" başlıklı çalışma kurulumuzun 23/06/2017 gün ve 12 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

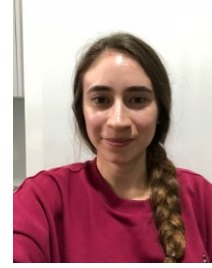
Bilgilerinizi rica ederim.


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

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Efnan Elif TEKARSLAN
Doğum Yeri	Kadıköy
Doğum Tarihi	07.11.1992
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05379659604
E-Posta Adresi	efnanelif@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Yeditepe Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi
Bölümü	Genetik ve Biyomühendislik
Mezuniyet Yılı	15.06.2016

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

Makale ve Bildiriler	
Bildiri	
1. Tekarslan E.E, Gunel T, Gumusoglu E, Hosseini M.K, CEVIK N, TOPUZ S, AYDINLI K, 1 st International Symposium On Graduate Research İn Science, 4-6 October 2018, Istanbul, Turkey	